

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21246121

研究課題名（和文）アミロイド可溶性を指向するリポソーム膜上ペプチド断片提示技術の研究
 研究課題名（英文）Study on Peptide Display on Liposome Membranes for Disaggregation of Amyloid Fibrils

研究代表者

久保井 亮一 (KUBOI RYOICHI)

大阪大学・名誉教授

研究者番号：40029567

研究成果の概要（和文）：リン脂質二分子膜からなる閉鎖系小胞であるリポソームを生体膜モデルとして用い、リポソーム膜上における A β /Cu 錯体の結晶形態(多形)と触媒機能を体系的に解析した。リポソーム膜の酸化損傷状態がアミロイドの形態に顕著な影響を与えると共に、酸化反応の触媒活性の制御にも関与している事が明らかになった。ペプチド断片をリポソーム膜上に提示した触媒材料(LIPOzyme と定義)を比較系とした実験により、A β /Cu 錯体の触媒活性の制御機構を明らかにした。このような機能を透析モジュールと組み合わせる新規なリポソーム充填法を開発し、生体膜異常化の診断/正常化を制御するシステムの開発が原理的に可能である事が示された。

研究成果の概要（英文）：We systematically investigated the polymorphism of amyloid A β /Cu fibrils and their catalytic oxidation activity using the liposome as a model biomembrane. It was clarified that the oxidized surface of liposome could affect the catalytic oxidation activity of amyloids as well as their morphology. It was revealed that the experiments using peptide fragments-displayed liposomes could contribute to the better understanding on the regulatory mechanism of catalytic oxidation activity of A β /Cu. Besides, we developed the novel loading method of liposomes into the module. Those results suggested that a recognition system of abnormal / damaged biomembranes for their repairmen could be in principle developed, from those results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	17,900,000	5,370,000	23,270,000
2010 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2011 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
年度			
年度			
総計	34,900,000	10,470,000	45,370,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：メンブレン・ストレスバイオテクノロジー, LIPOzyme, 生体膜, 人工酵素, バイオリアクター

1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病はアミロイドと呼ばれる線維性凝集物が関連する事が知られている。アミロイドの主成分は、40～43 残基からなるア

ミロイド β タンパク質(A β)である。A β は金属イオン(Cu²⁺や Fe³⁺など)と結合しつつ神経組織上で蓄積されるが、その生理学的機能や意義についてはほとんど分かっていない。A β

が形成するアミロイドはドーパミンなどのカテコールアミン類により分解される事が報告されている。しかし、その機構はほとんど検討されていないのが現状である。ドーパミンなどのカテコールアミン類は神経伝達物質であり、神経細胞膜周辺には豊富に存在している。それゆえ、ドーパミン生成経路(変換反応)が神経細胞膜上に提示された Aβ/金属錯体やアミロイド形成に何らかの形で関連していると考えられる。

一方、アミロイドの形成は神経細胞膜上であると考えられている。細胞膜表層のストレス状態が形成されるアミロイドの形態と機能に関連があるとは予想されているが、その具体的な検討例は報告されていない。これらの検討例は、神経細胞膜上におけるアミロイドの形成原理の理解に寄与すると期待される。

2. 研究の目的

ドーパミンはアミロイド分解を担う鍵物質である。本研究課題では、ドーパミンを利用しつつ、細胞表層のストレス状態に応じて、ドーパミン変換/アミロイド形成を制御する生体内反応システムを理解し、アルツハイマー病のもう1つの側面を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、以下の3領域に分割して研究を進めた。

A 班:断片提示された Aβ の多機能性については、久保井、島内ら(大阪大)が中心となって検討を進めた。

B 班:APP を出発物質とする LIPOzyme 設計については、馬越(大阪大)が主に進めた。一定の成果を得た後は、プロセス強化を図った(山口大・吉本)。

C 班:AD における生体膜異常化の診断/正常化プロセスを検討するため、メンブレンチップシステムの開発を進め、透析膜モジュールへのリポソームの充填とその分離プロセスへの展開を図った(久保井、馬越、島内)。馬越が外れた後は、塩盛(宮崎大)がモジュールの高度利用に関する検討を推進した。

