

フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) によるアミロイドβの凝集評価

アミロイドβは、約 40 のアミノ酸残基からなるペプチドです。アミロイドβが分子間会合して平行βシートを形成することにより生じるアミロイド線維（線維状凝集体）は、アルツハイマー病患者の脳にみられる老人斑（アミロイド斑）の主成分です。また、パーキンソン病などの神経変性疾患の発症とも関連することから、アミロイド線維の形成機構やその構造には多大な関心が寄せられています¹⁾。

FTIR では、ペプチド結合の C=O 基に由来する 1650 cm⁻¹ 付近のアミド I バンドを解析することで、アミロイドβの凝集を評価することができます。図 1 にペプチド結合の構造図を示します。また、アミロイドβペプチドの二次構造（αヘリックス、βシート、βターン、ランダムコイルなどの局所的な立体構造）は波形分離を用いて求めることができます。波形分離は、各吸収バンドの波形をローレンツ曲線やガウス曲線などの近似曲線で表した計算スペクトルと実測スペクトルとの差が最小になるように、各吸収バンドの近似曲線のピーク情報（位置、強度、半値幅）を最適化する方法です²⁾。ここでは、アミロイドβの凝集評価の結果を紹介します。

R. Fuji, K. Maruyama, S. Iwasaki

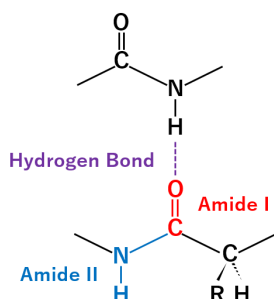


図 1 ペプチド結合の構造図

■ 使用装置、測定条件

測定には、フーリエ変換赤外分光光度計 IRTracer™-100 および ATR 測定装置 MicromATR™を用いました。ATR 法は試料をプリズムに密着させるだけでスペクトルを取得でき、透過法に比べて測定後の洗浄も簡単です。また、9 回反射 ATR プリズムを用いることで、よく利用される 1 回反射よりも感度良く測定できます。なお、アミド I バンドのピークは水蒸気のピークと重なるため、乾燥空気により光学系のパージを行いました。

表 1 測定条件

装置	: IRTracer-100 MicromATR (9 回反射 ATR プリズム)
分解	: 4 cm ⁻¹
積算回数	: 100
ゼロフィリング	: 4 倍
アポダイズ関数	: Sqr-Triangle
検出器	: DLATGS

■ 実験手順

アミロイドβ (ヒト、1-40) を超純水に溶解し、約 10 μM に調製します。25 °C 条件下に置き、0.5、1、2、3、24、48、120 時間後に ATR 測定を行います。本実験では、アミロイドβ溶液 60 μL を ATR プリズムに滴下し (30 μL × 2 回滴下)、乾燥空気の水を完全に除去させた後、プリズム上に乾固したアミロイドβを測定しました。

9 回反射 ATR プリズムは液体試料専用ですが、上記のように液体をプリズム上で乾固させた後の測定は可能です。測定後、プリズム上の試料を力を入れずに水で拭き取り、洗浄しました。

■ 波形分離の手順

アミロイドβの二次構造は次の手順に従って決定します。

- アミロイドβの二次微分スペクトルにおける 1700 cm⁻¹~1600 cm⁻¹の範囲で、10 から 14 個の負のピークを検出し、波形分離を行う際の指定波数とします。
- 今回はローレンツ関数を用いて波形分離を行いました。アミロイドβの赤外スペクトルと波形分離で分離したピークの合成スペクトルが 1750 cm⁻¹~1575 cm⁻¹の範囲で最も適合するように条件の調整を行います。
- 分離したピークの二次構造の帰属を文献³⁾に基づいて行います。各二次構造の割合は、各曲線の面積の合計に対する比で計算します。

■ 測定結果

図 2 にアミロイドβの赤外スペクトルにおけるアミド I バンドを示します。図 2 はアミド I バンドの最高ピーク強度を吸光度 0.03 になるようにそれぞれのスペクトルを規格化しています。1626 cm⁻¹ (0.5 時間) のピークは時間とともに 1630 cm⁻¹ (120 時間) にシフトしました。

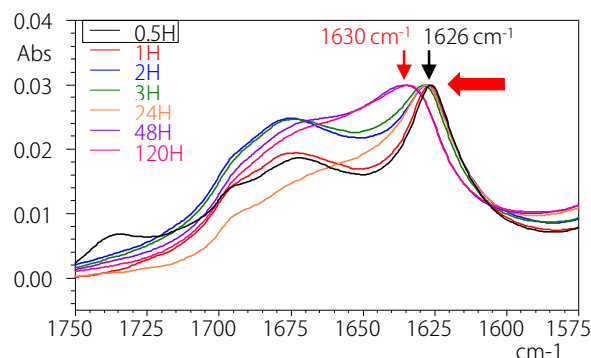


図 2 赤外スペクトルにおけるアミド I バンド

図3にアミロイドβの二次微分スペクトルを示します。二次微分スペクトルから、1696 cm⁻¹と1626 cm⁻¹のピークの強度が減少し、1626 cm⁻¹のピークが1630 cm⁻¹にシフトしていることが明らかになりました。1696 cm⁻¹と1626 cm⁻¹のピークは逆平行βシートの特徴であり、1630 cm⁻¹のピークは平行βシートに起因します⁵⁾。βシートの構造を図4に示します。

