

I 研究課題

蛍光色素チオフラビン T を用いたヒト AL アミロイド線維分光蛍光定量法

II 研究者氏名

内木宏延（福井医大第二病理）、長谷川一浩・山口 格（福井医大臨床検査医学）、池田修一（信州大医学部第三内科）、下条文武（福井医大臨床検査医学）

III 研究要旨

試験管内 AL アミロイド線維形成を反応速度論的に解析する実験系を確立するため、AL アミロイドーシス剖検例の新鮮凍結組織より精製した AL アミロイド線維を用い、蛍光色素チオフラビン T (ThT) を用いたヒト AL アミロイド線維分光蛍光定量法を確立した。(i) AL アミロイド線維に結合した ThT の極大励起・蛍光波長は、各々 445nm, 490nm であった。(ii) 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の AL アミロイド線維に対し ThT 濃度を変化させると蛍光は双曲線を描いて増加し、プラトーに達した。双曲線より ThT の K_d 値を求めると、約 300nM であった。(iii) 5 μM の ThT に対し AL アミロイド線維濃度を変化させた場合、蛍光強度は直線的に変化し、これより AL アミロイド線維定量のための標準曲線を作成した。(iv) 5 μM の ThT に対し、同じ蛋白濃度の透析アミロイド線維、及び AL アミロイド線維が発する蛍光強度を比較すると、前者が後者の約 6 倍の強度を示した。

IV 研究目的

全身性 AL アミロイドーシスは、日本におけるヒトアミロイドーシスの約半数を占めるが、他のアミロイドーシスと同様、有効な治療法はおろか発症機構の詳細は未だ解明されていない。われわれは、AL アミロイド線維沈着機構の解明、および沈着阻害剤の開発を目指し、全身性 AL アミロイドーシス患者から得た AL 蛋白、Bence Jones 蛋白 (BJP)、および臓器沈着 AL アミロイド線維を用い、試験管内 AL アミロイド線維形成を反応速度論的に解析する実験系を確立する事を本研究の目的とする。今年度は、全身性 AL アミロイドーシス剖検症例の新鮮凍結組織より精製した AL アミロイド線維を用い、蛍光色素チオフラビン T (ThT) を用いたヒト AL アミロイド線維分光蛍光定量法を確立する。

V 研究方法

(i) 67歳女性の全身性 AL アミロイドーシス剖検例 (IgG λ 型) の新鮮凍結肺門部気管支周囲軟部組織より、Pras 法、 $10^5 \times g$ 超遠沈、及び 50-60% 不連続ショ糖密度勾配超遠沈により AL アミロイド線維を精製した¹⁾。透析アミロイド線維は、60才男性の透析アミロイドーシス患者 (透析歴19年) より摘出した膝窩のう胞壁より、別に記した方法で精製した²⁾。

(ii) 分光蛍光定量のための反応溶液は容量 1.0ml で、0-5 μM ThT (和光純薬)、及び 50mM

glycine-NaOH, pH 8.5を含んでいた。(iii) 分光蛍光定量は、Hitachi F-3010 分光蛍光光度計を用い、レシオ・モード、25°Cで行った。(iv) 蛋白定量は、ウシγ-グロブリンをスタンダードに、Lowry法で行った。

VI 結果と考察

(i) AL アミロイド線維に結合した ThT の極大励起・蛍光波長は、各々 445nm, 490nm であった。これは、これまでに解析した種々のヒト、及びマウスアミロイド線維の極大励起・蛍光波長 (Ex: 446-455nm, Em: 482-490nm) とほぼ同じであり²⁾⁻⁴⁾、ThT がアミロイド線維の共通構造に結合して蛍光を発すると考えられる。(ii) 2.5 μg/ml の AL アミロイド線維に対し ThT 濃度を変化させると蛍光は双曲線を描いて増加し、プラトーに達した。双曲線より ThT の Kd 値を求めると、約 300nM であった。これまでに解析した種々のヒト、及びマウスアミロイド線維の Kd 値は 35-1100 nM であり²⁾⁻⁴⁾、今回解析した AL アミロイド線維は、ThT に対し比較的親和性が高いと考えられる。また上に述べた共通結合部位の微妙な立体構造の違いが、種々のアミロイド線維間の Kd 値の違いをもたらしていると考えられる。(iii) 5 μM の ThT に対し AL アミロイド線維濃度を変化させた場合、蛍光強度は直線的に変化し、これより AL アミロイド線維定量のための標準曲線を作成した。(iv) 5 μM の ThT に対し、同じ蛋白濃度の透析アミロイド線維、及び AL アミロイド線維が発する蛍光強度を比較すると、前者が後者の約 6 倍の強度を示した。両アミロイド線維と ThT との結合状態の違いが、上記蛍光強度の差をもたらしていると考えられる。

VII 結論

今回我々は、ThT を用いたヒト AL アミロイド線維の試験管内分光蛍光定量法を確立した。今後の課題として、抽出した AL アミロイド線維から AL 蛋白質 (モノマー) を精製し、AL アミロイド線維伸長の一次反応速度論モデル、及び重合核依存性重合モデルを構築する。また、全身性 AL アミロイドーシスにおいては、症例ごとに沈着した AL 蛋白質の一次構造が異なる。そこで剖検症例を集積し、上記モデルの一般化を図る。

VIII 参考文献

- 1) 下条文武、長谷川一浩、山口 格、池田修一、内木宏延。新鮮凍結臓器からの AL アミロイド線維の精製、及び電頭的・生化学的解析。本報告書21頁。
- 2) Naiki H., Hashimoto N., Suzuki S., Kimura H., Nakakuki K., Gejyo F. Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* 1997; 4: 223-232.
- 3) Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Anal. Biochem.* 1989; 177: 244-249.
- 4) Naiki H., Nakakuki K. First-order kinetic model of Alzheimer's β-amyloid fibril extension in vitro. *Lab. Invest.* 1996; 74: 374-383.

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Biochemistry, 37 (51) :17882-17889, Apolipoprotein E and antioxidants have different mechanisms of inhibiting Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro.	1998年12月 22日	American Chemical Society	Naiki H., Hasegawa K., Yamaguchi I., Nakamura H., Gejyo F., Nakakuki K.