4. 研究成果

まず、それぞれの班の研究成果の概要を述べ、最後に総括する。

A 班:断片提示された Aβ の多機能性の検討

Aβ は、金属イオンとの錯体形成による触媒作用の発現、膜攪乱効果、アミロイド形成、などの機能を誘導する事が分かった。

例えば Aβ/Cu はコレステロールの酸化反応を触媒する事が分かった。特に、脂質膜上に提示(結合)し、脂質膜中のコレステロール

を酸化する場合、bulk 水相系とは異なる挙動を示す事を見出した(図 1)。酸化反応速度は脂質膜中のコレステロールの割合に応じて変化し、脂質膜に結合する水和水の変化と対応する事が示された。より詳細に検討する事により、Aβ/Cu により触媒される酸化反応過程におけるプロトン引き抜き過程を水和水が促進する事が原因である事が示された。さらに、水和水は脂質膜界面のダイナミクスを規定する事を誘電分散解析により詳細に明らかにした(原著論文-⑤)。

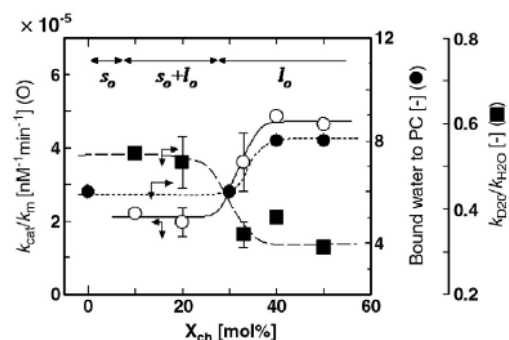


図 1 脂質膜上の Aβ/Cu 錯体によるコレステロール酸化反応速度(O), 重水置換効果(■), 水和水(●)とコレステロール濃度との関係。詳細は原著論文-⑩を参照の事。

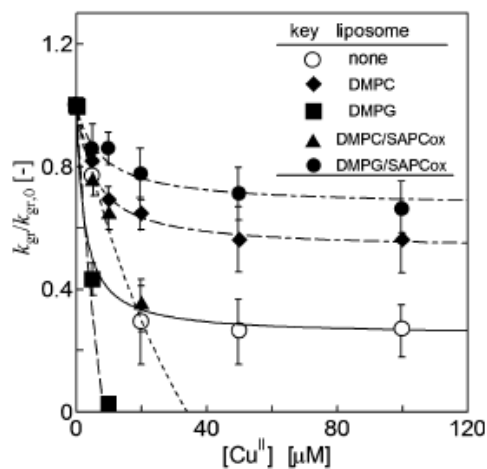


図 2 アミロイド伸長速度と添加 Cu イオン濃度との関係。DMPC(中性), DMPG(負電荷), DMPC/SAPCox(中性/酸化), DMPG/SAPCox(負電荷/酸化)リポソームを共存させている。詳細は原著論文-③を参照の事。

上記の Aβ/Cu は脂質膜上のアミロイド形成に影響を及ぼす事が分かった。図 2 のように、Cu イオンを添加すると濃度依存的にアミロイド伸長が阻害された。注目すべきは、共存するリポソームの脂質組成により、アミロイド伸長阻害効果が異なる点である。詳細な検討により、Aβ/Cu の二次構造がアミロイド

のテンプレートとしては不適切なため、伸長を阻害する事が示唆された。CuがAβと強固に結合する($K_d \sim 10^{-18}$ M)事が要因の一つである事が推察された。

そこで、リポソーム共存下において、アミロイド形成に及ぼすCuイオンの影響を検討した。Thioflavin T(ThT)はアミロイドに特異的に結合し、青色に染色する事ができるので、全反射蛍光顕微鏡によりマクロな形態を観察する事が可能になる。そこで、DMPG/SAPCox(負電荷/酸化)リポソーム共存下におけるアミロイドの形態を観察した結果、図3のように多様な形態を得た。リポソームとCuイオンがいずれも存在しない場合、線維状のアミロイドが観察された。Cuイオンのみ共存する場合、アミロイドは見られなかった。これはAβ/Cuの二次構造がアミロイドのテンプレートとしては不適切である事に起因する。DMPG/SAPCoxリポソーム共存下の場合、球状のアミロイドが形成された。しかし、DMPG/SAPCoxリポソームとCuイオンが共に共存する場合、短いアミロイドのみが観察された。

