

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656525

研究課題名（和文）

新規スクリーニングシステムによるアミロイド毒性変換技術の開発

研究課題名（英文）Development of control for amyloid toxicity by novel Screening system

研究代表者

島内 寿徳 (SHIMANOUCI TOSHINORI)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：10335383

研究成果の概要（和文）：アミロイドは生体膜上で増殖し，細胞毒性を誘導する．しかし，生体膜上で形成したアミロイドの増殖・毒性発現を防ぐ手段はない．本研究では，リポソームによるアミロイドの毒性変換技術（低毒性化・無毒化）の開発にチャレンジした．リポソームのライブラリーからアミロイドの毒性変換が可能な新規な脂質組成のリポソームを選抜でき，アミロイド形成阻害/分解活性を誘導可能な LIPOzyme の調製に成功し，アミロイドの毒性を低減するプロセスの構築への道筋をつける事に成功した．

研究成果の概要（英文）：Amyloid fibrils is generally propagated on biomembranes to induce the cell toxicity. Meanwhile, there is no methodology to stop the aforesaid event. In this study, we challenged the development of toxicity control of amyloid fibrils using liposomes. It has been demonstrated that liposome library could give (i) the adequate liposome with lipid composition advantageous for a control of toxicity of amyloid fibrils and (ii) LIPOzyme with the function to promote the inhibitory of fibril formation or disaggregation of fibrils. Those results have implied a possibility on the development of detoxic process of amyloid fibrils by using liposomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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，バイオリクター

1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病(認知症)は原因他パク質の線維性凝集物(アミロイド)による細胞組織の脱落が原因で起こる疾病であり，狂牛病やパーキンソン病も同じ疾病機序で起こる．特に「老人斑」と呼ばれる球状アミロイド凝集物が強い細胞毒性を有すると考えられている．

申請者らは，モデル生体膜の表面状態を精密設計することで，生理学的条件下での老人斑を人工的に作成することに世界で初めて

成功した(文科省科研費・若手研究(B)・H20~21年度)．他のグループでは，極端な条件(高濃度，60℃，pH~2 など)での人工的な作成に成功しているに過ぎなかった．このモデル老人斑にレーザーを照射すると破壊できることを示した(*J. Biol. Chem.*, **285**, 19660 (2010))．

アミロイドには多様な形態(多形)が存在する．その意味では老人斑も多形の一つである．モデル生体膜(リポソーム)により，アミロイドがねじれ，低毒性になることを見出し

た(文科省科研費・若手研究(B)・H20~21年度).
もしリポソーム共存条件下においてアミロイドの形態を制御できれば、アミロイドの毒性制御が可能になり、有効なアミロイド抑制戦略につながると期待される。そこで以下の研究計画を立案し、上記の技術的可能性を検討する。

2. 研究の目的

アミロイド毒性変換技術の構築を目指すべく、リポソームによる毒性変換を試みる。さらに、アミロイドの毒性変換だけでなく、形成環境の改善を図るためにリポソームにアミロイド形成阻害機能や断片化機能を付与する研究を開始する(LIPOzyme 設計). 得られた LIPOzyme によるアミロイドの毒性変換能と細胞毒性を検証する。

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。

毒性変換技術の開発: 既往の研究成果(Shimanouchi et al., *Membrane*, 34, 2009)にさらなるリポソームの表面特性の計測結果を追加し、データベースを拡充する。次に、アミロイドの毒性を示しやすい微視的/巨視的構造を検討する。

LIPOzyme 開発: アミロイド形成阻害効果やアミロイド断片実験に対して効果のある脂質組成を用いてリポソームを調製し、毒性変換/断片化が可能な活性部位をリポソーム膜上に提示した LIPOzyme を設計開発する。

毒性実験: アミロイド断片化により得られた断片 A β の毒性を検討するため、ヒト神経細胞の生存率を評価した。

4. 研究成果

1. リポソームによるアミロイドの毒性変換の基礎検討.

