

A205

リポソーム膜上におけるアミロイドの二次核化現象の解析

(阪大院基工) (正)島内 寿徳・○(学)北浦 奈知・(学)嶋内 直哉・

(正)馬越 大・(正)久保井 亮一*

Alzheimer 病(AD)や狂牛病など膜関連疾病はタンパク質の構造異常化によって誘導されると考えられている。AD 患者の脳内には老人斑が沈着しており、アミロイド β タンパク質(A β)からなるスフェルライト(星状凝集体)様構造と推定されている。近年、酸化脂質の核形成促進効果¹⁾や負電荷を有するポリマーを一様に修飾した基板上でのスフェルライト形成²⁾が報告されており、モデル生体膜による凝集体態(多形性)の制御の可能性が指摘されている。また、アミロイド形成過程では一次核化が生じるが、それに伴う二次核化現象についてはまだ議論されていない。そこで、本研究では二次核化現象の解析を行い、アミロイド形成およびその多形性に対する二次核化現象の効果について検討した。

【実験】

1. リポソームの調製方法 中性脂質として 1,2-Ditetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(DMPE), 負電荷脂質として 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-[phosphorac-(1-glycerol)](DMPG), 1,2-Ditetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DMPA)をそれぞれ 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(SAPC)を酸化させたもの(SAPCox)と種々の割合で混ぜ、脂質薄膜を作製し、適当な溶媒で水和させた後、凍結/融解(5cycle)と extrusion 法により粒径 100nm のリポソームを得た。

2. アミロイド形成の速度論的検討 40 残基の A β (1-40) モノマー(5 μ M)とリポソーム(脂質濃度 250 μ M) の混合溶液を調製し、アミロイド生成量の指標である Thioflavin T(ThT)蛍光強度(Ex = 444nm, Em = 485nm)の経時変化を測定した。

3. アミロイド線維凝集体の観察^{3,4)} 全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)を用いてサンプルを観察した。2 と同様の条件で調製した溶液を 37°C, 48h インキュベーションしたサンプルに ThT を加え、全反射条件にて観察した。

【結果及び考察】

1. アミロイド形成の速度論的検討 各種リポソーム共存下における各伸長過程をモニタリングした(Fig.1(a))。その結果、アミロイド形成過程が核形成段階と線維伸長段階を経て進行することが分かった。ここで、酸化脂質(SAPCox)含有/非含有リポソームを比較すると、前者では核形成が速やかに進行した(t_{lag} ~6h)。さらに、TIRFM の観察では細かい線維が多数見られた(data not shown)。これは、線維形成過程で線維の断片化(二次核化)に起因するものと考えられる。以下では、二次核化過程の評価を行った。

2. アミロイド形成における二次核化と多形性の関係

各種リポソーム共存条件において線維を TIRFM 観察した。A β 線維の線維長分布を解析し、二次核化速度 B [$\#m^{-3}s^{-1}$] を求めた。得られた B と(一次)核形成時間 t_{lag} を比較すると、 t_{lag} が短い脂質ほど二次核化速度 B が増加する傾向が見られた(Fig.1(b))。さらに、酸化脂質を含む系(L7 など)では B が増加し、さらに、スフェルライトに近い構造を取ることが観察された。以上の知見より、迅速に一次核化を誘導する脂質膜界面は、二次核化を速やかに誘導するのに適していると考えられる。二次核化により得られた短いアミロイド断片は脂質膜との相互作用などにより、スフェルライトに成長するのに適した断片間の会合⁴⁾が誘導されると推察される。

以上の結果より、二次核化速度 B についての議論を深めることで、生体内における老人斑形成挙動やその制御に対する理解につながると期待される。

【引用文献】

- 1) J.Bieschke *et al.*, *Biochemistry*, **44**, 4977-4983(2005)
- 2) Ban *et al.*, *J.Biol.Chem.*, **281**, 33677-33688 (2006)
- 3) H.T.Vu *et al.*, *J.Biosci.Bioeng.*, in press (2010)
- 4) T.Shimanouchi *et al.*, *Solv.Extr.Res.Dev.Japan*, submitted (2010)

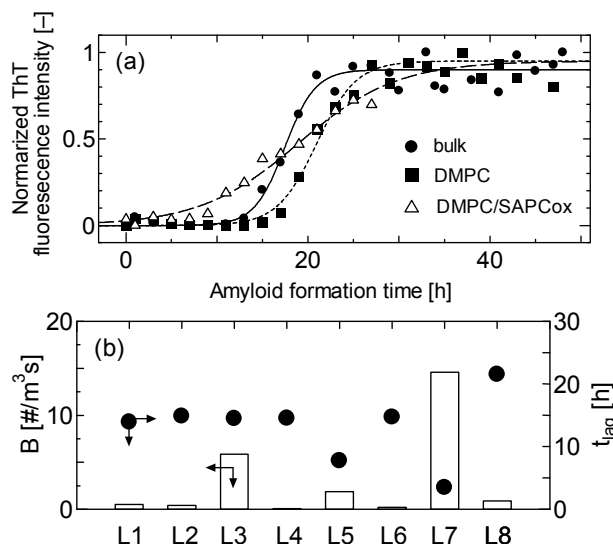


Fig.1(a) ThT fluorescence intensity in the presence of liposomes. **(b)** The comparison of first nucleating time and second nucleating rate A β (1-40)monomer:5 μ M, liposome:250 μ M, 37°C, L1: no liposome, L2: DMPE, L3: DMPG, L4: DMPA, L5: DMPC/SAPCox, L6: DMPE/SAPCox L7: DMPG/SAPCox, L8: DMPA/SAPCox

*E-mail: MSB@cheng.es.osaka-u.ac.jp

TEL & FAX: 06-6850-6286