

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19590033	
研究課題名（和文）	新しいイメージング手法による細胞内タンパク質構造の解析
研究課題名（英文）	Structural analysis of proteins in living cells by using a novel imaging technique
研究代表者	三浦 隆史（MIURA TAKASHI） 東北大学・大学院薬学研究科・准教授 研究者番号 30222318

研究成果の概要：アミロイド線維に対して高い親和性を持つアゾ色素であるコンゴレッドの共鳴ラマン散乱を用いて、タンパク質が細胞に結合している状態でアミロイド線維に変化する過程を追跡することが可能な新規手法を開発した。本手法を用いることにより、1 個の細胞の膜表面でのアミロイド形成を観察することが初めて可能となった。アルツハイマー病などの発症メカニズム解明のために、本手法は有用かつユニークな情報を与えると期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：イメージング、ラマン分光法、細胞、タンパク質、アミロイド、アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、脳内においてタンパク質が本来の構造とは異なる  $\beta$  シート構造に富む異常タンパク質に転移することにより引き起こされる神経変性疾患である。近年の研究により示された、(1) 細胞膜のカベオラと呼ばれる領域（ラフトの一種と考えられるミクロドメイン）にプリオンタンパク質が局在していること、および (2) 細胞膜のモデルであるリポソ-

ムがプリオンタンパク質の  $\beta$  シートに富む構造への転移を促進すること、の 2 点を主な根拠として、タンパク質の病原型への構造転移は細胞膜上の特定部位で進行すると考えられている。アルツハイマー病を引き起こすアミロイド  $\beta$  についても同様の知見が得られており、細胞膜がタンパク質の構造に与える影響を詳細に探ることは、神経変性疾患の発症機構解

明への鍵になると考えられる。

近年、格段の進歩を遂げている、蛍光プローブなどを用いたバイオイメーシング技術は、タンパク質や金属イオンなどの細胞における分布や動態を解析するための強力な道具になりつつあり、上記(1)の根拠はイメージング手法により得られた。従来のイメージング手法により、病原性タンパク質の細胞内における分布を調べることが可能であるが、正常型と病原型の違いは同一のタンパク質のコンホメーションの違いのみであるため、これらを厳密に識別することは困難である。即ち、バイオイメーシングはタンパク質の存在を知るための優れた手法であるが、構造の変化の追跡には適さない。一方、

(2)の根拠は円偏光二色性(CD)のような分光学的構造解析手法を用いて得られた。一般に、CDやNMRなどの分光手法はタンパク質構造解析の手段として有用であるが、種々の制約から細胞に結合した状態のタンパク質を解析の対象とすることは困難である。

## 2. 研究の目的

上述の背景から、神経変性疾患の発症メカニズムを解明するためには、タンパク質の構造変化を追跡するための新しい手法を開発する必要がある。タンパク質の「存在を見る」ことができるバイオイメーシングの利点と「構造を解析する」ことができる分光手法の利点を融合し、細胞の中でタンパク質の「構造を見る」ことができるようになれば、最も強力な手法となり得る。本研究代表者は、過去に行った研究により、色素分子コンゴレド(CR)がタンパク質の $\beta$ シート構造領域に結合すると、非結合時とは異なる特徴的なラマンスペクトルを与えることを明らかにした。測定対象を破壊せずに高い空間分解能で構造情報を得ることができるというラマン分光法の利点とCRのような構造プローブを組み合わせることにより、従来にはなかったタンパク質構造のイメージングが実現されると期待される。本研究では、構造プローブとタ

ンパク質の相互作用様式の解明を行うことにより有用な構造プローブを見出し、細胞内においてタンパク質の構造を可視化する新規手法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) リポソームの調製

脂質を秤量して  $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$  混合溶媒 (1/1 ; v/v) に溶解した。室温で溶けにくい脂質の場合 (特に相転移温度が  $36^\circ\text{C}$  以上の脂質) は  $45\sim 50^\circ\text{C}$  に加温することで溶解した。これを 50 mL ナス型フラスコに移し、エバポレータで溶媒を減圧留去して壁面に脂質薄膜を形成させ、さらに一晩真空乾燥した。脂質薄膜に 5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加してボルテックスミキサーで攪拌し、懸濁液がほぼ透明になるまでプローブ型超音波破碎機で超音波処理を施した。これを遠心 (2500 rpm, 20 min, 室温) し、上清をリポソーム溶液として得た。

