

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770103

研究課題名（和文） アミロイド形成速度の位置効果

研究課題名（英文） Position Effects in Amyloid Kinetics

研究代表者

Hall Damien (HALL DAMIEN)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：50447950

研究成果の概要（和文）：2009年-アミロイド線維の破砕における位置効果：初年度では、試験管内で統制された条件下において、アミロイド線維をつくるためにペプチドとポリペプチドに関する一連のモデルが用いられた。これらの線維は、剪断力（音波の流れもしくはパルス）の使用もしくは線維の分解を好む溶媒の状態加熱することにより破砕された。破砕された線維はその後透過電子顕微鏡（TEM）により分析され、長さの分布が記録された。分析結果の解釈とアミロイド線維の破砕パターンを予測する基本段階として、コンピューターを用いてモデルを構築した。2010年-ペプチドからアミロイドを形成する性質における位置効果：研究2年目は、より大きなポリマー連鎖におけるペプチド断片の位置が、アミロイドの成長速度に対して、どのような効果をもつかについて調べることを目的とした。大きさの分布の特徴づけを行うための手続きを分析、改良するための時間を設けた。我々は、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）と透過電子顕微鏡（TEM）および従来の SDS ゲル電気泳動（GE）のデンストメトリー実験に基づき新たな分析のフォーマット、および時間依存型のリガンド結合分析に基づいて表面での化学反応を測定する機能的な分析方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：2009- Position Effects in the Breakage of an Amyloid Fiber: In the first year we used a series of model peptides and polypeptides to make amyloid fibers under controlled in vitro conditions. These fibers were broken by use of either applied shearing force (flow or applied sonic pulse) or by heating under solvent conditions that favored dissolution of the fiber. The broken fibers were then analyzed by transmission electron microscopy (TEM) and a length distribution recorded. Computer models were developed for both the interpretation of the assay results and for first principles prediction of the breakage pattern of the amyloid fibers. 2010- Position Effects in the Propensity of a Peptide to Form Amyloid: In the second year we sought to examine the effect of positional placement of a peptide segment in a larger polymer sequence on the rate of the amyloid growth kinetics. We spent some time testing and refining procedures for performing the characterization of size distributions. We developed novel assay formats based on size-exclusion chromatography (SEC), transmission electron microscopy (TEM), densitometry of conventional SDS gel-electrophoresis (GE) experiments and a functional assay for determining the chemical reactivity of the surface based on a time dependent ligand binding assay.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード: (1) アルツハイマー病 (2) アミロイド仮説 (3) アミロイドの速度論 (4) アミロイドの位置効果 (5) アミロイドの形成と解離

### 1. 研究開始当初の背景

現在、アルツハイマー病の原因について分子レベルでの説明を試みる主要な仮説の中では、A-β ペプチド/アミロイド説が最も有力である。アミロイドはミスフォールドしたたんぱく質の状態であり、線状のたんぱく質原線維を生成する。このミスフォールドした状態の形成を支配する根本的な要因は知られていない。我々は、アミロイド線維の成長と破碎における位置効果に関する新たな仮説を検討することとした。

### 2. 研究の目的

本研究は、A-β ペプチドもしくはその断片により形成されたアミロイド原線維の集合と分解において考えられる位置効果 (PE) の存在を調査することを目的とする。

我々が調査する位置効果は、(1)アミロイド線維内の原線維断片化における位置の効果、(2)より大きなポリペプチド内のアミロイド形成ペプチド領域における位置効果についてである。

### 3. 研究の方法

平成 21 年: 試験管内で統制された条件下においてアミロイド線維を作成するために、ペプチドとポリペプチドの一連のモデルを用いた。これらの線維は、剪断力 (音波の流れもしくはパルス) の使用もしくは線維の分解を好む溶媒の状態で熱することにより破碎された。破碎された線維はその後透過電子顕微鏡 (TEM) により分析され、長さの分布が記録された。分析結果の解釈とアミロイド線維の破碎パターンを予測する基本段階として、コンピューターを用いたモデルを構築した。

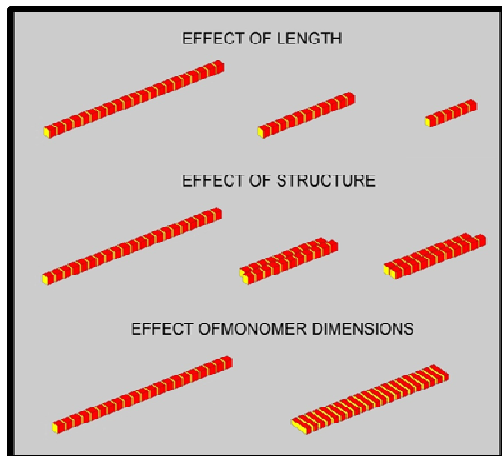


Fig. 1: Amyloid Structural Models

平成 22 年: 一連のペプチドモデルから得られたアミロイドの形成速度は、我々の実験室にて開発した一連の新しい分析技術を用いて記録された。分析方法は、(A)ペプチドモノマーが消失する速度、(B)アミロイドの分布における物理的特性の展開、(C)アミロ

