5. アポリポ蛋白 J によるアルツハイマー病脳アミロイド形成抑制機序の解明

松原 悦朗

Key words: アルツハイマー病, アポリポ蛋白 J, A β , 可溶性 A β

(日老医誌 1999; 36: 110—115)

緒 言

血液・髄液中の可溶性 A β は主にアミノ酸40個からなるタイプ (A β 1-40) であるが、質量分析法にて、C 末端の長い42個のアミノ酸からなる分子種 (A β 1-42) や N と C 末端のプロセッシングされた分子種の存在も明らかにされている¹⁾²⁾。ダウン症脳や胎児脳の検討から、脳内では可溶性 A β 1-42分子種がアミロイド沈着に先立ち選択的に増加しており³⁾、アルツハイマー病でも可溶性 A β が増加していることが報告された⁴⁾⁵⁾。すなわち、他の全身性アミロイドーシスと同様に、アルツハイマー病においても、直接可溶性 A β から A β アミロイド線維が形成されると考えられる。我々はアポリポ蛋白 J が可溶性 A β と結合し、この結合が、A β の solubility を維持し、その結果、A β の自己凝集やアミロイド線維形成を抑制しているとの仮説を提唱した^{6)~8)}。本研究ではアポリポ蛋白 J のアミロイド線維形成に果たす役割を明らかにするため、アポリポ蛋白 J による A β の可溶性維持と自己凝集抑制機構を詳細に検討したので報告する⁹⁾。

方 法

1. 合成 A β 1-40/1-42ペプチドとアポリポ蛋白 J の結合親和性の検討

1-1. 既に開発報告した ELISA 法(固相法)⁸⁾を用いて、固定化した合成 A β 1-42ペプチドに対するアポリポ蛋白 J (脱脂型) の濃度依存性結合を検出した。結合したアポリポ蛋白 J は標識抗体を利用して、波長405nm における吸光度から得られた濃度依存曲線より解離定数 (Kd) を計算し、結合親和性の指標とした。

1-2. さらにビオチン標識アポリポ蛋白 J に対する非

標識アポリポ蛋白 J による競合的結合実験にて、結合の特異性を検討した。標識アポリポ蛋白 J の最大結合量の 50% を競合するのに必要な非標識アポリポ蛋白 J 量 (IC₅₀ 値) も結合親和性の指標として求めた。

1-3. 各種 pH の及ぼす影響: アルツハイマー病脳では健常脳に比し pH が低いことが報告されている。従って、上記実験系で生理的 pH7.4以外に、pH 6.0及び5.0における結合親和性 (Kd 値/IC₅₀ 値) 変化を比較検討した。

1-4. 他のアミロイド関連蛋白 (アポリポ蛋白 E2, E3, E4, α 1-アンチキモトリプシン, トランスサイレチン) による競合的結合実験を施行し、アポリポ蛋白 J との相対的結合親和性を明らかにした。

1-5. ネイティブな HDL アポリポ蛋白 J と A β 1-40/1-42の結合親和性を ELISA による競合的結合阻害法にて評価した。

2. アポリポ蛋白 J-A β の複合体の精製

A β 1-42アフィニティーカラムに結合したアポリポ蛋白 J の溶出条件を pH 7.4~2.5までの段階勾配にて検討した。両者の結合は pH 7.4~3.5までは安定で、pH 3.0で一部が、pH 2.5ではほぼ大部分が解離した。通常の逆相 HPLC (Vydac C4 microbore column, 214 TP 52, 0.21 $\times$ 25cm) の溶媒 (0.1%トリフルオロ酢酸存在下) での pH は2.0であるためアポリポ蛋白 J-A β の複合体は解離した状態にあると考えられる。このため先の pH 依存性結合を利用し、pH 3.1の条件でアセトニトリルの 3~70%の直線勾配をかけ、逆相 HPLC を試行したところアポリポ蛋白 J-A β の複合体の分離精製に成功した。

3. アポリポ蛋白 J の合成 A β 1-42ペプチド自己凝集に及ぼす影響: 自己凝集抑制機構解明

3-1 アポリポ蛋白 J の非共存下、共存下での合成 A β 1-42ペプチド重合化

合成 A β 1-42ペプチドを PBS (pH 7.4) 溶液に溶解し (濃度; 2.2 μ M), ①フレッシュ A β ②24時間自己凝集

後 A β ③48時間自己凝集後 A β ④フレッシュ A β +2.2 μ M アポリポ蛋白 J ⑤24時間自己凝集後 A β +2.2 μ M アポリポ蛋白 Jを10%Tris/Tricine SDS-PAGE, Immunoblot 後, モノクローナル抗 A β 抗体 (6E10) を用いて合成 A β 1-42ペプチド重合化の程度を比較検討した。