まずリポソーム固定化技術と各種分析方法を組み合わせ、リポソーム膜が関与する相互作用を系統的に分析し、データを蓄積することにより、ライブラリーの拡充を進める分析手法を確立した(原著論文-⑧). このアプローチにより、当グループが公表しているメンブレンライブラリー(50種類)の拡充を進めた。リン脂質の頭部(headgroup)の軸回転運動が作り出すダイナミクスによりリポソーム膜界面の動特性が決まる(原著論文-⑫). そこで、headgroup間相互作用の違いが膜界面特性に及ぼす影響を検討するため、リン脂質以外に

Span 80 (ソルビタンモノオリエート)からなるベシクルについても系統的に膜特性を検討しており、headgroup間相互作用が小さいほどミセル様界面になる事が分かっている(K. Hayashi et al., *Coll. Surf. B*, **87**, 28-35 (2011)). このような膜界面の極端な変化が膜間相互作用に及ぼす影響を及ぼすかを検討した結果、混合脂質組成からリポソームが膜間相互作用に有効であることが分かった(原著論文-①, ②). これらのベシクルもライブラリーに加え、新たな膜関与型バイオプロセスの設計に資する事を確認できた。

上記の知見も踏まえて、リポソーム共存条件下におけるアミロイド形成の阻害効果を検討した。アミロイド形成に影響を及ぼす事が既報(T. Shimanouchi et al., *Desal. Water Treat.*, **17**, 45-51 (2010))において推定された酸化リポソームを含む数種のリポソーム共存条件下において、アミロイド形成量の経時変化を追跡した。図1のように誘導時間(t_d)と伸長速度係数(k^{app})が脂質組成に依存する事が分かった(図1(a)). 特に負電荷/酸化脂質混合リポソームでは、顕著に t_d が短くなり、核形成が促進された事が示唆された(図1(b)).

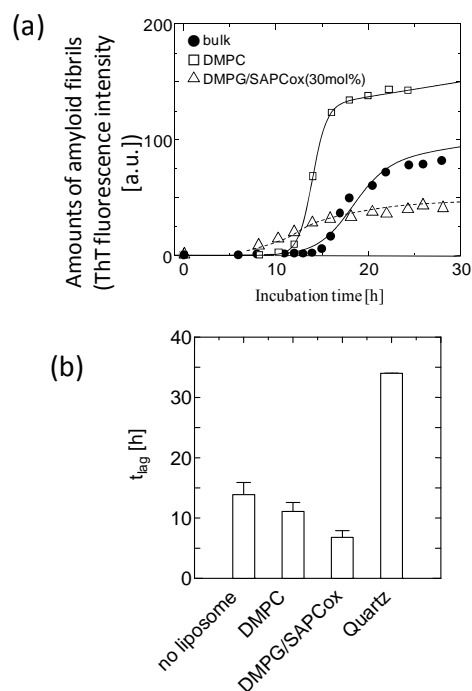


図1 (a) リポソーム共存条件下におけるアミロイド形成量の経時変化と(b)核形成時間(原著論文-⑥を参照の事)

各種リポソームが共存する場合、あみろいどの微視的な形態の違いが見られた。図2(a)のように、通常はまっすぐな線維状アミロイドであるが、アルデヒド基が脂質に含まれる場合、顕著なねじれ構造がみられた(未発表)

