

D204 脂質膜上におけるカテコール類によるアミロイド可溶化のカイネティクス解析 (大阪大院・基礎工) (学)Huong Thi Vu, ○(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- β ($A\beta$) 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。したがって、アミロイドの可溶化は治療戦略として期待されている。現在、カテコール類などの一部の物質がアミロイド形成の阻害効果や可溶化能を有していることが報告されている¹⁾。生体系ではアミロイドは神経細胞膜上に沈着しており、アミロイド可溶化に生体膜の影響があることは否定できない。本研究では、モデル生体膜としてリポソームを用い、カテコール類によるアミロイド可溶化に及ぼすリポソームの影響を速度論的に解析した。

【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 (Fig.1(d) の脚注)。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. アミロイド可溶化実験 NaCl 100mM, 37°C, pH7.4 の条件下で各種リポソームと $A\beta$ (1-40) 線維 (10 μ M) とを十分混合させた後、カテコール類を添加し、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。
【結果および考察】

1. カテコール類によるアミロイド可溶化 カテコール類によるアミロイド可溶化実験により、ドーパミン (DA) が最も高い可溶化速度を示したので、DA を用いて検討した。リポソームを共存させると、明らかな ThT の相対蛍光強度の減少が観察され (Fig.1(a))、リポソームが可溶化に影響することが示唆された。次に、DA によるアミロイド可溶化の微視的特徴を TEM 観察により検討した。DA のみでの可溶化では、アミロイドは概ね 60~80nm 程度の長さの線維に断片化された (Fig.1(b))。可溶化は微視的にはランダムな位置での断片化であると考えられる。これは ThT の急速な減少とも対応する。さらにリポソーム共存下では、長さが 40nm 程度の短い線維が得られた (Fig.1(c), ▲は断片化の位置)。超音波破碎では高々 100nm 程度の断片化であるので²⁾、DA による可溶化の有効性を示している。可溶化 (断片化) はリポソーム (L1 や L2) の膜上で起こっていることが認めら

れ (Fig.1(c))、可溶化に対するリポソーム膜特性の影響が予想される。

2. アミロイド可溶化過程に及ぼすリポソーム膜の影響

Fig.1(a) のアミロイド残存量 (相対 ThT 蛍光強度) を一次速度論的に解析することで、みかけの可溶化速度係数 k_d [s^{-1}] を得る (Fig.1(d))。リポソーム非共存下では $k_d \sim 50 \times 10^{-5} s^{-1}$ であるが、DMPC などの単一脂質組成のリポソーム (no.5,7) による顕著な k_d 増大は見られなかった。DMPC/SA リポソームなどのドメイン性リポソーム (no.2,3,4,6,7,8) 共存下では、 k_d が増大した。さらに酸化劣化脂質 (SAPCox) を導入すると k_d は顕著に増大し (no.9)、酸化劣化リポソーム中の DMPC (中性) を負電荷脂質 DMPG に置換すると、さらに k_d は大きく増大した (no.10, $\sim 160 \times 10^{-5} s^{-1}$)。

ゆえに、脂質膜上のアミロイド可溶化現象は、ドメイン相分離性/酸化脂質/負電荷脂質に依存することが示唆され、アミロイドの可溶化が膜特性によって制御できる可能性を示唆している。

References

- 1) H.T.Vu, T.Shimanouchi *et al.*, *J.biosci.Bioeng.*, in press (2010), 2) T.Shimanouchi *et al.*, *Solv.Extr.Res.Dev.,Japan*, submitted (2010)

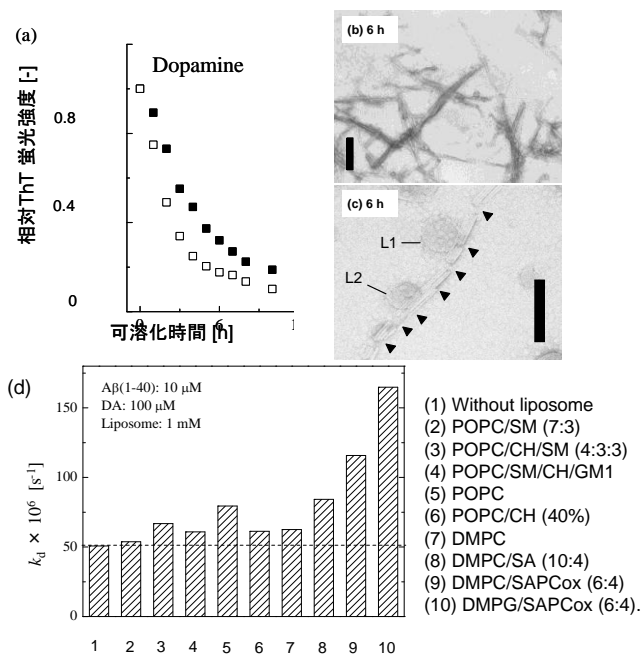


Fig.1 (a) Time-course of ThT fluorescence intensity in the presence and the absence of DMPC/SA (10/4 molar ratio) liposomes. (b) TEM image of disaggregated fibrils by DA for 6 h. (c) Disaggregated fibrils in the presence of DMPC/SA liposomes (L1 and L2), (d) The effect of liposome against the disaggregation rate constant, k_d . Bar: 200 nm.

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