3-2 相互作用機序: リガンドプロットによる検討

フレッシュもしくは72時間自己凝集後の合成 A β 1-42ペプチド (125 μ M) を10%Tris/tricine SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜に転写し, 上述のごとく Immunoblot にてその重合の程度を評価した。ニトロセルロース膜上に分離されたペプチド (モノマー, ダイマーなど) へのアポリポ蛋白 J の結合は, ニトロセルロース膜をアポリポ蛋白 J 溶液中で37℃でインキュベート後, モノクローナル抗アポリポ蛋白 J 抗体 (IF12) にて検出した。

3-3 アポリポ蛋白 J の非共存下, 共存下での合成 A β 1-42ペプチド自己凝集能

-1. 合成 A β 1-42ペプチドを0.1M トリス塩酸, pH 7.4 溶液に溶解し (濃度; 100 μ M), 各時間 (0, 1, 2, 3, 14日), 37℃インキュベートした。それぞれの14,000rpm 遠心上清中に存在する可溶性ペプチドを逆相 HPLC に

よって分離し, 定量した。

-2. 上記の条件のもとで, アポリポ蛋白 J を合成ペプチドと共存させ, 同様に定量し, 合成ペプチドの自己凝集に及ぼす影響を検討した。

-3. 上記のアポリポ蛋白 J の非共存下, 共存下で逆相 HPLC 分離されたペプチドの CD スペクトルを解析し, 二次構造の変化を推定した。0.3mg/ml 濃度のペプチドを光波長0.1cm のセルを用いて260~190nm まで測定した。測定機種は Jasco J-720である。

-4. 上述のアポリポ蛋白 J の共存下で逆相 HPLC 分離されたペプチドを37℃で再インキュベートし, 自己凝集の有無を HPLC にて定量評価した。

4. アポリポ蛋白 J-A β 複合体の各種酵素処理への安定性

アポリポ蛋白 J 共存下における A β への各種酵素 (プラスミン, トリプシン, トロンビン, キモトリプシン) 処理 (1:100w/w) を施行し, アポリポ蛋白 J の影響をイムノプロットにて検討解析した。

結果及び考察

(1) 血液・髄液中の可溶性 A β と脳血管アミロイドの

Fig. 1 ApoJ-A β (A β 1-42 and A β 1-40) interaction at variable pH.

主たる分子種である A β 1-40と、アルツハイマー病の脳内沈着アミロイドの主たる分子種である A β 1-42の両者とアポリポ蛋白 J の結合親和性の検討

血漿より精製したアポリポ蛋白 J (脱脂型) と A β の結合を ELISA 法にて検討し、両者の結合親和性はきわめて強固であり、A β 1-42・A β 1-40の両分子種で類似の解離定数 (A β 1-42:K_d=3.8-4.6nM, A β 1-40:K_d=2.0-2.4nM, pH 7.4~5.0) であることが明らかとなった (Fig. 1A, 1B). In vivo の生理的な環境下では、両者の結合は他の HDL 構成成分であるアポリポ蛋白 E (▲, E2; ●, E3; ▼, E4) や他の血漿アミロイド関連蛋白として知られる α 1-アンチキモトリプシン (△), トランスサイレチン (○) と常に競合下にあると考えられるため、アポリポ蛋白 J とその結合親和性を比較した (Fig. 1C, 1D). アポリポ蛋白 E は α 1-アンチキモトリプシンとトランスサイレチンなどに比し最も強い competitor であったものの、アポリポ蛋白 J 自体より約 3~5 倍 A β に対する親和性が低いことが判明した (IC₅₀値; A β 1-42:apoJ, 80±18nM; apoE4, 245±46nM; apoE2, 267±39nM; apoE3, 292±45nM; A β 1-40:apoJ, 77±15nM; apoE4, 335±49nM; apoE2, 316±47nM; apoE3, 508±44nM). この差は、その体液中の濃度を考慮すると、生理的条件下において A β はほとんどアポリポ蛋白 J と結合して存在している可能性を強く支持するものである。これはすでに我々が報告したごとく、実際に血液・髄液中で A β の複合体の存在が証明されるのは、主にアポリポ蛋白 J である事実とよく一致する。

