

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18860

研究課題名(和文) 脂質ナノ粒子を用いたアミロイド 自己会合の制御による凝集機構の解明

研究課題名(英文) Aggregation of amyloid-beta protein on size-controlled lipid nanoparticles

研究代表者

池田 恵介 (Ikeda, Keisuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：00553281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病アミロイド タンパク質が脂質膜に結合し、凝集・毒性体形成を起す過程において、初期会合体の形成はターニングポイントである。しかし、初期会合体の詳細な構造と凝集における機能は明らかでない。そこで、脂質ナノ粒子上にアミロイド を隔離することで、凝集初期の自己会合状態を制御し、会合体を解析することを試みた。その結果、調製したナノ粒子の脂質二重層の直径によって結合したアミロイド の構造および凝集能が変化することが明らかとなり、ナノ粒子上に凝集中間体を捕捉できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Conversion of amyloid- (A protein from a non-toxic monomer into the toxic aggregates is the possible pathogenic pathways in Alzheimer's disease. Recent studies have suggested that lipid membranes play key roles in protein aggregation. However, the binding modes and the mechanisms of A aggregation on lipid vesicles are not fully understood. Here, we prepared a size-controlled lipid nanoparticles in order to control the number of A molecules on the lipid bilayer surfaces of the particles. We have found that the secondary structure and the aggregation propensity of A depended on the size of nanoparticles, suggesting the formation of intermediate species in the aggregation pathway.

研究分野：生物物理化学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 脂質膜 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、進行性の神経変性疾患であり、その病理学的特徴は、患者脳内に蓄積する老人斑と神経原線維変化である。アミロイドタンパク質(A β)は、老人斑の主要構成成分である。A β の単量体は毒性を示さず、抗酸化作用と、神経保護作用を持つ。毒性を持たない可溶性のA β は決まった構造を持たないが、 β -シート構造を形成してオリゴマーやアミロイド線維などの凝集物へと変換することで細胞毒性を発揮することが、AD発症の重要な段階であると考えられている。近年の研究で、A β の構造変化・凝集に生体膜を構成している脂質二重膜が関与する可能性が指摘されている。加えて、脂質膜存在下で形成されたA β 凝集体が神経モデル細胞に対して高い毒性を示すことも報告されている。しかし、脂質膜上で形成されるA β の凝集核やオリゴマーは一過性の中間体であるため、その性質を詳細に比べることは困難である。

2. 研究の目的

本研究では、A β -脂質膜間相互作用の詳細を明らかにするとともに、膜上に形成されるA β 複合体の構造、凝集における役割を解明することを目的として研究をおこなった。自己重合性両親媒性ペプチドとリン脂質膜からなる脂質ナノ粒子(ナノディスク)を利用する。粒子径の異なるナノディスクを用いることで、結合したA β の分子数を制御することで、凝集中間体を安定化した上で解析できると仮説を立てた。

3. 研究の方法

(1) ペプチド溶液作製

40残基からなるA β -(1-40)およびA β 変異体はFmocペプチド固相合成法により合成し、逆相HPLCで精製した。精製ペプチドは、氷上で0.02% NH₃ aqに溶かした。凝集核を取り除くために、ポリカーボネートチューブ(4mm)に入れて、卓上超遠心機Optima TLXにより、527 000 g、3時間、4℃の条件で遠心し、上清を分注した。液体窒素で凍らせ、実験で使用するまで-80℃で保存した。上清の濃度はMicro BCAタンパク質分析により決定した。

ナノディスク形成に用いるペプチドとして、自己重合性両親媒性ペプチドASPP1をFmoc固相合成法により合成した。逆相HPLCによる精製後、ペプチド凍結乾燥粉末を1mM塩酸に溶解した。

(2) 脂質膜調製

脂質はメタノール:クロロホルム(体積比=1:2)に溶解し、溶液をナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧留去し、フラスコ底部ガラス壁面に脂質薄膜を形成した。その後、一晚の真空乾燥にて完全に溶媒を除去した。脂質薄膜に1mM

EDTAを含む20mMのMOPS緩衝液を加え、vortexをすることで脂質を水和させた後、凍結融解を5サイクル行った。その脂質懸濁液を孔径100nmのポリカーボネートメンブレンフィルターを用いたエクストルージョン法によって、平面膜のモデルである粒径約100nmのlarge unilamellar vesicle(LUV)を調製した。脂質ベシクルの直径は動的光散乱法(FRAP-1000、大塚電子)によって確認した。また、脂質濃度は、リン酸モリブデン法により定量した。

(4) 円偏光二色性スペクトル測定

測定には円二色性分光計J-805(日本分光)を用いた。光路長5mm、195-250nmの範囲で測定した。測定前に5分間セルを静置した。8回測定した平均値から、サンプルと同濃度のベシクルまたはナノディスク溶液のブランクを差し引いた値を測定値として使用した。