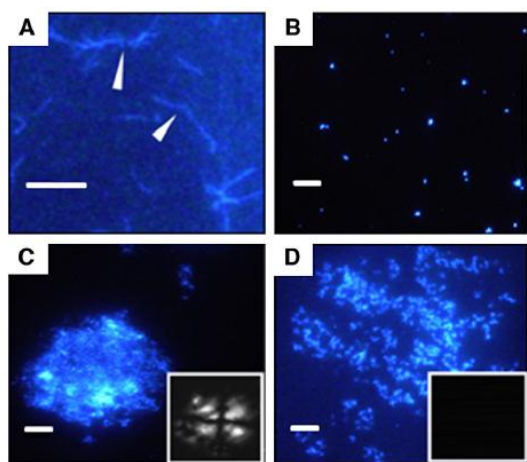


図3 アミロイドの形態に及ぼすDMPG/SAPCoxリポソームとCuイオンの影響。A) リポソーム/Cu非共存, B) Cu共存, C) リポソーム共存, D) リポソーム/Cu共存。詳細な実験条件は原著論文-④を参照の事。

DMPG/SAPCoxリポソーム共存条件で観察された特異な球状アミロイドの形成機構は、脂質膜に提示されたAβの挙動と関連する事が分かった。具体的には、(i)アミロイドの二次核化(断片化)と(ii)脂質膜上に提示された断片同士の凝集をリポソームが介助する事である(原著論文-①)。

次にドーパミンなどのカテコールアミン類によるアミロイド形成への影響を検討した。図4に示すように、ドーパミンがアミロ

イド形成を阻害するだけでなく、形成後のアミロイドを可溶化する事が分かった。アミロイド形成の阻害・可溶化にはドーパミンだけでなく、その酸化体も重要である事が分かった。図1のように、アミロイドにAβ/Cuが含まれる場合、ドーパミンの酸化を促進する可能性がある。実際にアミロイドAβ/Cu(図2のD)による、コレステロール、ドーパミン、アスコルビン酸の酸化反応速度を検討した結果、リポソーム非共存条件(図3のB)よりも反応速度が低い事が分かった(未発表)。リポソームの介在により触媒活性を得る点では、Aβ/CuやアミロイドAβ/Cu断片を提示したリポソームはLIPOzymeと呼ぶことができる。したがって、Aβ/Cu断片が提示された脂質膜上では、神経伝達物質との酸化的触媒作用が伴う事によりアミロイドの形成とその形態の制御が可能である事が示された。他方、形態の違いは細胞毒性の差となって現れた。以上より、脂質膜に断片提示されたAβは多機能性(酸化反応触媒作用、膜攪乱、細胞毒性)を誘導する事が示めされた。

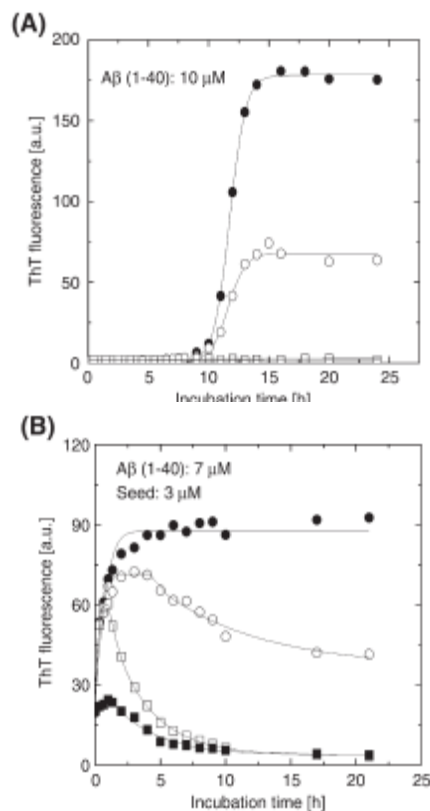


図4 (A)ドーパミン共存条件におけるアミロイドの成長。(B)ドーパミン共存下における核からのアミロイド伸長。詳細は原著論文-⑦を参照の事。

B班:APPを出発物質とするLIPOzyme設計

本研究期間中に、ペプチドをリポソーム膜に提示し、酵素様機能を誘導する技術体系を構築した(文献-⑥)。

Zn/Cu-スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)はZnとCuイオンを活性発現過程で必要とする酵素である。SOD断片はSOD活性はほとんど見られず、SOD断片に金属イオンを添加しても活性が回復しない。そこで、リポソーム膜上への断片提示を検討した。図5に示すように、POPC(中性)膜上への単純な断片提示ではSOD活性の回復は見られなかったが、Zn/Cuイオンの添加により50%程度の活性が回復した。Zn/Cuの添加により、膜上でSOD断片が活性発現に必要な二次構造(α -helix)を獲得した事に起因する事が円二色性分光実験から明らかになった。