．また、まっすぐなアミロイドは毒性が高く、ねじれ状アミロイドの毒性は低い事が分かり、リポソームによるアミロイドの微視的構造を制御する重要性が示唆された。

一方、アミロイドの巨視的な形態についてはSEM観察や全反射蛍光顕微鏡観察などにより検討されてきた。アミロイドの形態は主に、直線かつ剛直なType Iアミロイド、球状アミロイド(Type II)、そして、短く成長したアミロイドが側方凝集したもの(Type III)に大きく分類可能である。リポソーム共存条件においても、**図2(b)**のようにType I～IIIが見られた(原著論文-⑥)。特に、AD患者の脳細胞上で老人斑がType IIアミロイドが負電荷/酸化脂質混合リポソーム共存条件において自発的に誘導される事を原著論文-⑥において世界で初めて示した。このような形態は二次核化が促進される必要がある。加えて、人為的に調製したアミロイド断片と負電荷リポソームとを混合する事でもType IIアミロイドを得た(原著論文-⑦)。したがって、アミロイドの形態に及ぼす環境条件としては、温度やpH、脂質膜や固体界面の荷電密度や疎水性、酸化脂質の含有率である事が分かった(**図3(a)～(c)**、原著論文-⑩)。

アミロイドの形態が毒性に影響する可能性がある事から、形態制御が可能なリポソームはアミロイド毒性変換のための基礎材料として利用可能である事が示唆された。

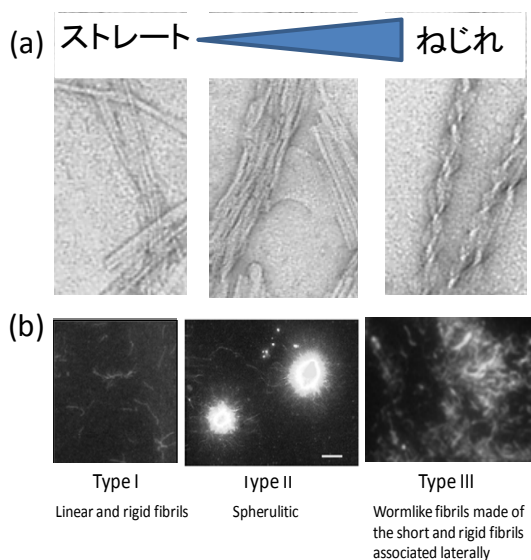


図2 アミロイドの形態。(a) 微視的構造, (b) 巨視的構造。Type I: 線維状, Type II: 球状, Type III: 短い線維が側方凝集したもの (詳細は原著論文-⑥を参照の事)

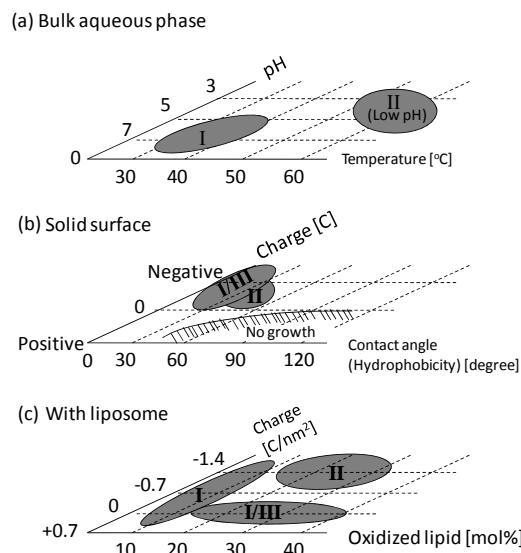


図3 溶液環境や界面物性のアミロイドの形態に及ぼす影響 (原著論文-⑩を参照の事)

2. LIPOzyme開発

アミロイドの微視的構造(ねじれの有無)をリポソームにより変化させる事が可能かどうかを検討した。いったん形成したまっすぐなアミロイドを超音波照射して断片化し、負電荷/酸化脂質混合リポソームを共存させて伸長させる操作を繰り返すと、5回の操作によりアミロイドのねじれ構造が誘導できた(**図4**)。これはリポソームによる微視的構造の転換が可能である事を示唆している。

