

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760539
 研究課題名(和文) 生体膜上におけるアミロイド性タンパク質の結晶多形現象の解明と制御方法の確立
 研究課題名(英文) Study on crystallization and polymorphism of amyloidogenic proteins on biomembranes
 研究代表者
 島内 寿徳 (SHIMANOUCI TOSHINORI)
 大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
 研究者番号：10335383

研究成果の概要(和文)：アミロイド線維形成は結晶化現象との類似性がある。事前に形成したアミロイドを超音波処理して得た断片は種晶(seeds)の役割を担う。seeds はモデル生体膜であるリポソームの共存条件において多様な伸長挙動を示した。特に、酸化ストレスやそれによって生成する酸化脂質が共存する場合、星状の球状アミロイド(スフェルライト)が形成されることが分かった。したがって、リポソーム膜がアミロイドの多形を決めていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Amyloid fibril formation is similar to a crystallization. The amyloid fibrils fragmented in advance has been reported to play a role for a seeds. The seeds showed the variety of their growth behavior in the presence of the model biomembranes (liposomes). The addition of oxidative stress could lead to the formation of radiated amyloid fibrils (spherulite) and as well as the oxidized liposome could. It is, therefore, suggested that the liposome membranes determined the polymorphism of the amyloid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学

キーワード：メンブレン・ストレスバイオテクノロジー、生体膜、アミロイド、多形、スフェルライト

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイド性タンパク質の結晶化と疾病

特定のタンパク質は自身の水素結合不安定性が原因で剛直な線維性凝集物(アミロイド)を形成する。アミロイドは結晶成長に類似した現象であるが、未だにアミロイ

ド形成機構が不明瞭である。アミロイド形成機構を曖昧なまま放置できないのは、アミロイドがAlzheimer症(認知症; AD)や狂牛病、ハンチントン病などの重篤な疾病を引き起こす共通のメカニズムだからである。本申請課題では特にAlzheimer症に着目する。

(2) Alzheimer症(AD)と結晶多形 ADは脳の神経細胞に沈着したアミロイドタンパク質による細胞毒性の結果誘導されると考えられている疾病である(アミロイド仮説). ゲノム・プロテオーム解析によりアミロイドβタンパク質(Aβ)が関与している事が報告されている. 基礎的知見として, 患者の脳神経細胞上で同定されている老人斑はAβのアミロイド線維からなる星状線維性凝集物(スフェルライト)であると見られている. しかし, 『何故単一のタンパク質が生体内で異なる線維性凝集物(結晶多形)を形成するのか』については研究されていない.

(*結晶多形...同一物質からなる物質が異なる結晶構造を持つ現象のこと. ダイヤモンドとグラファイトなど)

(3) ADの新側面: 生体膜がAβ結晶多形の鍵 Aβは本来アミロイド前駆体タンパク質と呼ばれる膜タンパク質から切り出された分解生成物であり, 生体膜と深い関係を持っている. また, 生体膜上で構造異常化しアミロイド線維を形成するという事が判明している. しかし, 生体膜とAβの結晶多形の関係性についての研究はほとんどなされていない.

2. 研究の目的

本研究の目的は, (i)生体膜による Aβの多形性の発現機構の解明と(ii)(モデル)生体膜(リポソーム)による多形制御方法の検討である.

3. 研究の方法

(1) 各種脂質膜(リポソーム)の調製 数種の中性リン脂質PC, Sphingomyeline (SM), 中性脂質ジアシルグリセロール (DAG), コレステロール (Chol), 脂肪酸(Stearic acid:SA, etc)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. 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. 不飽和脂質SAPCは, H₂O₂(2mM) /CuSO₄(200μM)により酸化処理した.

(2) ThT蛍光分析によるアミロイド形成挙動の評価 NaCl 100mM, 37°C, pH7.4 の条件下で各種リポソームを添加, Aβ(1-40)モノマー(5μM)をインキュベーションし, 線維検出プローブであるThioflavin-T(ThT)の蛍光強度(E_x=444nm, E_m=485nm)の経時変化を測定した. ThT蛍光強度の経時変化のグラフの傾きから, 見かけの線維伸長速度も求めた.

(3) 表面特性の解析 タンパク質の局所的疎水性(LH_{pt})については水性二相分配法により求めた. リポソームの局所的疎水性は疎水性蛍光プローブANSを用いて評価した.

