

主論文の要旨

**Partial Identification of Amyloid- β Degrading Activity
in Human Serum**

〔ヒト血清におけるアミロイド β 分解活性の部分同定〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
老化基礎科学講座 老化基礎科学分野

(指導：丸山 光生 教授)

三河 隆太

【緒言】

アルツハイマー病 (AD) の特徴としてアミロイド β ペプチド ($A\beta$) の蓄積による老人斑や過剰にリン酸化されたタウによる神経原線維変化が病理学所見であり、加齢と共に認知機能が低下する。ADには早期発症型家族性 (FAD) と後期発症型孤発性が存在し、FADの原因遺伝子が複数発見され、それによりADモデルマウスが作製された。しかし、FADは全体のAD患者の中で10%であり、AD患者のほとんどが孤発性であるため発症機序を解明するには未だに良いモデルマウスは存在しない。さらにAD患者の80%という高い割合で血管にアミロイドが沈着する脳アミロイド血管症 (CAA) を発症する。これまでに脳や脳血管周囲に蓄積や沈着する $A\beta$ は神経細胞由来と考えられてきたが、最新の報告では神経細胞以外のアストロサイトや脳血管周皮細胞、老化した脳血管内皮細胞から $A\beta$ の産生が認められた。従って、ADやCAAは脳血管における微小環境の $A\beta$ 代謝に起因するのではないかと考えられる。本研究では内皮細胞の $A\beta$ 産生機構を解析中にヒト血清に $A\beta$ 分解活性を見出し、その活性の同定を試みた。

【方法】

Innovative Research社から正常ヒト血清 (pooled) を購入して $A\beta$ 分解活性成分の精製を行った。活性測定は各精製分画に100 pMのヒト $A\beta$ 40合成ペプチドを加えて37°C、72時間インキュベーションし、アセトン沈殿後、ギ酸で処理を行い、1Mトリスで中和をしてからELISAで残存量を調べた。その際に $A\beta$ 40が50%分解された量を1ユニットと定義した。精製はまず初めに硫酸分画によって粗精製を行った。次にショ糖密度勾配等電点電気泳動カラム(IEF)を用いて電荷により分取した。さらにヒドロキシアパタイト (HA) カラム、ゲルろ過、イオン交換カラム (DEAE) により活性分画を得た。DEAE精製分画でSDS-PAGEを行い、活性ピークと一致するバンドを切り取り、LCMSによって蛋白質の同定を行った (Fig. 1a)。同定の結果から蛋白質分解酵素阻害剤を加え、酵素の種類を検討した。

【結果】

まず初めにヒト血清10 mlは硫酸分画にて粗精製を行った。0-30%硫酸濃度では蛋白総量の30%、30-40%では15%、40%以上では50%が沈殿した。0-30%では精製前と比活性比 (U/mg) は変わらず、30-40%で5倍の比活性を示した (Fig. 1b)。40%以上の硫酸濃度では蛋白総量は一番多いにも関わらず、比活性は精製前よりも低い値を示した。従って多くの夾雑蛋白質を除き、ヒト血清中から $A\beta$ 分解活性成分の分画が得られた。次にpHによりこの活性成分を分画するためにIEFで精製を行った。その結果、蛋白質を示す吸光度280のピークがpH4, pH5, pH10付近の3つに分かれた (Fig. 1c)。活性測定を行った結果、pH4付近のピークに活性を示す分画が存在した。IEFの結果から $A\beta$ 分解活性は酸性蛋白質である可能性が高いため、酸性蛋白質をさらに精製する方法として酸性蛋白質と塩基性蛋白質を分けることのできるHAカラムで精製を試