### (2) 細胞培養

東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより提供された、ラット副腎褐色細胞腫由来細胞 (PC12 cell)  $1 \times 10^6$  個/mL 入りの凍結チューブを  $-80^\circ\text{C}$  の冷凍庫から取り出し、一旦蓋を緩めて閉め直した後、 $36^\circ\text{C}$  の温水に浸し急速に解凍し、すぐに氷冷した。これを遠心 (1200 rpm, 5 min, 室温) し、dimethyl sulfoxide (DMSO) 入りの培地を除いた後、800  $\mu\text{L}$  の培地を加えて懸濁した。細胞懸濁液は poly-D-lysine コートした 2 個の小型シャーレに 200  $\mu\text{L}$  ずつ、残りを大型シャーレに加えて軽く攪拌し、 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  で培養した。

### (3) スペクトル測定

吸収スペクトルは、角型石英セル (セル長 1 cm) を使い、U-3300 型分光光度計 (日立) で測定した。

ラマンスペクトルの測定には、 $\text{Ar}^+$  レーザー (Coherent, Innova 70) の 488 nm 線を励起光として用いた。分光器は NR-1800 ラマン分光システム (日本分光) を使い、マルチチャンネル検出器として液体窒素冷却 CCD (Princeton Instruments) を用いた。波数較正には indene のラマンスペクトルを用いた。試

料 20  $\mu\text{L}$  をキャピラリーに入れ、中心波数 1450 または 1150  $\text{cm}^{-1}$ 、レーザーパワー 100 mW、積算時間 10 s  $\times$  12 回で測定を行った。

細胞の顕微ラマンスペクトルの測定には、Cyan レーザー (Spectra-Physics, 40 mW) の 488 nm 線を励起光として用いた。分光器は CCD マルチチャンネル検出器付き NRS-3100 AR ラマン分光システム (日本分光) を用いた。対物レンズは、20 倍対物レンズ (UMPlanFI, Olympus) を用いた。試料を 4  $^{\circ}\text{C}$  に冷却し、レーザーパワー 1 mW (試料位置)、積算時間 10 s  $\times$  2 回 / point で測定を行った。

#### 4. 研究成果

(1)  $\text{A}\beta$  のアミロイド線維形成マーカーとなる CR のラマンバンドの探索

CR の可視部の吸収極大波長は、アミロイド線維との結合により長波長シフトすることが知られている。この性質はアミロイド  $\beta$  ペプチド ( $\text{A}\beta$ ) などのアミロイド線維形成の追跡に利用されている。そこで、CR の可視吸収の変化を  $\text{A}\beta$  のアミロイド線維化の確認のために用い、並行して 488 nm 励起共鳴ラマンスペクトルを測定した。 $\text{A}\beta$ -CR 混合溶液は、 $\text{A}\beta$  溶液に CR を添加し、測定まで 37  $^{\circ}\text{C}$  で所定の時間インキュベートした。

CR の吸収スペクトル (図 1) は、調製 12 時間後までは極大波長、形状共に変化しなかった。24 時間後から、495 nm の吸収極大が長波長シフトし始め、36 時間後にはさらに 535 nm 付近に新たなバンドが現れ、強度増大した。

一方、CR のラマンスペクトル (図 2) も、吸収スペクトルと同様に調製 12 時間後までは変化しないが、24 時間後から徐々に 1404  $\text{cm}^{-1}$  バンドに対する 1378  $\text{cm}^{-1}$  バンドの強度比 ( $I_{1378}/I_{1404}$ ) が、時間の経過に伴い増大した。このことから、CR のラマンバンド強度比  $I_{1378}/I_{1404}$  は、アミロイド線維形成のマーカーとなりうることを示された。

