

# 活性ハロゲン種によるA $\beta$ の化学修飾

阿久津 弘明<sup>1</sup>、津村 直美<sup>2</sup>、中村 正雄<sup>2</sup>  
(旭川医科大学 <sup>1</sup>実験実習機器センター、<sup>2</sup>化学)

## はじめに

認知症のひとつアルツハイマー病は脳への老人斑の蓄積が指標の一つである。これと酸化ストレスの発生との関連性が疑われている。

アルツハイマー病発症機構の仮説は数多いがその中にアミロイド仮説がある。A $\beta$ は前駆体であるAmyloid Precursor Protein (APP) が $\beta$ および $\gamma$ -secretaseにより切断され生成する。A $\beta$  (図1、図2)は凝集、繊維化し加齢に伴って老人斑が生成する。凝集または繊維化したA $\beta$ による毒性発現で神経細胞が死滅すると考えられている。また、老人斑には酸化ストレスの発生も確認されている。

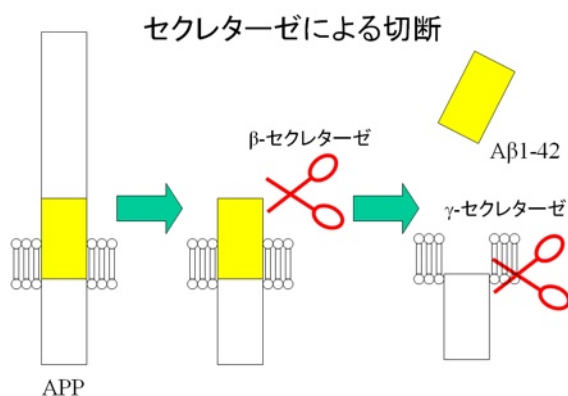


図1. APPより生成されるA $\beta$

老人斑より採取されたA $\beta$ でメチオニン残基 (Met35) の酸化が確認されている。脳内ではミクログリアがA $\beta$ を貪食し分解する事がわかってきた。また、ミクログリアに存在するmyeloperoxidase (MPO) により過酸化水素と周囲に存在する塩素イオンから次亜塩素酸が産生される。A $\beta$ は産生された次亜塩素酸により化学修飾を受けると考えられる。そこで今回2台の質量分析計 (MALDI/TOFおよびLC/MS/MS) を用いA $\beta$ と次亜塩素酸を反応させ修飾部位の決定および構造の変

化をそれぞれの装置で測定した結果と比較したので紹介する。

Asp- Ala- Glu- Phe- Arg- His- Asp- Ser- Gly- Tyr-  
Glu- Val- His- His- Gln- Lys- Leu- Val- Phe- Phe-  
Ala- Glu- Asp- Val- Gly- Ser- Asn- Lys- Gly- Ala-  
Ile- Ile- Gly- Leu- Met- Val- Gly- Gly- Val- Val-  
Ile- Ala

図2. A $\beta$ 1-42のアミノ酸配列

## 実験

A $\beta$  1-42は非常に取り扱いにくく、水に溶解しにくくすぐ重合してしまうため、LCカラムを詰まらせてしまう。そこで今回比較的に取扱が容易なA $\beta$  1-12およびA $\beta$  25-35を次亜塩素酸と反応させ質量分析を行った。

ペプチド研究所より入手したA $\beta$ を20mM酢酸アンモニウムpH7にて50 $\mu$ Mの濃度に調製し、A $\beta$ に対し5および10倍の濃度の次亜塩素酸ナトリウムを加え反応させた。これをそれぞれ0.1 $\mu$ LをnanoLC/MS/MSにて測定した。

## 装置

MALDI/TOFはブルカー・ダルトニクス REFLEX III、マトリックスはCHCAを用いた。

LC/MS/MSは日立ハイテクノロジーズ NanoFrontier eLD、キャピラリカラムはジーエルサイエンス MonoCapFastFlow、nanoESIエミタはジーエルサイエンス MonoSprayおよびNewObjective PicoTip SilicaTip 10 $\mu$ mを使用した。

## LC条件

移動相溶媒A : H<sub>2</sub>O/acetonitrile = 98/2 in 0.1% HCOOH、移動相溶媒B : H<sub>2</sub>O/acetonitrile = 2/98 in 0.1% HCOOH、流速200nL/min、B溶媒を0.0

分10 %から20.0分35 %の直線グラジエント。

## 質量分析

counter gas 0.5L/min、needle/spray potential 1600~2000V、ex potential 110V、AP1 TEMP 140°C、AP2 potential 40V、AP2 TEMP 140°CでMSおよびMS/MS（CIDあるいはECD）測定を行った。

## 結果

図3はMALDI/TOFで測定を行ったAβ 1-42で、1価および2価のピークが観測される。図4下段はAβ 1-42に次亜塩素酸を反応させたスペクトルで、Aβ 1-42が化学修飾され16Da増加したm/z 4528が認められる。