4. 研究成果

まず, モデルタンパク質として, Alzheimer病原因タンパク質であるアミロイドβ(Aβ)を用いた. 40アミノ酸残基を持つタンパク質である.

(1) seedの調製 (論文実績④) まず, アミロイドを形成した. SEM(図1(a)), 全反射顕微鏡(TIRFM)(図1(b)), TEM(図1(c))のいずれの観察結果からも, アミロイド形成を示唆する結果を得た. 得られたアミロイドは平均8 μmの線維長を持つことが分かった(図1(e)). 次に, アミロイド超音波処理(1 min間)をしたところ, 図1(d)のような短い線維状の断片が見られた. それらの構造は図1(c)と類似しており, 円二色性分光実験からも同一の二次構造を有することが示された(data not shown). Seedは長さが高々100 nm程度の短い線維群であることが分かった(図1(f)).

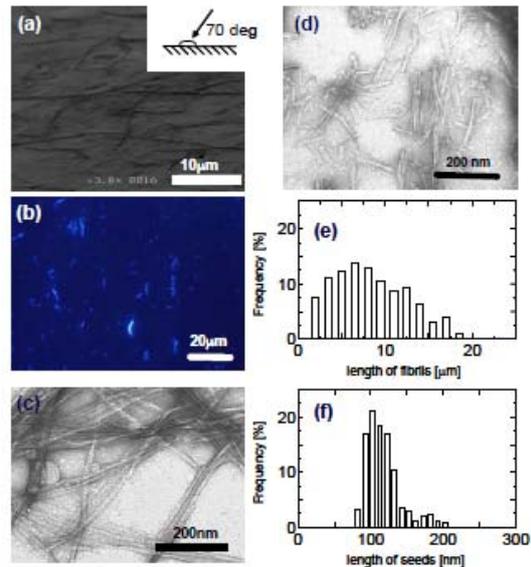


図1 アミロイド線維の(a) SEM像、(b) TIRFM像、(c) TEM像、および(d) seedのTEM像. (e) アミロイドと(f) seedの線維長さ分布(論文実績④).

(2) Aβとそのアミロイドの表面特性の解析

(論文実績④) アミロイド形成はAβの凝集反応の一つと考えると, その疎水性が反応進行の鍵を握る. しかし, 従来の報告では, Aβモノマーの表面特性は報告されているが(R. Kuboi, H. Umakoshi, *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, 13, 9 (2006)), アミロイドやそのseedの表面特性は報告されていない. そこで, 水性二相分配法により, それぞれの局所的疎水性を検討した(図2). Seedはモノマーやアミロイドに比べて

、顕著に大きな局所的疎水性(LH_{pr})を示した。また、seedは他の多くのタンパク質よりもより大きな LH_{pr} 値を示した。タンパク質や中間状態のときに高い LH_{pr} 値を示すので、seedがアミロイド形成(凝集反応)の中間体的位置づけと解釈できる。逆にアミロイドは LH_{pr} 値が低く、安定な凝集物である。これは従来のタンパク質の凝集に伴う LH_{pr} 変化と対応しており、アミロイドをタンパク質の凝集過程とみなせる証左である。

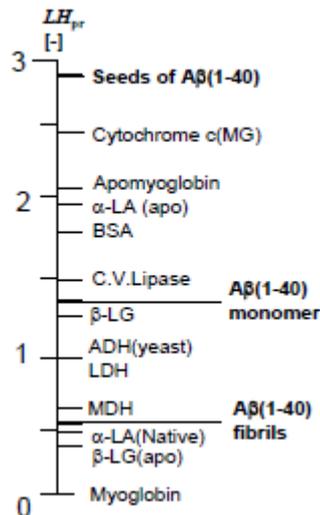


図2 各種タンパク質の局所的疎水性

(3) 伸長機構 (論文実績③,④) 次にseedからのアミロイド伸長を検討した。SeedにTriton X-100を添加すると顕著なアミロイド伸長の抑制効果が見られた(図3)。

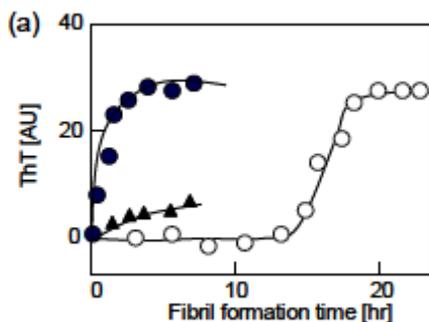


図3 アミロイド伸長. ○: 自発的伸長、●: seedからの伸長. ▲: Triton X-100共存下における伸長(論文実績④).