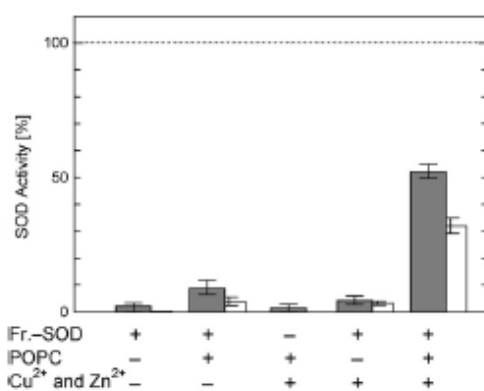


図5 POPCリポソームへのSODの断片提示とそのSOD活性の関係。詳細は原著論文-⑨を参照の事。

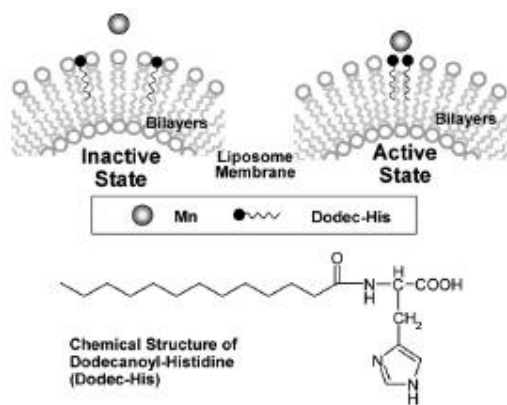


図6 金属配位リガンドを配向させたリポソーム膜に関する模式図

我々はさらに断片提示技術を発展させるべく、活性中心を最小単位としてリポソーム膜に提示する技術開発も行った。図6に示すような金属配位が可能な金属錯体を設計し、脂質膜に配向させ、脂質膜の相転移温度の差を利用して、金属錯体の離合集散特性を制御

する事とした。図7のように、SOD活性相転移温度(T_m)より高い温度領域では高いSOD活性を誘導できる事が分かった。さらに、本反応で発生する過酸化水素をエタノールに転換するペルオキシダーゼ(POD)活性も検討した結果、金属錯体がクラスター化する温度領域において、POD活性が顕著に高くなる事が分かった。したがって、この温度にて反応を進めれば、効果的なone-pod反応系の構築できる事が分かった。

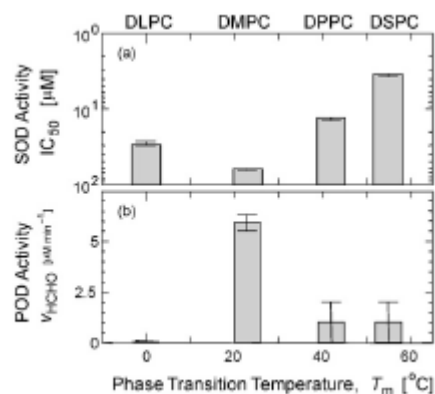


図7 SOD活性とPOD活性の脂質相転移温度との関係

このように、脂質膜界面を活用するLIPOzyme技術については、H22年度までに当初予定の成果を達成したため、担当の馬越大(大阪大)はH22年度を以って研究分担者から外れた。本LIPOzyme技術をバイオリクターとしてプロセス強化するため、吉本誠准教授(山口大)にH23年度より分担者として加わっていただき、リポソーム膜界面と内水相を活用した複数反応の共役化の技術開発を進めた。

C班:ADにおける生体膜異常化の診断/正常化プロセスの検討

各種技術とリポソーム固定化技術を組み合わせた“メンブレンチップシステム”を開発した(文献-②)。酸化ストレスによるリポソームの表面状態の変化をライブラリ上で追跡したところ、表面状態が劇的に変化する事が分かった(図8)。ライブラリー上で等価な場合、それらのリポソームは類似の特性を有していると考えられる。実際、 $A\beta$ との相互作用特性や膜流動性などの物理化学的特性が類似する事が確認された。したがって、酸化損傷膜の表面状態の詳細な物理化学的検討がなくても、ある程度の推定が可能であった。

