

分光蛍光光度計 RF-6000 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⁾。

アミロイドβの凝集評価には、アミロイド凝集検出色素であるチオフラビン T (ThT) を用いた蛍光光度法が適しています。ここでは、ThT 蛍光強度と、濁度に比例するレイリー散乱強度を一定時間間隔で測定し、アミロイド線維の形成過程をモニタリングしました。

ThT は、溶液中に遊離して存在する場合にはほとんど蛍光を発しませんが、アミロイド線維と結合すると非常に強い蛍光（励起波長：440 nm、蛍光波長：482 nm）を発します²⁾。図 1 に ThT の構造式を示します。

R. Fuji, K. Maruyama, S. Iwasaki

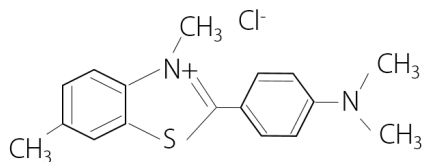


図 1 ThT の構造式

ThT の構造は、ジメチルアミノ基がフェニル基に結合した疎水性末端と、極性の N と S を含む高極性のベンゾチアゾール基からなります。この極性領域と疎水性領域の組み合わせにより、ThT 分子は水溶液中でミセルを形成しやすく、このとき正に荷電した N を含む極性領域が溶媒に向いています。したがって、ThT の N と組織構造の水酸基が水素結合を形成し、これらの色素分子がアミロイドや他の組織構造に特異的に結合することが示唆されています³⁾。

また、本実験では阻害剤としてフェノールレッドを用いました。フェノールレッドは凝集の初期段階においてアミロイドβ（プロトフィブリル）の溶解性を改善し、凝集の促進を抑制します⁴⁾。図 2 にフェノールレッドの構造式を示します。

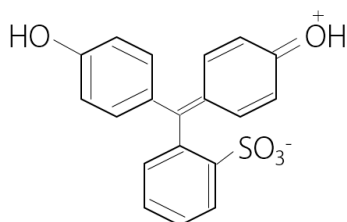


図 2 フェノールレッドの構造式

■ 実験手順

ここでは、アミロイドβ（ヒト、1-40）を使用しました。前処理、各試薬の調製、および測定方法を以下に示します。

【アミロイドβの前処理⁵⁾】

- 2 mM NaOH 水溶液 1 ml につき、アミロイドβの凍結乾燥品を 1 mg 溶解します。0.1 M NaOH 水溶液を用いて、pH が ~10.5 になるよう調製します。
- 室温で 1 分間の超音波処理を行った後、凍結乾燥をします。乾燥試料は -80 °C で保管します。

【各試薬の調製】

- 溶液 A：50 mM Tris / 150 mM NaCl バッファー
1 M Tris-HCl と 3 M NaCl 溶液を混合、希釈し、pH 7.2 になるよう調製します。4 °C で保存します。
- 溶液 B：200 μM ThT 溶液 [アミロイド凝集検出色素]
ThT と溶液 A を混合して 200 μM ThT 溶液を調製し、0.2 μm のシリンジフィルタで濾過します。
- 溶液 C：アミロイドβ溶液
前処理したアミロイドβに 4 °C の溶液 A を加え、約 12 μM に調製します。1 分間の超音波処理により完全溶解させます。4 °C で遠心分離（10000 rpm、5 分間）を行い、上澄みを採取して攪拌します。
- 溶液 D：200 μM フェノールレッド溶液 [阻害剤]
フェノールレッドと溶液 A を混合、調製します。

【測定方法】

- 各試薬を混合して 2 種類のアミロイドβ溶液（最終濃度：約 10 μM）を用意し、37 °C の恒温槽に設置します。
 - ・阻害剤あり：溶液 B：溶液 C：溶液 D を 2：17：1 の割合で混合します。
 - ・阻害剤なし：溶液 B：溶液 C：溶液 A を 2：17：1 の割合で混合します。
- 微量セルに 100 μL 入れ、測定直前にセルを振り攪拌します。20 分おきに計 5 時間の蛍光測定を行います。

■ 使用装置、測定条件

分光蛍光光度計 RF-6000 の外観を図 3 に、測定条件を表 1 に示します。RF-6000 では、クラス最高レベルの SN 比 1000 以上 (RMS) により、高感度測定が行えます。

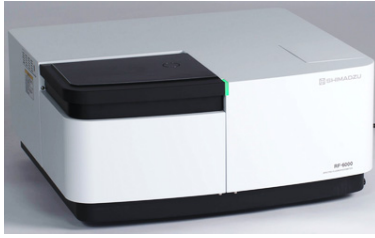


図 3 分光蛍光光度計 RF-6000

表 1 測定条件

装置	: 分光蛍光光度計 RF-6000
励起波長	: 440 nm
蛍光波長範囲	: 430~550 nm
スキャン速度	: 600 nm/min
サンプリングピッチ	: 1.0 nm
バンド幅	: Ex 5 nm, Em 10 nm
感度	: Low