疎水性プローブである Triton X-100 が seed が有する局所的に疎水性の高い部位に結合することと、伸長に関わるモノマーの seed への部位とが同一の可能性が高いことを示唆している。したがって、伸長過程が疎水性相互作用により進行していることも示唆している。このことか

ら、モノマーからの自発的伸長には、seed様の局所的疎水性の高い中間体の生成が必須であることが予想され、その形成過程に対応する lag-time が見られた(図3の○)。例えば、モノマーと Schiff 塩基形成して、seed 形成に不利な二次構造に変化させることが、dopamine 添加条件下でのアミロイド伸長実験より明らかになっている。図4(A)のように、dopamine を過剰量添加すると、lag-time が実験時間を超える結果となった。また、seed にモノマーと dopamine を添加した場合は、伸長速度はほとんど同じであった(図4(B))。その後、線維量が減少するのは、dopamine によるアミロイド可溶化によるものである。しかし、本論とは異なるので、詳細な説明は省く。

したがって、lag-time において、モノマーが seed 様会合体を形成していることが示唆された。

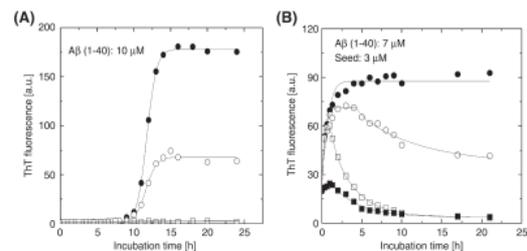


図4 dopamine 共存下におけるアミロイドの(A)自発形成と(B)seedからの伸長(論文実績③)。

(4) アミロイド多形の誘導 (論文実績①,④) seedsの局所的疎水性が高いという実験事実は、seeds間の会合体の形成のしやすさを示唆している。実際、図5のように、自然に放射状線維が形成され(図中矢印2) (論文実績④)、単一线維の成長(矢印1)とは異なる多形を示す。

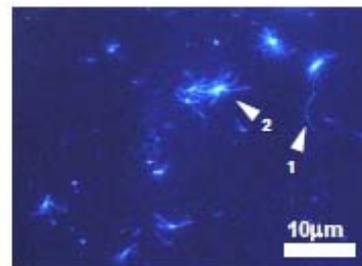


図5 seedからのアミロイド伸長のTIRFM像(論文実績④)。

Seedの会合体が必須であるかを検討するため、共同実験(蛋白研・後藤祐児教授)として、単一

線維をレーザーで断片化し、その後の伸長挙動を TIRFM により可視化した。その結果、図 6 に示すように、断片化するとスフェルライト様構造が誘導されることが分かった(論文実績①)。



図 6 レーザー照射に伴う酸化ストレスにより誘導されるアミロイドのスフェルライト形成(後藤祐児教授との共同研究、論文実績①)。

(5) アミロイド性タンパク質-リポソーム間相互作用の評価(論文実績③,⑤) 4.3~4.4 より、seed 様構造の形成過程を制御することが、アミロイド多形の制御につながる。Lag-time ではモノマーの $\alpha \rightarrow \beta$ 転移が起こる。したがって、この構造変化の制御が鍵である。従来の研究では、タンパク質の構造形成にリポソームが有用であることが報告されている。そこで、リポソーム共存下におけるアミロイド伸長を検討した。中性の DPPC、ドメイン性の DMPC/SA、POPC/Ch リポソーム共存下におけるアミロイドの形成を検討した結果、伸長の kinetic に変化が認められた(論文実績③,⑤)。

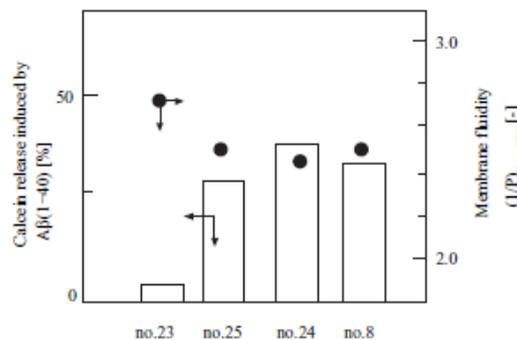


図 7 各種リポソームと Aβ との相互作用と膜流動性. No.8: DMPC/SA, 23:DMPC/SAPC, 24:DMPC/SAPCox(ラジカル酸化処理), 25:DMPC/SAPCox(透析酸化処理)(論文実績②)