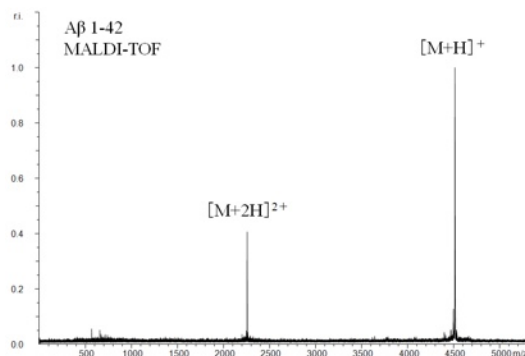


図3. Aβ1-42のMALDI/TOFスペクトル

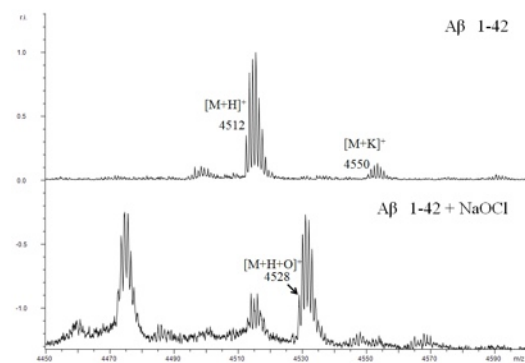


図4. Aβ1-42に次亜塩素酸を反応させたスペクトル。上段：Aβ1-42。下段：Aβ1-42を次亜塩素酸と反応。

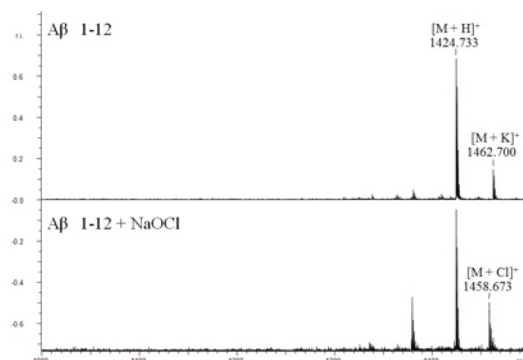


図5. Aβ1-12に次亜塩素酸を反応させたスペクトル。上段：Aβ1-12。下段：Aβ1-12を次亜塩素酸と反応。

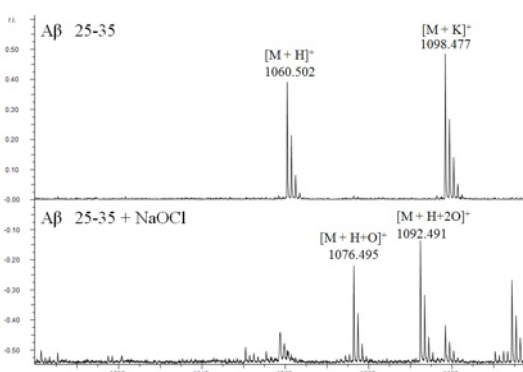


図6. Aβ25-35に次亜塩素酸を反応させたスペクトル。上段：Aβ25-35。下段：Aβ25-35を次亜塩素酸と反応。

Aβ 1-12（図5）の場合は $[M+H]^+$ のm/z 1424に対し34Da増加しm/z 1458にピークが見られる。図6はAβ 25-35に対して反応させ測定した結果で、 $[M+H]^+$ のm/z 1060に対し16Daおよび32Daシフトしたm/z 1076とm/z 1092にピークが見られる。

MALDI/TOFの結果より、Aβ 1-12は34Daの増加、Aβ 25-35は16Daおよび32Da増加が認められた。図2に示されるように、Aβ 1-12はN端から10番目の位置のTyrが存在するので、Tyrのハロゲン化（塩素化）が疑われる。また、Aβ 25-35は35番目のMetの酸化が考えられる。

LC/MS/MS測定を行うに際し、ターゲットをあらかじめ絞りMS/MS測定を行った。また、通常のCID測定の場合、付加した分子が外れる可能性が有るため、併せてECDによるMS/MS測定も行った。

Aβ 1-12では、ターゲットを3価のm/z 475.52およびm/z 486.84、Aβ 25-35ではターゲットを2価のm/z 530.78、m/z 538.72、m/z 546.78に固定した。