イドの分布における機能的特性の展開の調査に焦点をあてた。分析結果の解釈と折りたたまれていないペプチドからアミロイド線維が形成される速度を予測する基本段階として、コンピューターを用いたモデルを構築した。

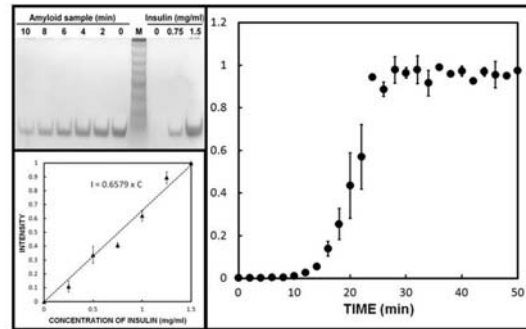


Fig. 2: Novel Quantitative Amyloid Assay Methodology

### 4. 研究成果

(1) 本補助金研究は以下の公表された結果に直接的に貢献した。

① A model of amyloid's role in disease based on fibril fracture. (原線維の破碎に基づく病気におけるアミロイドの役割のモデル) Hall D, Edskes H. Biophys Chem. 2009 145:17-28. 本研究では、原線維の分布のうち限られた領域における時間発展に基づいて、アルツハイマー病の進行に関する新たな仮説をたてた。

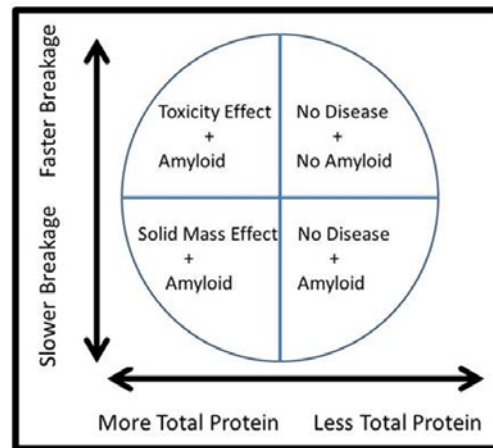


Fig. 3: Novel Alzheimer's Disease Toxicity Model

② Effect of lipid type on the binding of lipid vesicles to islet amyloid polypeptide amyloid fibrils. (膵島アミロイドのポリペプチドアミロイド原線維の脂質小胞の結合における脂質型の効果) Sasahara K, Hall D, Hamada D. Biochemistry. 2010 49:3040-8. 本研究では、アミロイド線

維が脂質膜に吸収される容量について、アミロイド線維の機能的な吸着性質の時間発展を調べる新しい分析方法を開発した。

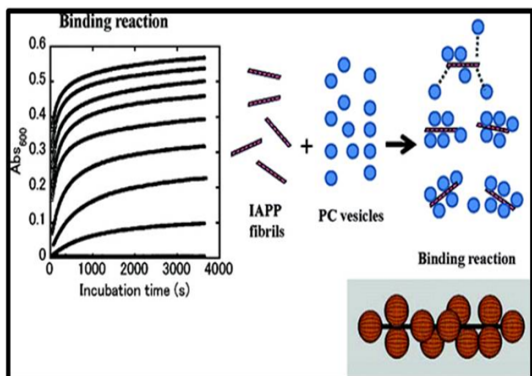


Fig.4: Amyloid interaction with lipid vesicles

(2) 本補助金研究は以下の投稿準備中の原稿に直接的に貢献した。

① A toy model for predicting the rate of amyloid fibril dissociation. (アミロイド原線維の解離速度を予測する模型モデル) Damien Hall and Haruki Nakamura. 本研究では、形状と長さの異なるアミロイド線維の破碎のモデルを作るために、Langevin Dynamics 技術を用いた。非対称な破碎パターンを示す構造的特徴を確認した。

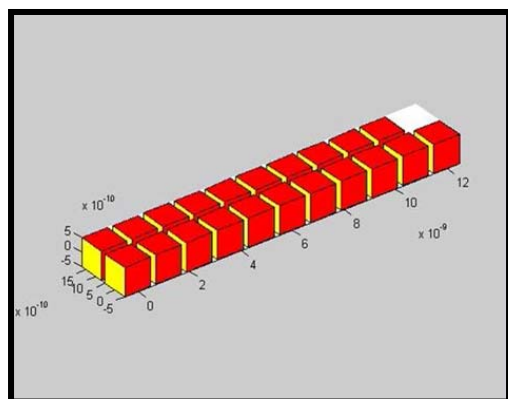


Fig.5: Representation of Langevin Dynamics Model

② A semi-automated method for measuring the size distribution of amyloid fibers from negatively stained transmission electron microscopy experiments. (陰性染色された透過電子顕微鏡実験によりアミロイド線維の大きさの分布を測定する半自動化された方法) Damien Hall. 本研究では、アミロイド線維の TEM 画像を自動的に評価するためのコンピューターソフトウェアを開発した。