これは、モノマーと各種リポソームの相互作用が強く、脂質膜上での濃縮による seed 様構造形成の促進が原因であると考えられる。そこで、Membrane Chip System (論文実績②, ⑦-⑩) で探った。その結果、図 7 に示すように、DMPC/SA や酸化劣化脂質含有リポソーム DMPC/SAPCox がモノマーと強く相互作用することが示唆された(論文実績②,⑤)。

さらに、リポソームと Aβ との相互作用とアミロイド形成が協調して起こることを、野田

実教授(京都工芸繊維大)との共同研究により開発した新規バイオセンサー(論文実績⑤, ⑬)により確認した(論文実績⑤)。

(6) アミロイド多形誘導におけるリポソームの効果 負電荷リポソーム共存下で seed の成長を観察した。その結果、図 8 のように、スフェルライトが多数形成していることを観察した。さらに、負電荷脂質と酸化脂質を混合したリポソームでは、seed ではなくモノマーからの自発的成長によりスフェルライトが形成されることが分かった(data not shown)。

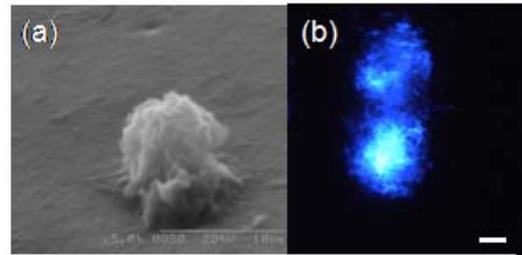
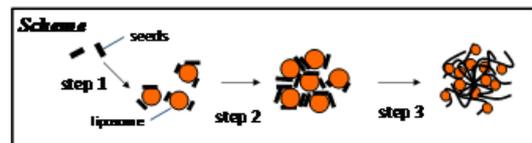


図 8 負電荷リポソーム共存下におけるスフェルライト形成. (a) SEM 像, (b) TIRFM 像(投稿準備中)。

(7) アミロイド多形の誘導機構 リポソーム-seeds 間相互作用により会合体が形成する(step1~2)。この会合体は伸長端を多く有する。そこにモノマーが結合することでスフェルライトに形成する(Scheme 1)。このメカニズムは、生体内での老人斑形成の解明に役立つ知見である(投稿準備中)。



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 16 件)

- ① (査読有) H. Yagi, D.Ozawa, K. Sakurai, T. Kawakami, H. Kuyama, O. Nishimura, T. Shimanouchi, R. Kuboi, H. Naiki, Y. Goto, Laser-induced propagation and destruction of amyloid $\beta(1-40)$ fibrils, *J.Biol.Chem.*, **285(25)**, 19660-19667 (2010)
- ② (査読有) T. Shimanouchi, E. Oyama, H. Ishii, H. Umakoshi, R. Kuboi, Monitoring of Membrane Damages by Dialysis Treatment: Study with Membrane Chip Analysis, *Desalination and Water Treatment*, **17**, 45-51 (2010)