吸収スペクトルの変化は 48 時間後には終了しているが、ラマンバンド強度比は 48 時間後以降も増大し続けている。したがって、ラマ

ンスペクトルからは 48 時間後以降も  $\text{A}\beta$  の線維形成が進行していると考えられる。

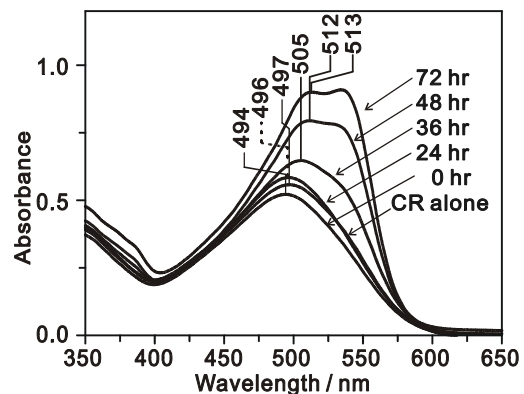


図 1.  $\text{A}\beta$  存在下の CR 可視吸収スペクトルの経時変化

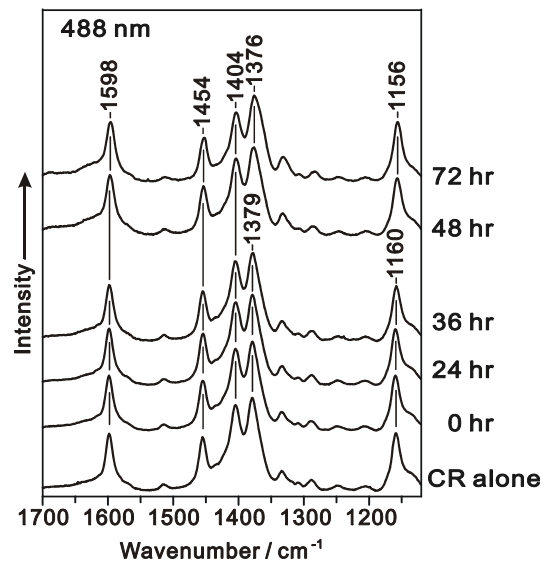


図 2.  $\text{A}\beta$  存在下の CR ラマンスペクトルの経時変化

(2) リポソーム 存在下での  $\text{A}\beta$  のアミロイド線維化に伴う CR のスペクトル変化

脂質膜上での  $\text{A}\beta$  のアミロイド線維形成を CR のラマンバンド強度比  $I_{1378}/I_{1404}$  をマーカーとして追跡できるかを確認するために、リポソーム存在下  $\text{CR-A}\beta$  混合溶液の吸収スペクトルおよび 488 nm 励起共鳴ラマンスペクトルを測定した。リポソーム- $\text{A}\beta$  混合溶液に CR を添加し、測定まで 37  $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。

リポソーム存在下における  $\text{CR-A}\beta$  混合溶液の吸収スペクトルの吸収極大は、CR 単

独での 496 nm と比べて調製直後から 7 nm 長波長シフトしていた。これは、CR と脂質膜との相互作用によると考えられる。

一方、CR のラマンスペクトルは、脂質膜との相互作用の影響を受けず、調製直後のラマンバンド強度比  $I_{1378}/I_{1404}$  は脂質膜非存在下での値から変化していなかった。インキュベーションを続けると 24 時間後あたりから徐々に  $I_{1378}/I_{1404}$  が増大し始めた。脂質膜非存在下の場合と同様に、吸収スペクトルでの変化が終了しても  $I_{1378}/I_{1404}$  の増大は続いた。

以上の結果から、CR のラマンバンド強度比  $I_{1378}/I_{1404}$  をモニターすることで、脂質膜上での  $A\beta_{1-40}$  のアミロイド線維形成を追跡できることが確認された。