(5) チオフラビン-T(ThT)アッセイ

A β -(1-40)の濃度が15 μ Mとなるようにベシクルまたはナノディスクと混合した溶液を調製し、静置条件下37℃でインキュベーションした。インキュベーション時間0、3日の溶液を一部取り出し、その溶液と5mM ThT溶液を50mMグリシンバッファー(pH 8.5)で希釈することで、四面透過石英セルに全量2mL、A β 濃度0.5 μ M、Th-T濃度5 μ Mとなる溶液を調製した。スリット幅 励起2.5nm、蛍光5.0nm、励起波長446nm、蛍光波長490nm、フォトマル電圧700V、恒温槽25℃の条件で、F-4500蛍光分光光度計(HITACHI)により60秒間蛍光強度を測定し、強度の平均値を得た。

(6) 透過型電子顕微鏡観察(TEM)

試料を、2%リンタングステン酸でネガティブ染色し、透過電子顕微鏡(JEM-1400TC、JEOL)で観察した。

4. 研究成果

(1) A β と脂質膜間の結合の評価

A β と脂質膜間の結合を確認するために、CDスペクトルを測定した。電気的中性のリン脂質POPCと陰イオン性のPOPGを用いてLUVを作成した。また、pHは6.0とした。CDスペクトルより、POPG存在下では218nmに極小値を示すスペクトルが得られ、A β が β -シート構造を形成することが示唆された。一方、POPC存在下または脂質ベシクル非存在下ではランダムコイル構造に特徴的なスペクトルを示した。以上の結果からA β はPOPG膜と静電相互作用により結合し、 β -シート構造を持つ会合体を形成することが確認された。

(2) ナノディスク形成の評価

膜上A β の会合状態を制御するために用いる、ASPP1-POPGナノディスクを作成した。

ASPP1 は POPC LUV と混合することでナノディスクを形成し、混合する脂質/ペプチドモル比を調節することでそのサイズ(脂質二重層の直径)を制御できる。そこで、POPG に対しても同様にナノディスクを形成するか光散乱強度測定、動的散乱(DLS)測定と CD 測定より確認した。ASPP1 の添加より、POPG ベシクル可溶化による散乱光強度の減少が 1 日後まで観察された。また DLS 測定により、液体力学的直径が約 10nm の粒子の形成が確認された。加えて、CD スペクトルより、脂質存在下では 208, 222 nm の負の楕円率が増大し、 α -ヘリックス含量の増大が示された。これらの結果より、ASPP1 は POPC だけでなく POPG とナノディスク形成が可能であることが示された。一方、コール酸透析法により両親媒性 α -ヘリックスタンパク質である apoA-I と POPG からなるナノディスクの作成を試みたところ、巨視的な凝集物が生じた。このことから、安定な POPG ナノディスクを作成するには、ASPP1 がより適していると示唆された。次に、ASPP1-POPG ナノディスクのサイズ評価を行った。リン脂質と ASPP1 を脂質/ペプチドモル比 2 で混合することで粒子径の小さなナノディスクを作成し、脂質/ペプチドモル比 16 で大きなナノディスクを作成した。透析処理後の脂質/ペプチドモル比はそれぞれ 3.4 および 15.2 と見積もられた。TEM より、小さなナノディスク (20.6 ± 3.3 nm) と大きなナノディスク (30.0 ± 4.1 nm) のどちらの粒子も単峰性の粒径分布が得られた。また、POPG ナノディスクは TEM 画像でスタック像が観察されなかった。これは、POPG 脂質頭部間の負電荷の静電反発によるものと考えられる。

(3) 脂質膜存在下におけるアミロイド線維形成

アミロイド線維の形成を、アミロイド線維に選択的に結合し蛍光強度の上昇を示す色素である Th-T を用いて評価した[54]。A とサイズの大小異なる 2 つの ASPP1-POPG ナノディスクまたは LUV と 37 でインキュベーションした時の Th-T 蛍光強度を測定した。小さなナノディスク共存下では、蛍光強度上昇が 1 日でほぼプラトーに達しており、A の線維形成が著しく促進されていることが確認された。一方、大きなナノディスクまたは LUV 共存下では、ほとんど線維形成が進行していないことが確認された。小さなナノディスクの二重膜上で凝集活性の高い A の会合状態が生じている可能性が示唆された。しかし、A の凝集活性がナノディスクの縁に存在している ASPP1 に影響を受けている可能性も考えられる。そこで、A を小さな POPG ナノディスクまたは小さな POPC ナノディスクと共存させ、Th-T 蛍光強度の時間変化を測定した。小さな POPC ナノディスク共存下の強度変化は脂質非存在下の強度変化と同等であり、ナノディスクの縁にある ASPP1 は A