- ③ (査読有) H.T. Vu, T. Shimanouchi, H. Yagi, H. Umakoshi, Y. Goto, R. Kuboi, Catechol derivatives inhibit the fibril formation of amyloid- β peptides, *J. Biosci. Bioeng.* **109**, 629-634 (2010)
- ④ (査読有) T. Shimanouchi, N. Shimauchi, K. Nishiyama, H.T. Vu, H. Yagi, Y. Goto, H. Umakoshi, R. Kuboi, Characterization of Amyloid- β fibrils with Aqueous Two-Phase System: Implications of Fibrils Formation, *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, **17**, 121-128 (2010)
- ⑤ (査読有) M. Noda, T. Asai, T. Shimanouchi, K. Yamashita, H. Umakoshi, M. Okuyama, and R. Kuboi, A Microbolometer of Bio-Thermochemical Sensor Immobilized Liposome for Detection of Causative Protein of Alzheimer's Disease, Amyloid Beta, *Procedia. Chem.*, **1**, 1071-1074 (2009)
- ⑥ (査読有) T. Shimanouchi, M. Tasaki, H.T. Vu, H. Ishii, N. Yoshimoto, H. Umakoshi, R. Kuboi, A β /Cu-Oxidation of Cholesterol on Liposome Membrane, *J. Biosci. Bioeng.* **109**, 145-148 (2009)
- ⑦ (査読有) T. Shimanouchi, E. Oyama, H. Ishii, H. Umakoshi, R. Kuboi, Membranomics Research on Interactions between Liposome Membranes with Membrane Chip Analysis, *Membrane*, **34** (6), 342-350 (2009)
- ⑧ (査読有) H. Ishii, T. Shimanouchi, H. Umakoshi, R. Kuboi, Analysis of interaction between liposome membranes induced by stress condition: Utilization of liposomes immobilized on indium tin oxide electrode, *J. Biosci. Bioeng.*, **108**(5), 425-428 (2009)
- ⑨ (査読有) T. Shimanouchi, H. Ishii, N. Yoshimoto, H. Umakoshi, R. Kuboi, Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: Effect of membrane fluidity, liposome size and immobilization, *Coll. Surf. B*, **73** (1), 156-160 (2009)
- ⑩ (査読有) T. Shimanouchi, P. Walde, J. Gardiner, S. Capone, D. Seebach, R. Kuboi, Inversion of the Configuration of A Single Stereocenter in A β -Heptapeptide Leads to Drastic Changes in Its Interaction with Phospholipid Bilayers, *ChemBioChem*, **10**, 1978-1981 (2009)
- ⑪ (査読有) H.T. Vu, T. Shimanouchi, H. Ishii, H. Umakoshi, R. Kuboi, Immobilization of intact liposomes on solid surfaces: a quartz crystal microbalance study, *J. Coll. Int. Sci.*, **336**(2), 902-907 (2009)
- ⑫ (査読有) T. Shimanouchi, H. Umakoshi, R. Kuboi, Kinetic Study on Giant Vesicle Formation with Electroformation, *Langmuir*, **25**(9), 4835-4840 (2009)
- ⑬ (査読無) 島内寿徳, 馬越大, 久保井亮一, 石井治之, 吉本則子: 脂質膜界面特性に基づくベシクル形成制御, 化学工学会「微粒子・流体プロセス部会 気泡・液滴・微粒子分散工学分科会」編「化学工学シンポジウムシリーズ81, 気泡、液滴、微粒子分散工学の融合と新展開」107-114 (化学工学会, 2009)
- ⑭ (査読無) 馬越大, 島内寿徳, 久保井亮一: メンブレン・ストレスバイオテクノロジーとアルツハイマー病診断, 分離技術, **39**(2), 109-114 (2009)
- ⑮ (査読有) M. Noda, T. Shimanouchi, M. Okuyama, R. Kuboi, A Bio-Thermochemical Microbolometer with Immobilized Intact Liposome on Sensor Solid Surface, *Sensors and Actuators B*, **135**(1), 40-45 (2008)
- ⑯ (査読無) 久保井亮一, 馬越大, 島内寿徳, メンブレン・ストレスバイオテクノロジー (MSB) の新展開, 膜 (Membrane), **33**(6), 302-309 (2008)
- [学会発表] (計 16 件)
- ① 島内寿徳, 大山恵奈, 嶋内直哉, 大西諒, 馬越大, 久保井亮一, アミロイド性タンパク質の抽出/分析のためのリポソームの設計, 第 28 回溶媒抽出討論会(大阪大学), 2009 年 11 月 20 日
- ② 島内寿徳, Huong Thi Vu, 馬越大, 久保井亮一, アミロイド性タンパク質の表面特性解析～メンブレンチップ解析の利用～(その 1), 生物工学会(名古屋大), 1Ep18, 2009 年 9 月 23 日
- ③ 島内寿徳, Huong Thi Vu, 馬越大, 久保井亮一, メンブレンチップによる脂質膜上におけるアミロイド形成のモニタリング(その 2), 生物工学会(名古屋大), 1Ep19, 2009 年 9 月 23 日
- ④ 島内寿徳, 嶋内直哉, 大西諒, 馬越大, 久保井亮一, 脂質膜上におけるアミロイド形成と多形(その 3), 生物工学会(名古屋大), 1Ep20, 2009 年 9 月 23 日
- ⑤ 馬越大, 島内寿徳, 久保井亮一, リポソーム膜上の自己集合挙動を利用する A β 分離～金属アフィニティー固定化リポソームクロマトグラフィー～, 分離技術会年会(明治大), 2009 年 6 月 13 日
- ⑥ 島内寿徳, Huong Thi Vu, 大西諒, 松本匡晴, 馬越大, 久保井亮一, 生理活性物質によるアミロイド可溶化プロセスの解析, 分離技術会年会(明治大), 2009 年 6 月 12 日