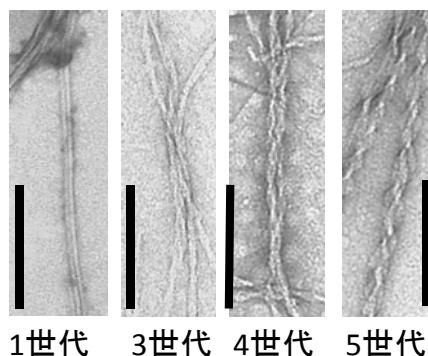


図4 リポソームによるアミロイドの微視的構造の変化

次に、アミロイドの断片化による低毒性化・無毒化を図る技術についての検討を行った。α-キモトリプシンの自己消化により得られるペプチド断片をリポソームに提示して得られるLIPOzymeの加水分解活性を検討した結果、nativeなα-キモトリプシンに及ばないものの、アミロイドの分解活性を示す事が分かった(データ未掲載, 未発表)。

次に、リポソーム共存条件において、カテ

コールアミン類によるアミロイドの断片化を検討した(原著論文-③). 図5(a)のように, リポソームによりドーパミン誘導型アミロイド断片化が加速する事が明らかになった. さらにリポソームの種類についても検討した結果, Aβ(1-40)とAβ(1-42)のいずれにおいても, 負電荷/酸化脂質混合リポソーム(entry 9)による断片化の促進効果が大きかった(図5(b)). リポソームにAβ(1-40)/Cu錯体を提示したLIPOzymeの場合, さらに断片化が促進された(データ未掲載). 以上の検討より, アミロイド断片化機能を有するLIPOzymeに求められる脂質組成や断片化促進機構について, ある程度明確になったと考えられる.

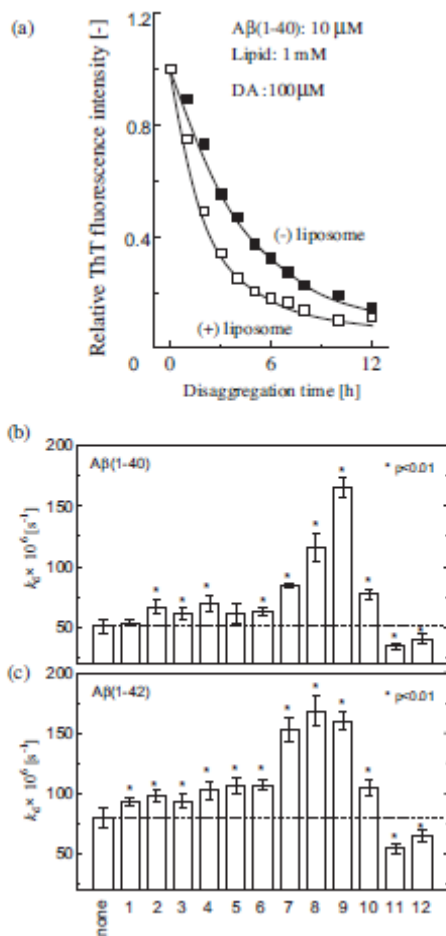


図5 各種リポソーム共存下におけるドーパミンによるアミロイド分解挙動.(a) Aβ(1-40)アミロイドの断片化過程. (b) アミロイド断片化速度に及ぼすリポソームの脂質組成の影響. 脂質組成:(1) POPC/SM (7:3); (2) POPC/CH/SM (1:1:1); (3) POPC/SM/CH/GM1 (3:3:3:1); (4) POPC; (5) POPC/CH (7:3); (6) DMPC; (7) DMPC/SA (10:4); (8) DMPC/SAPCox (6:4); (9) DMPG/SAPCox (6:4); (10) POPA; (11) DOTAP; (12) POPC/DOTAP (7:3) (詳細は原著論文-③を参照の事).