みた。リン酸カリウム緩衝液 (KPB) で溶出した結果、蛋白質は低濃度と高濃度の KPB で2つの溶出ピークに分かれ、どちらの分画にも活性を示す結果であった (Fig. 1d)。HA カラムは六角柱状の水酸アパタイト粒子から構成され、カラムにはカルシウムイオンの陽イオン (+) 表面とリン酸基や水酸化物イオンの陰イオン (-) 表面が存在する。KPB (-イオン) で溶出し、活性成分は低濃度の KPB と高濃度の KPB で見出された。低濃度 KPB で溶出された分画を低陽イオン親和性分画 (low cation affinity: LAC) と高濃度 KPB で溶出された分画を高陽イオン親和性分画 (high cation affinity: HAC) とした。驚いたことに HA カラムで精製した結果、IEF 後の比活性と比較して LAC は約 10 倍で HAC は約 50 倍を示した (Table)。しかし、HA カラムで溶出した LAC と HAC 分画両方の蛋白質ピークと活性ピークはこの時点で一致していないので、次に分子量で振り分けるゲルろ過によって LAC と HAC の活性成分をそれぞれ精製した。PBS で溶出し、ゲルろ過のキャリブレーションをおこなった結果、LAC と HAC は 400 kDa 以上という高分子域に活性が見出された (Fig. 1e)。LAC においては分子量 60 kDa 付近に蛋白の大きなピークが見られたが活性はなかった。LAC と HAC で活性が強い分画を SDS-PAGE により解析したところ、まだ多くの蛋白質バンドが検出されたため、最後の精製で陰イオン交換カラム (DEAE) によって精製を行った。NaCl 濃度の勾配によって溶出した結果、LAC は HA カラムと同様に低濃度 NaCl によって活性と蛋白ピークが一致する分画が現れた (Fig. 1f)。HAC も HA カラムと同様に高濃度 NaCl によって活性と蛋白が存在する分画が得られたが単一ピークにはならなかった。最終的に LAC は精製前のヒト血清の比活性が 2 U/mg に対して約 11,000 U/mg で精製度を増すことができた (Table)。この LAC で得られた単一ピーク付近の分画を SDS-PAGE 解析後、活性と一致した分画 (no.41) の蛋白質バンドの LC/MS 解析を行った (Fig. 2a)。その結果、複数の蛋白質バンドで α 2-macroglobulin (a2M) とセリンプロテアーゼが同定された (Fig. 2b)。最後に、どのような分解酵素が A β を切断するか調べる為に、代表的な分解酵素阻害剤を用いて分解活性を測定した。その結果、熱処理とセリンプロテアーゼ阻害剤 (AEBSF) によって LAC 分画液の A β 分解活性は阻害された (Fig. 2c)。その他の蛋白質阻害剤やキレート剤では阻害されなかった。従って、ヒトの血清中において a2M とセリンプロテアーゼを含む分画成分は A β を速やかに分解することが示された。

【考察】

これまでに脳実質で主な A β 分解酵素はネプリライシン (NEP) やインスリン分解酵素が知られている。マウスレベルにおいては NEP の欠損により老人斑が蓄積されやすいことが分かってきたが、実際にヒトレベルにおいて A β 分解酵素と AD の関係性は未だ解明されていない。本研究はヒトの正常血清から A β 分解活性の性状解析を行い、a2M とセリンプロテアーゼの非常に高い A β 分解活性の分画が得られた。a2M は蛋白質分解酵素を阻害する効果が良く知られ、その機能は 4 量体 (単量体は約 180 kDa) を形成して分解酵素を内包することにより分解酵素を阻害して速やかに排除する。一

方で、a2M は A β と非常に高い親和性を持ち、アミロイド形成を阻害するという報告もあり、a2M が A β 沈着に関係していることがわかってきた。さらに、4 量体を形成し構造変化した a2M は脳血管中の A β 除去を促進する低密度リポ蛋白質受容体関連蛋白質 1 (LRP1) の受容体である。LRP1 と a2M の染色体はヒトでは同じ 12 番 (マウスは a2M が 6 番、LRP1 が 16 番の染色体である) に存在しており、両者は A β 代謝に非常に深い関わりがある。AD 患者で血管内皮細胞の LRP1 の発現が低下していることから LRP1 や a2M は AD の危険因子として知られている。しかし、人種によって LRP と a2M における多型は AD の危険因子でないという報告も存在することから、遺伝子変異や遺伝子あるいは蛋白質発現の変動による AD との関係性を示すにはまだ議論が必要である。従って、本研究によりヒト血清中における a2M-分解酵素複合体の活性が強い A β 分解活性を有していることから、a2M-分解酵素複合体と AD の関係性を調べる必要がある。今後、a2M 抗体を用いて血液中の a2M-分解酵素複合体のアッセイ系を確立し、AD 患者の血液中でこの複合体の活性が AD と脳微小血管の A β 代謝にどのように関与しているか調べる必要がある。

【結論】

ヒト血清中の a2M-セリンプロテアーゼ複合体が A β 分解活性に重要であると考えられる。