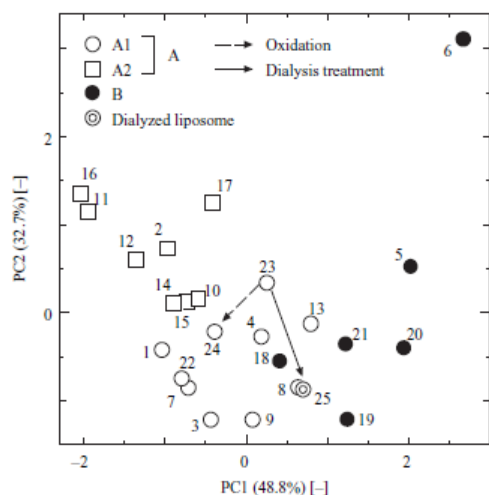


図 8 メンブレンライブラリー空間におけるモデル生体膜の酸化劣化過程のモニタリング. 図中の番号と A1, A2, B ははリポソームの種類やグループ分けを表わしている. それぞれの脂質組成は原著論文-⑧を参照の事.

そこで, 図 9 のスキームに従い, 透析モジュールへのリポソームの充填を試みた. 使用したモジュールは非対称膜構造を有しており, リポソームを間隙に物理的に充填しても trans 側に漏出する事がないという特長を有している. さらに cis 側への漏出を防ぐため, キサンタンガム/ポリエチレンイミンによるゲルマトリックス化を組み合わせた. カルセイン封入リポソームの漏出挙動に基づき, 本充填法の有効性を検討した結果, 少なくとも 1 週間は安定に充填されている事が分かった.

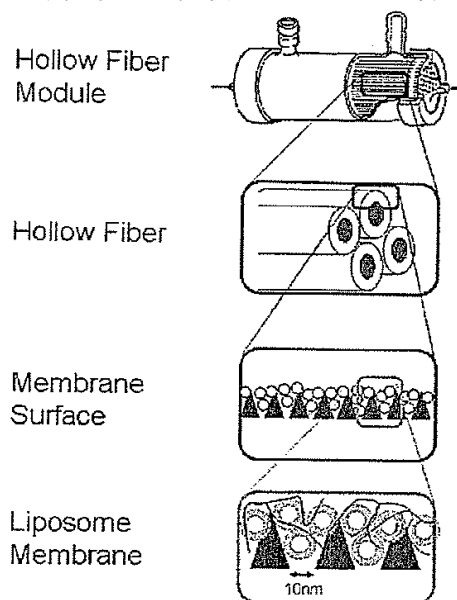


図 9 透析モジュールへのリポソーム充填スキーム(原著論文-⑪を参照の事)

各班で得られた成果を総括すると, 脂質膜の組成によりアミロイドの形成機構の詳細

を明らかにでき, その多機能性の発現も誘導できる事が分かった. 特にアミロイドの形成阻害と分解につながるドーパミン酸化反応の鍵であるプロトン移動が介在する電子移動が脂質膜の相転移挙動で制御可能である事が明らかになった. アミロイド形成や分解を制御し得る LIPOzyme を透析モジュールに充填する事で, 生体膜異常化の診断/正常化を制御するシステムの開発が原理的に可能である事が示された.

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 35 件)

主要な文献 11 報を以下に示す.

- ① T. Shimanouchi, N. Kitaura, R. Onishi, H. Umakoshi, R. Kuboi, Secondary nucleation of amyloid fibrils on liposome membranes, *AICHE J.*, 査読有, in press
- ② 島内寿徳, リポソーム固定化技術によるメンブレノミクス研究, 査読有, 生物物理, **52**, (2012)
- ③ T. Shimanouchi, R. Onishi, N. Kitaura, H. Umakoshi, R. Kuboi, Effect of Copper (II) Ion against Elongation Behavior of Amyloid β Fibrils on Liposome Membranes, *Cryst. Res. Tech.*, 査読有, **47**, 101-108 (2012)
- ④ T. Shimanouchi, R. Ohnishi, N. Kitaura, R. Kuboi, H. Umakoshi, Copper-Mediated Growth of Amyloid β Fibrils in the presence of Oxidized and Negatively Charged Liposomes, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, **112**, 611-615 (2011)
- ⑤ T. Shimanouchi, S. Sasaki, A. Hiroiwa, N. Yoshimoto, K. Miyagawa, H. Umakoshi, R. Kuboi, Relationship between the mobility of phosphocholine headgroups of liposomes and the hydrophobicity at the membrane interface: A characterization with spectrophotometric measurements, *Colloids and Surfaces B*, 査読有, **88**, 221-230 (2011)
- ⑥ H. Umakoshi, K. Morimoto, N. Yasuda, Y. Ohama, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Development of Liposome-Based Mimics of Superoxide Dismutase and Peroxidase Based on "LIPOzyme" Concept, *J. Biotechnol.*, 査読有, **147**, 59-63 (2010)
- ⑦ 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.*, 査読有, **109**, 629-634 (2010)
- ⑧ T. Shimanouchi, E. Oyama, H.T. Vu, 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)
- ⑨ L.Q.Tuan, H.Umakoshi, T.Shimanouchi, R.Kuboi: "Liposome can Act as Molecular and Metal Chaperone for Oxidized and Fragmented Superoxide Dismutase" *Enzyme Microbial Technol*, 査読有, **44**, 101-106 (2009)
- ⑩ 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.*, 査読有, **109**, 145-148 (2009)
- ⑪ H.Sugaya, H.Umakoshi, Y.Tohtake, E.Oyama, T.Shimanouchi, R.Kuboi: "Preparation of hollow fiber immobilized liposome membrane" *Membrane* **34**, 272-280 (2009)

