

D205 酸化劣化脂質膜上におけるアミロイドβタンパク質の生体膜晶析：銅イオンの効果

(阪大院基工) (正)島内 寿徳・○(学)大西 諒・(学)嶋内 直哉・(正)馬越 大・(正)久保井 亮一*

Alzheimer 病(AD)や狂牛病などの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(Aβ)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的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形態(多形性)の制御の可能性が指摘されている。また、老人斑には銅イオンが含まれているが、生体膜上におけるアミロイド形成過程に対する銅イオンの効果はまだ議論されていない。そこで本研究では、酸化脂質と負電荷脂質の混合系を用いて、モデル生体膜共存系でのAβアミロイド形成に対する銅イオンの添加効果について検討した。

【実験】

1. リポソームの調製方法 負電荷脂質として 1,2-Dimirystoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)](DMPG)、中性脂質として 1,2-Dimirystoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(DMPC)をそれぞれ 1-stearoyl-2-arachido-nyl-*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(Scycle)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 リポソーム(脂質濃度 250μM)と種々の濃度の CuCl₂(0, 2.5, 5, 7.5, 10 μM)を 24h プレインキュベーションした後、40 残基の Aβ(1-40)モノマー(5μM)を加え混合溶液を調製し、37°C の条件で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)} 2と同様の条件で調製した溶液(但し Aβ濃度:50μM)を 37°C, 48h インキュベーションしたものに当量のクロロホルムを添加してリポソームを除去し、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)を用いて観察した。

【結果及び考察】

1. アミロイド形成の速度論的検討 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)。リポソーム非共存系(no liposome)では 14 時間程度の核形成の後、線維伸長過程が見られた。一方、銅のみの系では線維伸長は見られなかった(data not shown)。DMPG/SAPCox(負電荷/酸化リポソーム)共存系では核形成過程が短く、線維伸長も遅い為、伸長に不利な核発生が促進されている事が示唆された。さらに銅イオンを共存させた系でも DMPG/SAPCox 共存系と類似の挙動が示された。

2. アミロイド線維凝集体の多形性 リポソーム非共存系では fibril 状の凝集体が観察された (Fig.2(a))一方、DMPG/SAPCox 共存系ではスフェルライト様凝集体が観察された(Fig.2(b))。これが球状であることを偏光顕微鏡でも確認した(Fig.2(b)内挿図)。DMPC/SAPCox (酸化/中性リポソーム)共存系では fibril 状の凝集体が観察された事(data not shown)から、酸化/負電荷脂質膜はスフェルライト誘導能を有していることが示唆された。さらに、DMPG/SAPCox / 銅イオン共存系において、線維長さの短いアミロイドが観察された(Fig.2(c))。脂質膜に配向している銅イオンが活性酸素種(ROS)を生成し、脂質膜上で生成するアミロイドの二次核化を誘導した結果、短い線維断片を生成した可能性が示唆される。生体膜晶析の観点からのより詳細な検討により、生体系に近い条件での老人斑形成機構の理解が進むものと期待される。

【引用文献】

- 1) J.Bieschke *et al.*, *Biochemistry*, **44**, 4977-4983(2005)
- 2) Ban *et al.*, *J.Biol.Chem.*, **281**, 33677-3368 (2006)
- 3) H.T.Vu *et al.*, *J.Biosci.Bioeng.*, in press (2010)
- 4) T.Shimanouchi *et al.*, *Solv.Expr.Res.Dev.Japan*, submitted (2010)

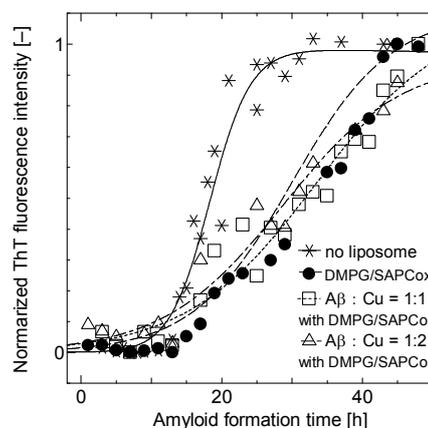


Fig.1 The effect of copper ion against the time-course of ThT fluorescence intensity in the presence of liposomes. Aβ(1-40)monomer:5μM, liposome:250μM, 37°C

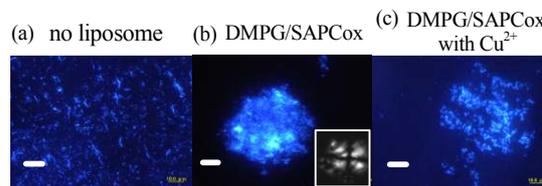


Fig.2 TIRFM images on morphologies of Aβ aggregate: (a) no liposome, (b)DMPG/SAPCox(6/4),(c) DMPG/SAPCox(6/4) with Cu²⁺. Aβ(1-40): 5μM, Cu²⁺: 10μM, liposome: 250μM, bar scale is 10μm.

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

TEL & FAX:06-6850-6286