(2) 両者結合の生理的な意義の検討

In vitro のネイティブな状態ではアポリポ蛋白 J (脱脂型) は主としてモノマーとダイマーとして存在し、その両者が 1:1 の一定のモル比で A β と複合体を形成していることはすでに報告した⁹⁾。本研究では、アポリポ蛋白 J が生理的な状態では脂質・リポ蛋白複合体粒子として存在していることを考慮し、native な HDL アポリポ蛋白 J と精製脱脂後のアポリポ蛋白 J とで A β との結合親和性に相違が認められるかどうかを検討した。両蛋白ではほぼ同一の IC₅₀値 (A β 1-40:IC₅₀ (purified apoJ) = 77nM, IC₅₀ (HDL apoJ) = 86nM), A β 1-42:IC₅₀ (purified apoJ) = 80nM, IC₅₀ (HDL apoJ) = 66nM) が得られた。従って、in vitro のみでなく、in vivo においても両者の相互作用における生理活性が改めて立証されたことになる (Fig. 2)。この結果はアポリポ蛋白 J が可溶性 A β の担体蛋白として実際に生体内で機能發揮していることを強く示唆する所見と考えられる。

(3) 自己凝集抑制機構解明: アポリポ蛋白 J の合成

Fig. 2 Self-inhibition of the apoJ-A β complex formation by apo-HDL.

Fig. 3 Immunodetection of the apoJ-A β 1-42 complex formed with fresh and/or aggregated peptide.

A β 1-42ペプチド自己凝集に及ぼす影響の解析

3-1 アポリポ蛋白 J の非共存下、共存下での合成 A β 1-42ペプチド重合化

Fig. 3 (左半) に示すように、A β 1-42ペプチドはフレッシュな状態 (lane 1) ではモノマーとダイマーから構成されるが、24時間 (lane 2), 48時間 (lane 3) と経過するに従い、ダイマーとテトラマーをはじめとするオリゴマー形成を示す重合化が観察された。一方、フレッシュな A β 1-42ペプチドと24時間自己凝集後の A β 1-42ペプチドにアポリポ蛋白 J を共存させ24時間インキュベートすると (lane 4 and 5), 85kDa の複合体形成はとフレッシュな A β 1-42ペプチドとの間で8倍量の形成が確認された (矢印頭)。重合化パターンはそれぞれアポリポ蛋白 J の共存を開始した状態と同程度で、その程度の増強は認められなかった (lane 4と lane 1, lane 5と lane 2)。この結果はアポリポ蛋白 J が可溶性 A β の重合化と自己凝集を阻止することで、結合型の A β 分子種に

Fig. 4 Complex dissociation by pH.

プロテクティブな効果を発揮している可能性を示している。

3-2 相互作用機序：リガンドプロットによる検討

Aβオリゴマーは125μMの高濃度Aβペプチドを72時間インキュベートする事により作製し (lane 2 and 4), モノマーとダイマーからなるフレッシュAβ (lane 1 and 3) とともに, どのAβ分子種(モノマー?オリゴマー?)とアポリポ蛋白Jとで相互作用が認められるかをリガンドプロットにて検証した (Fig. 3右半). その相互作用はAβオリゴマーでなく, 主にモノマーとの間で発揮されていることが明らかとなった (Fig. 3, lane 3, and 4, <).

3-3 アポリポ蛋白 J の非共存下, 共存下での合成 Aβ 1-42ペプチド自己凝集能

Aβとアポリポ蛋白Jの結合親和性はpH 7.4~5.0の範囲では同程度であることが今回の検討から明らかとなり, またAβ1-42アフィニティーカラムの検討から複合体はpH 7.4~3.5までは安定で, pH 3.0で一部が, pH 2.5ではほぼ大部分が解離することがわかった (Fig. 4A). 複合体のこのpH依存結合を利用し, アポリポ蛋白J-Aβ複合体と複合体より解離させたフリーAβの分離精製を, 逆相HPLC法にて確立した. アポリポ蛋白J-Aβの

Fig. 5 ApoJ prevents the Aβ1-42 self-aggregation.

複合体精製はpH 3.1にて可能であり, アポリポ蛋白J-Aβの複合体から解離させられたフリーのAβの回収がpH 2.0でなされることが明らかとなった (Fig. 4B). この実験系の利点は容易に自己凝集を起こす合成Aβ1-42ペプチドを使用するため, アポリポ蛋白Jの自己凝集抑制効果の検討には最適であること, さらに逆相HPLCで分離回収された合成Aβ1-42ペプチドは, アポリポ蛋白J-Aβの複合体より解離された直後のいわゆるアポリポ蛋白J結合型の可溶性合成Aβ1-42ペプチドを反映していると考えられる. 従ってこのCDスペクトル解析から, アポリポ蛋白JによるAβの自己凝集抑制がその二次構造を変化させることにより起こるのか否かが判明する. さらにこのアポリポ蛋白J結合型から分離精製した可溶性合成Aβ1-42ペプチドの自己凝集能の評価は, 担体蛋白としてのアポリポ蛋白Jの機能が果たせなくなったいわば病的状況とも想定でき, アルツハイマー病の病態を考える上できわめて重要な知見が得られる. 合成Aβ1-42ペプチド単独では24時間後には23.5%, 48時間後には4%のみが可溶性ペプチドとして存在するにすぎなかったが (Fig. 5A), アポリポ蛋白Jに結合した合成Aβ1-42ペプチドは自己凝集を起こさず, 37℃で72時間で96%, 14日間インキュベート後でも87%の可溶性ペプチドが逆相HPLCで回収可能であった (Fig. 5B). 72時間のインキュベート後 (96%のペプチドが可溶性画分に存在する条件下) に, 結合を解離させられAβ1-42ペプチドは, 解離させられた途端に自己凝集を開始し, その内因性の自己凝集能が保たれていることも明らかとなった (Fig. 6B and 6A). その際, 結合型と非結合型のペプチドCDスペクトル解析では両者ともアミロイド形成に特徴的なβシート構造 (75~80%) を二次構造