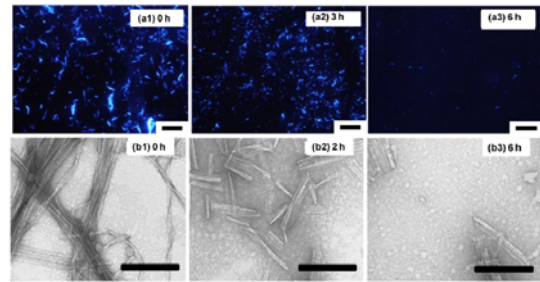


図6 Aβ(1-40)の分解過程 (原著論文-③)

アミロイド形成阻害能を有するリポソーム/銅イオン複合体を調製し, アミロイドや老人斑形成を検討した. 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. 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. したがって, リポソーム膜上の銅イオンはAβとの相互作用部位として作用し, ドーパミンが存在すると, アミロイド分解の触媒部位としても作用する. つまり, 銅イオンを提示したリポソームは, アミロイド形成阻害効果と分解機能を誘導できるLIPOzymeと捉える事ができる.

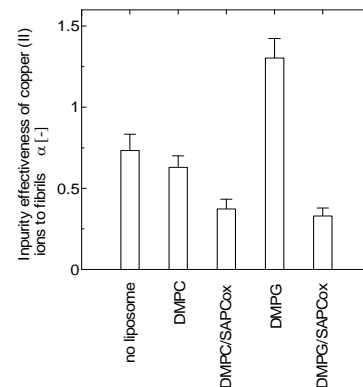


図7 各種LIPOzymeによるアミロイド形成阻害効果. 阻害定数αが大きいほど, 形成阻害効果が大きい (詳細は原著論文-⑬を参照の事).

3. アミロイド断片の細胞毒性の検討.

リポソーム非共存下ならびに中性・負電荷リポソーム共存条件で得られたアミロイドは毒性が高かった. 一方, 負電荷/酸化リポソーム共存下で得られたアミロイドは低毒性である事が分かった. また, 図5と6で得られた断片化アミロイドは通常の超音波処理のアミロイド断片よりも毒性が低く, LIPOzymeによる低毒性化を強く示唆する事が分かった(未発表).

以上を総括して, ライブラリーからアミロイ

ドの毒性変換が可能な新規な脂質組成のリポソームを選抜できた。現時点では、アミロイドの低毒性やアミロイドの断片化による低毒性化・無毒化には、脂質組成、Cuイオン、ペプチド断片、あるいはA β /Cu錯体提示が鍵である事と考えられる。

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 14 件)