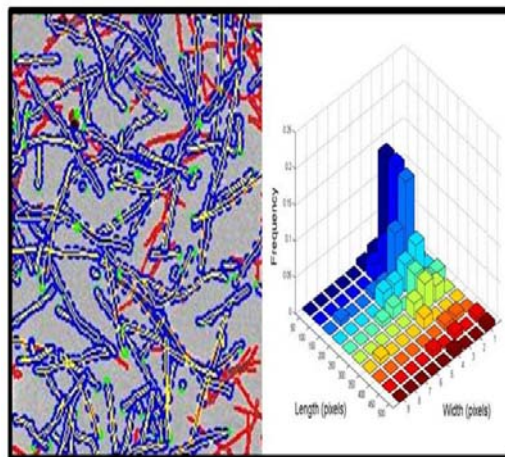


Fig.6: Semi-automated model for TEM characterization

③ On the use of size-exclusion chromatography for the resolution of mixed amyloid-aggregate distributions (I) Equilibrium models. (混合性アミロイド集合体の分布を解明するためのサイズ排除クロマトグラフィーの利用 (I) 平衡モデル) Damien Hall. 本研究では、SEC 実験においてアミロイド線維の溶出体積を予測する実用的な理論を開発した。

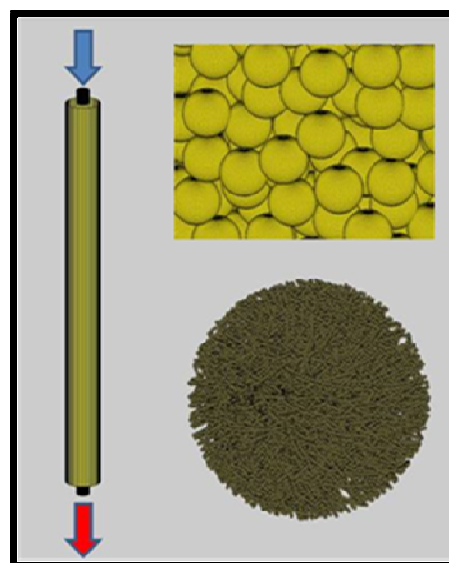


Fig.7: Schematic of the SEC Method

④ The HNH Index for assessing heterogeneity in an amyloid fibril population. (アミロイド原線維群における非均一性を評価するための HNH 指標) Damien Hall, Huang Lee and Nami Hirota. 本稿では、インシュリンアミロイド線維とアミロイド特有の染料コンゴレッドの相互作用を表わすリガンド結合パラメーターの反復計測により、アミロイド原線維群における機能的な

非均一性の程度を量的に測定する分析方法について述べている。

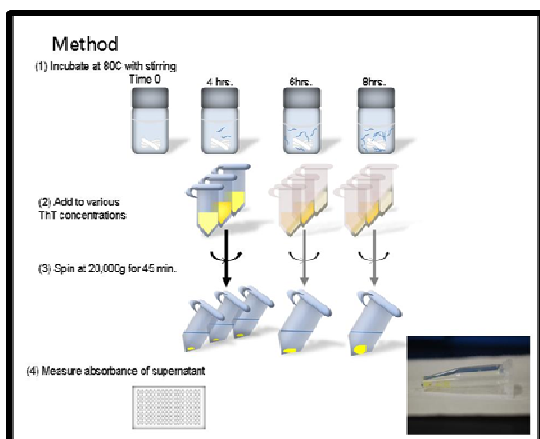


Fig. 8: Schematic of the novel HN assay

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

①Effects of macromolecular crowding on intracellular diffusion from a single particle perspective. Hall D, Hoshino M. Biophys Rev. 2010 2:39-53. 査読有

②Effect of lipid type on the binding of lipid vesicles to islet amyloid polypeptide amyloid fibrils. Sasahara K, Hall D, Hamada D. Biochemistry. 2010 49:3040-8. 査読有

③A model of amyloid's role in disease based on fibril fracture. Hall D, Edskes H. Biophys Chem. 2009 145:17-28. 査読有

〔学会発表〕 (計 4 件)

①Hall D, Multi-scale modeling of amyloid formation from an unfolded protein. National Institutes of Health NIDDKD LBP, 2011年2月27日 - 3月4日, NIDDKD Bethesda Maryland Bldg8, USA.

②Hall D, A model of amyloid's role in disease based on fibril fracture. Annual Conference of the Japanese Society of Materials Science Research, 2010年12月22日, Yokohama Conference Center, Japan.

③Hall D, A model of amyloid's role in disease based on fibril fracture. BIT Life Science 3<sup>rd</sup> Annual PepCon-2010, 2010年4月2,3日, 北京国際コンベンションセンター, 中国北京.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/younginit/damienhall/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

Hall Damien (HALL DAMIEN)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

助教

研究者番号：50447950