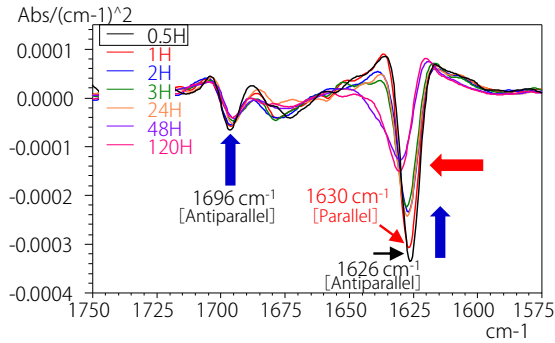


図3 二次微分スペクトル

次に、アミドIバンドの波形分離を行い、二次構造を決定しました。図5に0.5時間および120時間後の赤外スペクトルと波形分離の結果を示します。1700 cm⁻¹~1690 cm⁻¹ (高波数領域) および 1645 cm⁻¹~1615 cm⁻¹ (低波数領域) の範囲のピークをβシートに帰属しました³⁾。表2にβシートの高波数領域と低波数領域のピーク面積の和とその比を示します。0.5時間後の比の値は0.2836を示し、逆平行βシート構造が豊富であることが示唆されました。120時間後、比の値は0.1860に低下し、時間とともに逆平行βシートから平行βシート構造への変換が起こり、平行βシートを形成することにより生じるアミロイド線維が増加していることが明らかになりました。これは、前述の二次微分スペクトルと同じ結果を示しています。

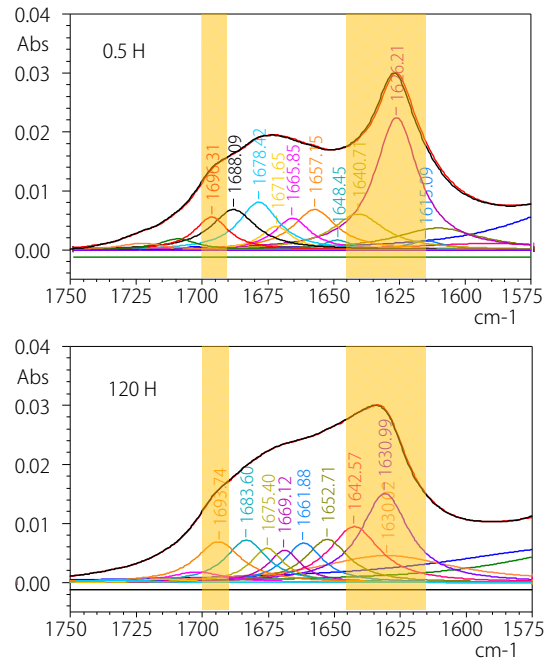


図5 赤外スペクトルと波形分離の結果

表2 βシートのピーク面積の和とその比

		0.5 時間	120 時間
ピーク面積の和	高波数：1700 cm ⁻¹ ~1690 cm ⁻¹	0.2371	0.2115
	低波数：1645 cm ⁻¹ ~1615 cm ⁻¹	0.8359	1.1372
比 (高波数/低波数)		0.2836	0.1860

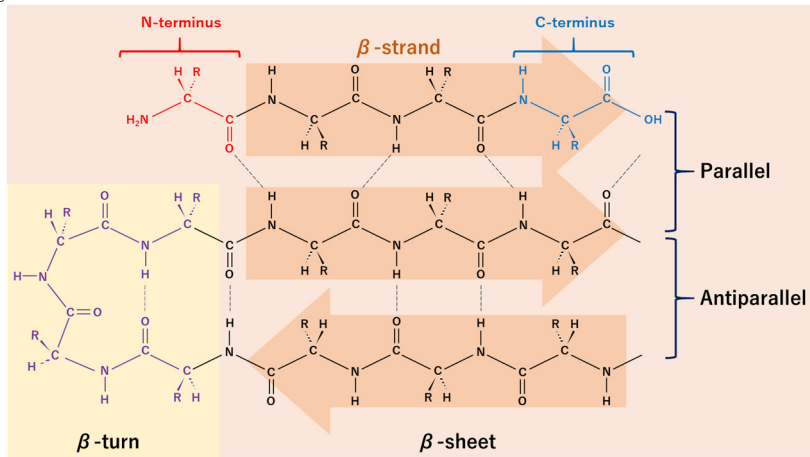


図4 βシートの構造

■ まとめ

FTIRを用いて、アミロイドβの凝集評価を行いました。赤外スペクトルおよび二次微分スペクトルにおけるアミドIバンドを解析することにより、アミロイドβの凝集に伴う二次構造の経時変化(逆平行βシート構造から平行βシート構造への変換)が読み取れました。

IRTracer は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
MicromATR は、Czitek, LLC.の商標です。

参考文献

- 1) Sean D. Moran and Martin T. Zanni, J. Phys. Chem. Lett. 2014, 5, 1984-1993
- 2) 田隅三生、「赤外分光測定法 基礎と最新手法」、株式会社エス・ティ・ジャパン
- 3) Jilie KONG, Shaoning YU. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. Acta Biochim Biophys Sin 2007, 39(8): 549-559
- 4) Youcef Fezoui, Amyloid: Int. J. Chin. Invest. 2000, 7, 166-178
- 5) Rabia Sarroukh, Erik Goormaghtigh, Jean-Marie Ruyschaert, Vincent Raussens, Biochimica et Biophysica Acta 1828 (2013) 2328-2338
- 6) JENNIFER KOVACS-NOLAN, J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 8421-8431

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年5月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。