■ 測定結果

アミロイドβ溶液 (阻害剤なし) の 0、100、200、300 分後の蛍光スペクトルを図 4(a)(b)に示します。(a)の縦軸は蛍光強度、(b)の縦軸はレイリー散乱強度を示します。いずれも時間経過とともに強度は増加しました。

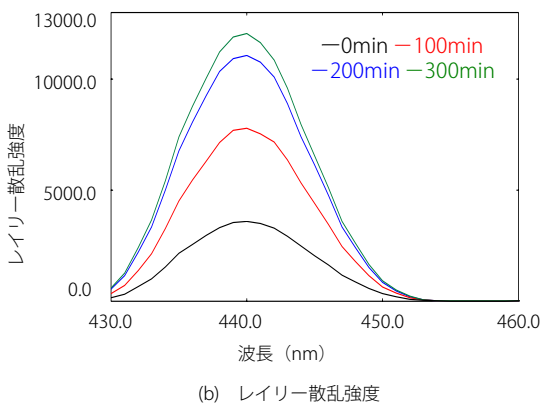
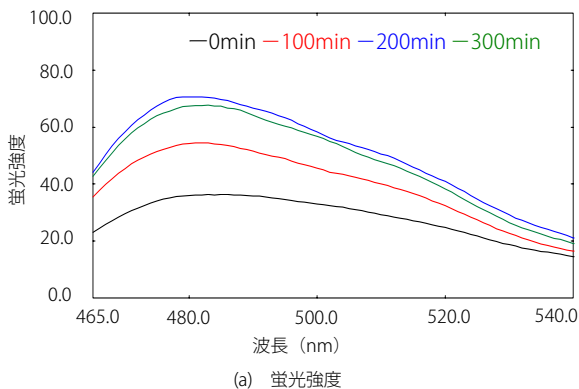


図 4 アミロイドβ溶液 (阻害剤なし) の蛍光スペクトル

図 5 に各測定時間における 482 nm の蛍光強度、図 6 に各測定時間における 440 nm のレイリー散乱強度を示します。図 5 より、蛍光強度は阻害剤なしの場合、時間経過とともに増加しました。一方、阻害剤ありの場合、蛍光強度の増加がみられませんでした。図 6 より、レイリー散乱強度は阻害剤なしの場合、時間経過とともに顕著に増加しました。これはアミロイドβが凝集してアミロイド線維を形成し、濁度が増大したことを示唆します。阻害剤ありの場合には、レイリー散乱強度の増加がみられませんでした。

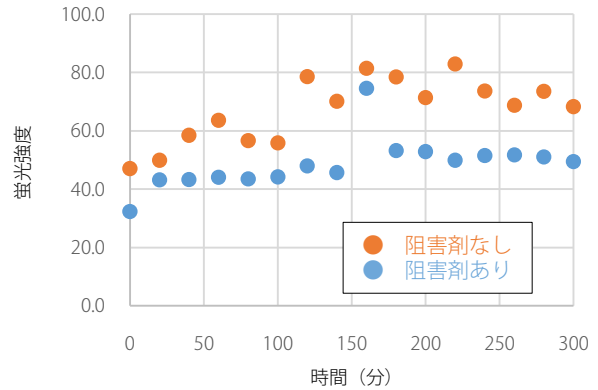


図 5 各測定時間における 482 nm の蛍光強度

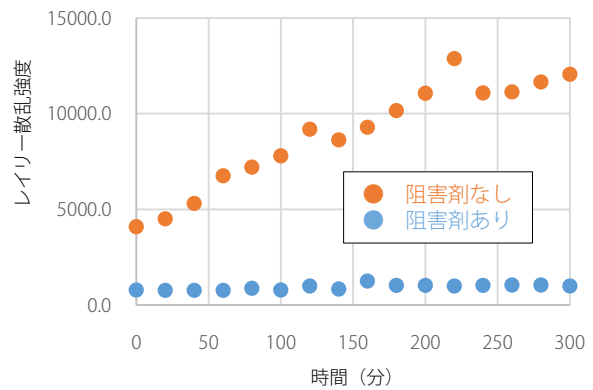


図 6 各測定時間における 440 nm のレイリー散乱強度

■ まとめ

分光蛍光光度計 RF-6000 を用いて、アミロイドβの凝集に伴う蛍光強度とレイリー散乱強度の変化を測定しました。阻害剤の有無で挙動が異なり、阻害剤なしの場合には、時間経過とともにアミロイドβが凝集し、蛍光強度、レイリー散乱強度ともに増加することが明らかになりました。

参考文献

- 1) Sean D. Moran and Martin T. Zanni, J. Phys. Chem. Lett. 2014, 5, 1984-1993
- 2) 杉本真也, Kagaku to Seibutsu. 2017, 55(8), 573-579
- 3) Ritu K. etc, Journal of Structural Biology. 2005, 3, 151, 229-238
- 4) Chun Wu. etc, Biophys J. 2006, 91(10), 3664-3672
- 5) Youcef Fezoui, Amyloid: Int. J. Chin. Invest. 2000, 7, 166-178