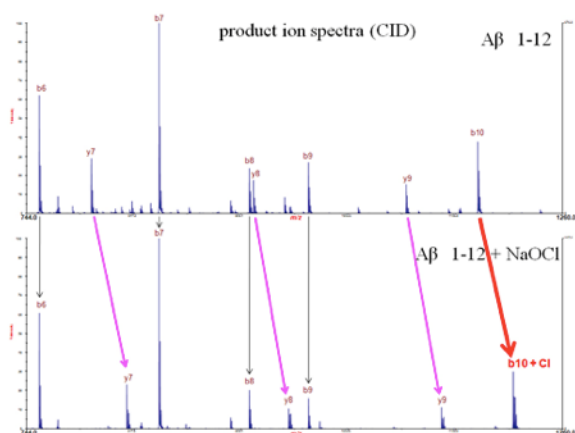


図7. Aβ1-12のCIDによるシフト位置の確認。上段：Aβ1-12。下段：Aβ1-12を次亜塩素酸と反応。

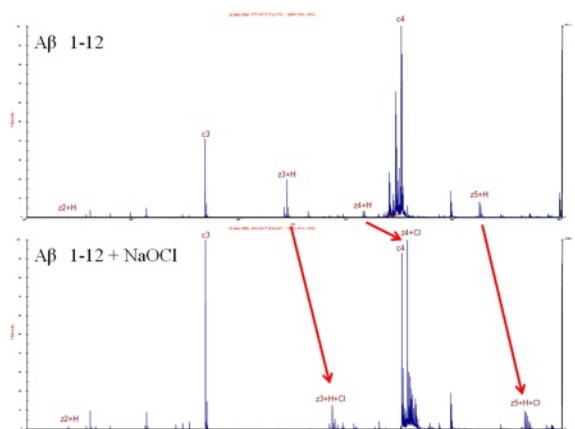


図8. Aβ1-12のECDによるC末側の確認。上段：Aβ1-12。下段：Aβ1-12を次亜塩素酸と反応。

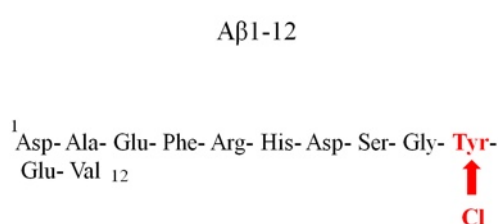


図9. 塩素化されたTyrの位置

Aβ 1-12のMS/MS測定を行ったところ、予想通り10番目のTyrに34Da増加しているのが観測された。また、各フラグメントを確認すると、塩素特有の同位体ピークが確認され、水素が引き抜かれた後に塩素が入った事が確認された。

図7はCIDスペクトルで、上段がコントロール、下段が次亜塩素酸と反応させた後のスペクトルで、b系列のイオンを確認するとb9まではコントロールと同一であるが、b10では34Da増加した位置にシ

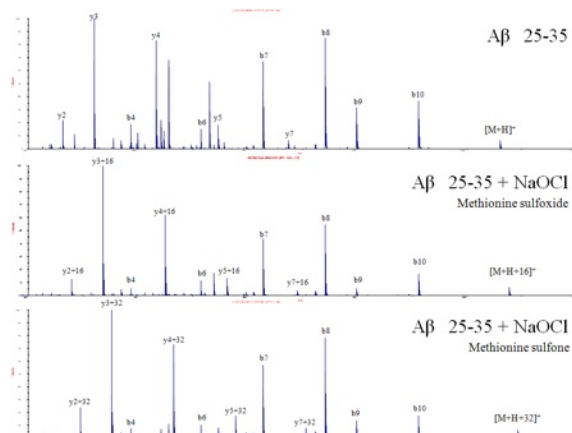


図10. Aβ25-35のCIDスペクトル。

上段：Aβ25-35。中段：Aβ25-35を次亜塩素酸と反応（m/z 538.72）。下段：Aβ25-35を次亜塩素酸と反応（m/z 546.78）。

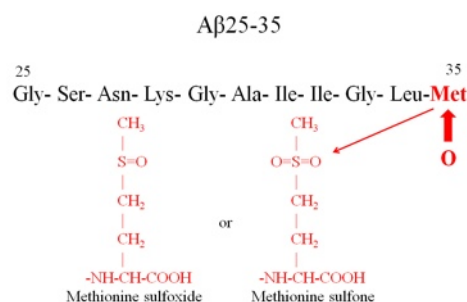


図11. 酸化されたMetの構造

フトし、10番目のTyrにClが付加した事が確認できる。C末側はECDのz系列でz3以降34Daシフトしている事が確認できた（図8）。

Aβ 25-35の16Daおよび32DaシフトしたピークをそれぞれCIDおよびECD測定しMetに酸素が1個および2個入っている事を確認した。図10のスペクトルを見るとMetはC末端にあるため、b10までは変化が無く[M+H]<sup>+</sup>に相当するピークがそれぞれ16Daおよび32Daシフトしている。y系列はy1が観測できていないが、観測されているy2以降全て16Daおよび32Daシフトしているか確認できた。併せてECDスペクトルもCIDと全く同様の結果が得られている。

16Daの増加はMetのイオウに酸素が1個付加したMethionine sulfoxide、32DaのシフトはMetのイオウに酸素が2個付加したMethionine sulfoneと推定される。

## まとめ

MALDI/TOFとLC/MS/MSの測定結果を比較すると、いずれのシングルMS測定では同様の結果が得られた。更にシングルのMS測定で推定した構造をMS/MS測定で確定する事ができた。MALDI/TOFで

測定したA $\beta$  1-42の16Daシフトした生成物は、これらの結果よりMet35が酸化されたと推定できる。今後LC条件等を検討しA $\beta$  1-42では観測されていないハロゲン化をLC/MS/MSを用いた測定で確認したいと思う。また、他のハロゲン種を用いた同様の反応結果についても同様に継続して測定して行きたいと思っている。