Fig. 6 Aβ1-42 aggregation properties.

Fig. 7 ApoJ protects Aβ peptides from proteolytic degradation.

に持つことが判明した (Fig. 6B and 6A). すなわち, アポリポ蛋白 J に結合した可溶性 Aβ は β シート構造を持ちつつも自己凝集を起こすことなく, その solubility が維持されていることが明らかとなった.

#3-4 アポリポ蛋白 J の非共存下, 共存下での合成 Aβ1-42 ペプチドの酵素処理への安定性

アポリポ蛋白 J に結合型の Aβ はプロテアーゼ消化抵抗性となることも証明され (Fig. 7), アポリポ蛋白 J と複合体を形成している Aβ は病態形成カスケードへの参加を阻止されている可能性が考えられた. しかし, ア

ポリポ蛋白 J は自己凝集を起こした Aβ への結合親和性は低下し, その相互作用は Aβ オリゴマーでなく, 主にモノマーとの間で発揮されていることから, アミロイド線維形成後の病的な状態ではその機能低下が危惧される. 以上, 筆者らの検討結果は, アポリポ蛋白 J が Aβ 1-42 ペプチドのアミロイド線維形成を阻害するとする Oda らの In vitro の報告と考えあわせると, アポリポ蛋白 J はその結合型 Aβ 分子種に対し, 自己凝集ひいてはアミロイド線維形成を抑制するプロテクティブな因子として機能しており, その両者の相互作用の破綻がアミロイド線維形成につながる一つの原因であると考えられた.

現在, アミロイド線維の直接の前駆体としての可溶性 Aβ の重要性が注目されており, アルツハイマー病の予防・治療法開発の大きなターゲットとなっている. 今回の研究から明らかとなったように, アミロイド線維形成が抑制されているアポリポ蛋白 J 結合型 Aβ とアミロイド線維形成に貢献しうるアポリポ蛋白 J 未結合型 Aβ のヒト体液中での解析は, アルツハイマー病の病態を考える上できわめて重要なアプローチである. 従って, 今後, このアミロイド線維形成に貢献しうるアポリポ蛋白 J 未結合型の可溶性 Aβ 分子種の存在をアルツハイマー病と健常者との間で検討し, 病態に即した新たな生化学的診

断マーカーの確立とアミロイド沈着の予防・治療法開発を具体化したい。

謝辞：本研究は Jorge Ghiso 先生, Blas Frangione 先生 (New York University Medical Center) らとの共同研究である。

文 献

- 1) Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Sinha S, Schlossmacher M, et al.: Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β peptide from biological fluids. *Nature* 1992; 359: 325—327.
- 2) Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB: Characterization of β -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 1993; 61: 1965—1968.
- 3) Teller JK, Russo C, DeBusk LM, Angelini G, Zaccheo D, Dagna-Bricarelli F, et al.: Presence of soluble amyloid β -peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Med* 1996; 2: 93—95.
- 4) Tabaton M, Nunzi MG, Xue R, Usiak M, Autilio-Gambetti L, Gambetti P: Soluble amyloid β -protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 1958—1603.
- 5) Näslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, et al.: Relative abundance of Alzheimer A β amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8387—8382.
- 6) Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, et al.: The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP40, 40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J* 1993; 293: 27—30.
- 7) Koudinov A, Matsubara E, Frangione B, Ghiso J: The soluble form of Alzheimer's amyloid beta protein is complexed to high density lipoprotein 3 and very high density lipoprotein in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1164—1171.
- 8) Matsubara E, Frangione B, Ghiso J: Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A β interaction. *J Biol Chem* 1995; 270: 7563—7567.
- 9) Matsubara E, Soto C, Governale S, Frangione B, Ghiso J: Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid β solubility. *Biochem J* 1996; 316: 671—679.