

## A206

## アミロイド性タンパク質の生体膜晶析：線維伸長速度の解析

(大阪大院・基礎工) ○(正)島内 寿徳, (学) 嶋内 直哉, (学) 大西 諒,  
(正)馬越 大, (正)久保井亮一\*

構造異常性疾患 (conformational disease) である Alzheimer 症 (AD) は、タンパク質 Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) が高毒性なアミロイド線維 (フィブリル) へと構造変化し、細胞に蓄積することが原因とされる。生体内では、生体膜が様々な機能発現の基盤となり、不均一な相分離構造 (ドメイン) や酸化劣化による損傷を受けた部位が特徴的なアミロイド形成反応を引き起こしている可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。しかし、生体膜によるアミロイド形成の制御機構についてはほとんど知見がないのが現状である。本研究では、従来の晶析理論と対比させて、 $A\beta$  のアミロイド形成過程に及ぼす生体膜界面の効果 (生体膜晶析と呼ぶこととする) を検討する。モデル生体膜であるリポソームを利用し、線維伸長過程に対するリポソームの影響を評価した。

## 【実験】

**1. 各種脂質膜 (リポソーム) の調製** 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), などの数種類の中性リン脂質, Sphingomyeline (SM), コレステロール (Chol), 脂肪酸 (例えば Stearic acid: SA) を主な成分とし、所定の組成で混合して各種リポソームを調製した。所定の組成から成る脂質薄膜を緩衝液で水和し、凍結融解によりリポソームを調製し、Extrusion 法により粒径を 100nm に調整した。

**2. ThT 蛍光分析によるアミロイド形成挙動の評価** NaCl 100mM, 37°C, pH7.4 の条件下で各種リポソームを添加,  $A\beta$  (1-40) モノマー (5 $\mu$ M) をインキュベーションし、線維検出プローブである Thioflavin-T (ThT) の蛍光強度 ( $E_x=444$ nm,  $E_m=485$ nm) の経時変化を測定した。

**3. 表面特性の解析**  $A\beta$  (1-40) モノマーや線維、およびその seeds の局所的疎水性 ( $LH_{pr}$ ) については水性二相分配法により求めた<sup>2)</sup>。

## 【結果および考察】

**1. seeds を用いた線維伸長速度の解析**  $A\beta$  のアミロイドを超音波破碎すると約 100nm 程度の長さの短い線維 (seeds) を得ることができる。Seeds に  $A\beta$  (1-40) モノマーを添加して、ThT で染色し、その伸長過程を全反射蛍光顕微鏡で可視化すると、1 時間程度で概ね 15 mm 程度まで伸長する様子が観察された (Fig.1(a))。線維長  $L$  の時間変化  $G = dL/dt$  [nm/min] を画像解析から求めると、約 15 nm/min であった。これは線維長  $L$  によらないので (Fig.1(b))、線維はある決まった規則的構造を持ち、特定の方向に伸長する線維伸長様式であることを示唆している。

表面特性解析の結果、Seeds はモノマーと比べて非常に高い局所的疎水性を持つ構造であることが分かった<sup>2)</sup> ので、Seeds どうしの会合が予想された。高濃度の seeds を用いた伸長実験では、seeds の会合体が確認され、それを出発点とする放射状の線維伸長が観察された<sup>2)</sup>。放射状線維を構成する線維ごとの  $dL/dt$  を計測した結果、ほぼ同じ値を示すことから、伸長速度はアミロイドの形態よりも seeds の構造に依存することが示唆される。

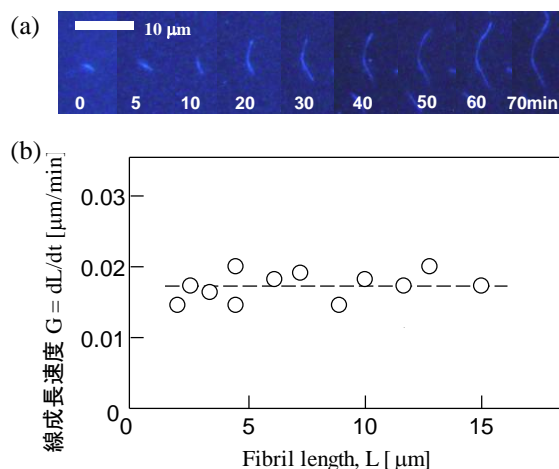
**2. 線維伸長過程に対するリポソームの共存効果**

高い疎水性を有する Seeds はリポソーム膜との相互作用が予想される。そこで、seeds と DMPC などの中性リポソームとを共存させたときの  $dL/dt$  も検討したが、ほぼ  $L$  に依存しなかった。Seeds と各種リポソームを共存させ、 $A\beta$  (1-40) モノマー (5 $\mu$ M) を添加して伸長過程をモニタリングし、伸長速度係数  $k_{el}$  を評価した。ほぼ 0.8 ~ 1.1 h<sup>-1</sup> 程度の伸長速度を示した。この値は bulk 系とほぼ同じ値<sup>3)</sup> である。したがって、リポソームの共存効果ならびに脂質組成の効果は認められなかった。しかし、 $A\beta$  (1-40) モノマー (5 $\mu$ M) とリポソームを共存させ、自発的に線維形成を誘導した場合、 $k_{el}$  は脂質組成によって大きく変化した。これは、リポソームにより誘導される核の構造が異なることに起因すると考えられる。

以上の検討から、線維伸長は形成する核の構造に依存し、その形成過程がリポソーム膜特性に影響されることが示唆された。

**References**

- 1) V.Koppaka *et al.*, *J.Biol.Chem.*, **278**, 36277-36284 (2003), 2) T.Shimanouchi *et al.*, *Solv.Extr.Res.Dev., Japan*, submitted (2010), 3) H.T.Vu, T.shimanouchi *et al.*, *J.biosci.Bioeng.*, in press (2010)



**Fig.1** (a) Time-lapse image of fibril growth from its seeds with a total internal reflection fluorescence microscopy combining with ThT. (b) Length dependency of growth rate of fibrils.

E-mail: msb@cheng.es.osaka-u.ac.jp  
TEL/FAX: +81-(0)6-6850-6285