- ⑦ 島内寿徳, 嶋内直哉, 大西諒, 馬越大, 久保井亮一, 脂質膜界面におけるアミロイド性タンパク質の晶析現象, 分離技術学会年会(明治大), 2009年6月12日
- ⑧ 島内寿徳, Huong Thi Vu, 石井治之, 嶋内直哉, 大西諒, 馬越大, 久保井亮一, アミロイド性タンパク質の分子内水素結合安定性評価を目指したリポソーム水晶振動子法の開発, 膜学会年会(東京理科大), 2009年5月21日
- ⑨ T. Shimanouchi, H.T. Vu H. Ishii, E. Oyama, H. Umakoshi, R. Kuboi, Amyloid Fibril Formation on Biomembrane: Analysis Using Membrane Chip System, The 10th General Seminar of JSPS-VAST Core University Program, 2008年11月27日, 大阪JICA
- ⑩ 島内寿徳, 石井治之, 大山恵奈, Huong Thi Vu, 馬越大, 久保井亮一, Membrane Chipを用いたタンパク質の構造異常性の評価, 膜学会シンポジウム2008 (大阪大), 2008年11月13日
- ⑪ 島内寿徳, 嶋内直哉, 西山圭一, 馬越大, 久保井亮一, Liposomeのナノ界面における晶析現象を利用したアミロイドβタンパク質の新規な抽出・分離技術の開発, 2008年度溶媒抽出学会年会(上智大), 2008年11月10日
- ⑫ T. Shimanouchi, H. Ishii, E. Oyama, T.H. Vu, H. Umakoshi, R. Kuboi, Separation and analysis for Aβ peptides based on recognition function of abnormal biomembrane ~Membrane chip analysis can brighten a potential aspect of Alzheimer's disease~, International Conference on Separation Science and Technology 08, 2008年11月4日, 日本, 山梨
- ⑬ 島内寿徳, H.T. Vu, 馬越大, 久保井亮一, 森田誠一, 固体基板上へのリポソームの安定な固定化 ~メンブレンチップの創製~, 化学工学会秋季大会(東北大), 2008年9月24~26日
- ⑭ 島内寿徳, 大山恵奈, 馬越大, 久保井亮一, 透析操作による血中膜成分の表面状態への影響~モデル系による検討~, 化学工学会 秋季大会(東北大), 2008年9月26日
- ⑮ T. Shimanouchi, H. Ishii, T.H. Vu, K. Nishiyama, H. Umakoshi, R. Kuboi, Development of separation and analytic method for Aβ peptide based on recognition function of abnormal biomembrane ~Membrane chip analysis can brighten a potential aspect of Alzheimer's disease~, The 1st International Seminar on Process Chemistry 08 (京都国際会議場), 2008年7月28日

- ⑯ T. Shimanouchi, H. Ishii, T.H. Vu H. Umakoshi, R. Kuboi, Membrane chip analysis: development of separation and analytic method for Aβ peptide and membrane abnormality, Liposome Research Days 2008 (神奈川), 2008年7月20日

〔図書〕(計 1 件)

- ① 久保井 亮一、馬越 大、島内 寿徳: メンブレン・ストレスバイオテクノロジー (MSB)の新展開, PHARM TECH JAPAN, **24(8)**, 1573-1575(2008)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 誘電泳動による微粒子の状態の測定法
発明者: 安達稔, 久保井亮一, 小寺富士, 島内寿徳

権利者: クラスタテクノロジー株式会社

種類: 技術特許

番号: 2008-505083

出願年月日: 2008年9月10日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 複合化導電性高分子およびその製造法並びにそれを用いたガスセンサー

発明者: 久保井亮一, 島内寿徳, 森田誠一

権利者: 久保井亮一

種類: 技術特許

番号: 2003-054590(公開)

取得年月日: 2009年4月26日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島内 寿徳 (SHIMANOUCHI TOSHINORI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号: 10335383

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

後藤 祐児 (GOTO YUJI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号: 40153770

野田 実 (NODA MINORU)

京都工芸繊維大学・工学学部・教授

研究者番号: 20294168