凝集に寄与しないことが示唆された。また、小さな POPG ナノディスク共存下では線維形成がすぐに始まることが観察された。以上のことから A の線維形成は膜結合および二重層のサイズによって大きく制御されることが分かった。

(4) ナノディスク上の A 二次構造変化
ナノディスク膜上の A 会合体の二次構造を評価するため、CD スペクトルを測定した。この際、ASPP1 由来のシグナルが測定を妨害することが考えられたため、D アミノ酸由来の ASPP1 (D-ASPP1) を作成し、ナノディスクを POPG と形成した。D-ASPP1 ナノディスクと L-ASPP1 ナノディスクを等量混合することで、ナノディスク由来の CD シグナルを消去することに成功した。大きな POPG ナノディスク並びに POPG LUV 上では A は β -シート構造を示した。また、小さなナノディスク上でも短波長側におけるノイズは大きいものの LUV、大きなナノディスク存在下とスペクトルに有意な違いが見られなかったことから、A の二次構造に大きな違いはないことが示唆された。この結果から膜上 A はナノディスクのサイズに依らず、二次構造レベルでは同様の会合状態を取っていることが考えられる。A を小さいナノディスク上に捕獲することで、その会合物は準安定な会合体となり、凝集活性が高くなっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Takaoka R, Kurosaki, H, Nakao H, Ikeda K, Nakano M. (2017) Formation of Asymmetric Vesicles via Phospholipase D-mediated Transphosphatidylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1860, 245-249. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.10.011

Ikeda K, Horiuchi A, Egawa A, Tamaki H, Fujiwara T, Nakano M. (2017) Nanodisc-to-Nanofiber Transition of Noncovalent Peptide - Phospholipid Assemblies. *ACS Omega*, 2, 2935-2944. 査読有
DOI: 10.1021/acsomega.7b00424

Ikeda K, Nakano M. (2016) Energetics of the Mixing of Phospholipids in Bilayers Determined Using Vesicle Solubilization. *Langmuir*, 32, 13270-13275. 査読有
DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03333

Sugiura T, Ikeda K, Nakano M. (2016) Kinetic Analysis of the Methyl-

-cyclodextrin-Mediated Intervesicular Transfer of Pyrene-Labeled Phospholipids. *Langmuir*, 32, 13697-13705. 査読有
DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03515

Kondo H, Ikeda K, Nakano M. (2016) Formation of Size-Controlled, Denaturation-Resistant Lipid Nanodiscs by an Amphiphilic Self-Polymerizing Peptide. *Colloid Surf. B: Biointerfaces*, 146, 423-430. 査読有
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.040

Nakao H, Ikeda K, Ishihama Y, Nakano M. (2016) Membrane-Spanning Sequences in Endoplasmic Reticulum Proteins Promote Phospholipid Flip-flop. *Biophys. J.*, 110, 2689-2697. 査読有
DOI: 10.1016/j.bpj.2016.05.023

〔学会発表〕(計 7 件)

堀内 彩萌, 池田 恵介, 中野 実. ナノファイバー状リン脂質-ペプチド集合体形成因子の解明と形態制御法の開発. 日本膜学会第 39 年会; 2017 May 26-27; 東京.

池田 恵介, 中野 実. ベシクル可溶化法によるリン脂質 - リン脂質間相互作用熱力学量の測定. 第 55 回日本生物物理学会年会; 2017 Sep 19-21; 熊本.

内田 裕樹, 池田 恵介, 中野 実. 蛍光ラベルペプチドを用いたアミロイド線維形成とペプチド間相互作用の評価. 日本薬学会北陸支部第 129 回例会; 2017 Nov 26; 金沢.

Sugiura Y, Ikeda K, Nakano M. Effects of lipid membrane curvatures on binding, secondary structure, and aggregation of amyloid- protein. The 60th Biophysical Society Annual Meeting; 2016 Feb 27-Mar 2; Los Angeles.

池田 恵介, 中野 実. ナノディスク・ナノファイバー構造を有する脂質 ペプチド集合体の創製と形態制御. 日本膜学会第 38 年会; 2016 May 10-11; 東京.

池田 恵介, 中野 実. 脂質 ペプチド集合体のディスク・ファイバー構造間転移の制御. 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会; 2016 Sep 22-24; 旭川.

近藤 弘章, 池田 恵介, 中野 実. 安定かつサイズ制御可能な脂質ナノディスクの開発とアミロイド 脂質間相互作用解析への応用. 第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム; 2016 Nov 17-18; 名古屋.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 恵介 (IKEDA, Keisuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・准教授

研究者番号: 00553281