### (3) PC12 細胞膜上での $A\beta$ のアミロイド線維化に伴う CR のスペクトル変化

2 時間培養した PC12 細胞に  $A\beta$  を添加し、10 分後および 26、48、72 時間後に、スライドガラス上に滴下した CR と混合し、488 nm 励起顕微ラマンスペクトルを測定した。図 3 に各培養時間あたり 10 個の細胞から得られたスペクトルの和を示した。得られたスペクトルには、細胞由来のタンパク質、脂質などの妨害を受けずに、CR の共鳴ラマン散乱によるバンドのみが観測された。時間の経過に伴い  $I_{1378}/I_{1404}$  が増大することから、 $A\beta$  のアミロイド線維形成を CR の共鳴ラマン散乱および顕微ラマン分光法を用いて細胞膜上においても追跡できることが示された。

72 時間後に、異なる細胞から得られた顕微ラマンスペクトルは互いに異なる  $I_{1378}/I_{1404}$  値を示した。従って、細胞により、またはレーザー照射部位によりアミロイド線維化の進行度が異なると考えられる。使用した 20 倍の対物レンズでは、レーザー光を 10  $\mu\text{m}$  程度までにしか集光できないため、レーザー照射部位の脂質組成により  $I_{1378}/I_{1404}$  値の違いを生じたのかどうかを判断できなかった。今後、対物レンズの倍率を上げレーザー光線を集光するなど、さらに局所的な情報を得るための検討が望まれる。

本研究で開発した手法を用いることにより、1 個の細胞の膜表面でのアミロイド

形成を観察することが初めて可能となった。今後、アルツハイマー病などの神経変性疾患の発症メカニズム解明のために、本手法は有用かつユニークな情報を与えると期待される。

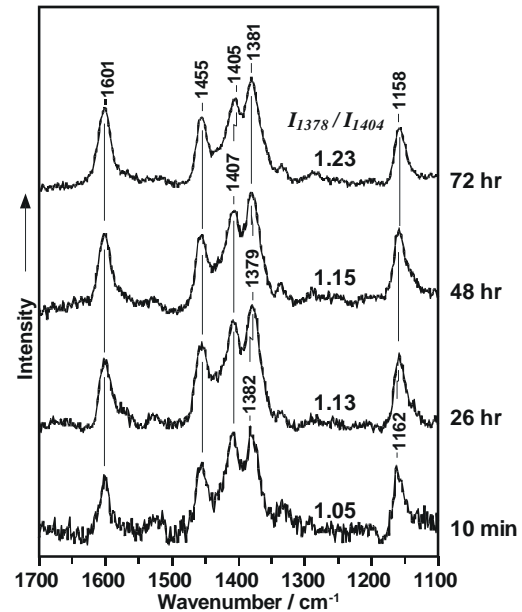


図 3.  $A\beta$  と共に培養した PC12 細胞を CR で染色した後に個々の細胞から得られたラマンスペクトル

### 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 3 件)

- ① M. Yoda, T. Miura and H. Takeuchi, "Non-electrostatic binding and self-association of amyloid  $\beta$ -peptide on the surface of tightly packed phosphatidylcholine membranes" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 56-59 (2008). 査読有
- ② H. Yorita, K. Otomo, H. Hiramatsu, A. Toyama, T. Miura and H. Takeuchi "Evidence for the Cation- $\pi$  Interaction between  $\text{Cu}^{2+}$  and Tryptophan" *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 15266-15267 (2008). 査読有
- ③ Miura T., Yoda M., Takaku N., Hirose T., Takeuchi H., "Clustered negative charges on the lipid membrane surface induce  $\beta$ -sheet formation of prion protein fragment 106-126" *Biochemistry* 46, 11589-11597 (2007). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Congo red のラマン散乱をプローブとする細胞膜表面におけるアミロイド線維形成の追跡

堤千裕, 三浦隆史, 竹内英夫

第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡, 2008 年 12 月 3 日-5 日

- ② Resonance Raman spectrum of Congo red as a probe of fibril formation of amyloid  $\beta$ -peptide

T. Miura, C. Tsutsumi, M. Sasaki and H. Takeuchi

XXth International Conference on Raman Spectroscopy, London, 2008年8月22日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦 隆史 (MIURA TAKASHI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号 30222318

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者