[学会発表] (計 83 件)

主要なもの 9 件を挙げた。

- ① 島内 寿徳, 北浦 奈知, 馬越 大, 久保井 亮一, アミロイド性タンパク質の伸長挙動に及ぼす酸化リポソームの影響, 分離技術会年会(ポスター賞受賞), 2011 年 6 月, 神奈川県/明治大学生田キャンパス
- ② 島内 寿徳, 生体膜を用いるタンパク質の晶析操作～生体膜晶析～, 分離技術会年会(招待講演), 2011 年 6 月, 神奈川/明治大学生田キャンパス
- ③ 島内 寿徳, 生体膜晶析工学の創成に関する基礎工学, 日本膜学会年会(日本膜学会研究奨励賞受賞講演), 2011 年 5 月, 産技総研 東京都/臨海副都心センター
- ④ 島内 寿徳, 生体膜晶析工学: 脂質膜上におけるタンパク質のアミロイド形成, 蛋白研セミナー(招待講演), 2011 年 4 月, 大阪府/大阪大蛋白研セミナーホール
- ⑤ 馬越 大, 生体膜プロセス化学の開拓に向けて～LIPOzyme を切り口に, 化学工学会 第 42 回秋季大会 (招待講演), 2010 年 9 月, 京都/同志社大学
- ⑥ 島内 寿徳, 大西 諒, 北浦 奈知, 馬越 大, 久保井 亮一, アミロイド β タンパク質の生体膜晶析: 金属イオン共存効果, 化学工学会第 42 回秋季大会(ポスター賞受賞), 2010 年 9 月, 京都/同志社大
- ⑦ 馬越 大, リポソームが分子認識? ～Membranome の基礎概念, 日本膜学会第 32 年会 (招待講演), 2010 年 5 月, 東京/産技総研

- ⑧ 島内 寿徳, 北浦 奈知, 大西 諒, 馬越 大, 久保井 亮一, アミロイド性タンパク質の伸長挙動に及ぼす酸化リポソームの影響, 化学工学会第 42 回秋季大会(ポスター賞受賞), 2010 年 9 月, 京都府/同志社大
- ⑨ 島内 寿徳, 嶋内 直哉, 大西 諒, 西山 圭一, 馬越 大, 久保井 亮一, リポソームによるアミロイド多形性の制御, 化学工学会第 41 回秋季大会 (ポスター賞受賞), 2009 年 9 月, 広島県/広島大

[図書] (計 1 件)

H. Umakoshi, T. Shimanouchi, R. Kuboi, Development of LIPOzymes Based on Biomembrane Process Chemistry, in "Pharmaceutical Process Chemistry (Ed. T. Shioiri, K. Izawa, and T. Kono-ike)"(Wiley Interscience) (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保井 亮一 (KUBOI RYOICHI)
大阪大学・名誉教授
研究者番号: 40029567

(2) 研究分担者

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

馬越 大 (HIROSHI UMAKOSHI)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授
研究者番号: 20311772
(H22 まで研究分担者として参画)

吉本 誠 (YOSHIMOTO MAKOTO)
山口大学・医学系研究科
研究者番号: 80322246
(H23 から研究分担者として参画)

塩盛 弘一郎 (SHIOMORI KOUICHIRO)
宮崎大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 80235506
(H23 から研究分担者として参画)

(3) 連携研究者

後藤 祐児 (GOTO YUJI)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号: 40153770