- ① Toshinori Shimanouchi, Hidenori Kawasaki, Makoto Fuse, Hiroshi Umakoshi, Ryoichi Kuboi, Membrane fusion mediated by phospholipase C under endosomal pH conditions, *Coll. Surf. B*, **103**, 75-83 (2013), (査有)
- ② Keita Hayashi, Tsuyoshi Tatsui, Toshinori Shimanouchi, Hiroshi Umakoshi, Enhanced Cytotoxicity for Colon 26 Cells Using Doxorubicin-Loaded Sorbitan Monooleate (Span 80) Vesicles, *Int'l. J. Biol. Sci.*, **9**, 142-148 (2013), (査有)
- ③ Vu Thi Huong, Toshinori Shimanouchi, Daisuke Ishikawa, Tadaharu Matsumoto, Hisashi Yagi, Yuji Goto, Hiroshi Umakoshi, Ryoichi Kuboi, Effect of Liposome Membranes against Disaggregation of Amyloid β Fibrils by Dopamine, *Biochem. Eng. J.*, **71**, 118-126 (2013), (査有)
- ④ Toshinori Shimanouchi, Keiichi Nishiyama, Azusa Hiroiwa, Huong Thi Vu, Nachi Kitaura, Hiroshi Umakoshi, Ryoichi Kuboi, Growth Behavior of A β Protofibrils on Liposome Membranes and Their Membrane Perturbation Effect, *Biochem. Eng. J.*, **71**, 81-88 (2013), (査有)
- ⑤ Toshinori 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.*, **47**, 101-108 (2012) (査有)
- ⑥ Toshinori Shimanouchi, Nachi Kitaura, Ryo Onishi, Hiroshi Umakoshi, Ryoichi Kuboi, Secondary Nucleation of Amyloid Fibrils on Liposome Membranes, *AIChE J.*, **57**, 3625-3632 (2012) (査有)
- ⑦ Toshinori Shimanouchi, Naoya Shimauchi, Ryo Ohnishi, Nachi Kitaura, Hiroshi Umakoshi, Ryoichi Kuboi, Formation of Spherulitic Amyloid β Aggregate by Anionic Liposomes, *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **426**, 165-171 (2012), (査有)
- ⑧ 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, 生物物理, **52**, 154-155 (2012), (査有)
- ⑨ 馬越大, 島内寿徳, 菅恵嗣, Membranomeを基盤とするBio-Inspired膜へのアプローチ, 膜, **37**, 264-269 (2012)
- ⑩ 島内寿徳, 北浦奈知, 馬越大, 久保井亮一, 人工細胞膜上におけるアミロイド形成, 表面科学, **33(1)**, 40-46 (2012), (査有)
- ⑪ Toshinori Shimanouchi, Ryo Ohnishi, Nachi Kitaura, Ryoichi Kuboi, Hiroshi Umakoshi, Copper-Mediated Growth of Amyloid β Fibrils in the presence of Oxidized and Negatively Charged Liposomes, *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 611-615 (2011), (査有)
- ⑫ Toshinori Shimanouchi, Masashi Sasaki, Azusa Hiroiwa, Noriko Yoshimoto, Kazuya Miyagawa, Hiroshi Umakoshi, Ryo 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*, **88**, 221-230 (2011), (査有)
- ⑬ Toshinori Shimanouchi, Ryo Onishi, Nachi Kitaura, Hiroshi Umakoshi, Effect of copper (II) ion against elongation behavior of amyloid β fibrils on liposome membranes, *Cryst. Res. Technol.*, **47**, 101-108 (2011) (査有)
- ⑭ 島内寿徳, 生体膜晶析工学の創成に関する基礎工学的研究, 膜, **36(5)**, 233-239 (2011), (査有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 島内寿徳, 不均一膜組成を有する巨大ベシクルを用いたアミロイド形成現象の直接観察, 化学工学会年会, 2013年3月17-19日, 大阪大学(豊中キャンパス)
- ② 島内寿徳, 異相界面におけるタンパク質の秩序構造制御～アミロイド形成を例に, 第2回化学生命工学専攻談話会(招待講演), 2013年2月2日, 東京大学
- ③ 島内 寿徳, リポソーム膜によるアミロイドの微視的構造への影響, 膜シンポジウム, 2012年11月6-7日, 神戸大学
- ④ 島内寿徳, 脂質分子からなるダイナミックな界面へのタンパク質の分配特性, 溶媒抽出学会, 2012年11月26-27日, 石川県文化会館
- ⑤ 島内寿徳, 久保井亮一, リポソームによるアミロイドの微視的構造の評価と制御, 化学工学会秋季大会, 2012年9月19-21日, 東北大学(川内キャンパス)
- ⑥ 島内 寿徳, アミロイド形成に及ぼすリポソーム/銅(II)の影響, 分離技術会年会,

- 2012年6月1-2日, 関西大学
- ⑦ 島内寿徳, リボソーム膜により誘導されるA β /Cuアミロイドのアスコルビン酸化酵素様活性, 膜学会年会, 2012年5月8-9日, 早稲田大学
 - ⑧ 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28日, 蛋白研セミナーホール(大阪府)
 - ⑨ 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12-13日, 産技総研 臨海副都心センター(東京都)
 - ⑩ 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2-4日, 明治大学生田キャンパス(神奈川県)
 - ⑪ T. Shimanouchi et al., Amyloid fibril formation on model biomembranes, ICSST11, 2011年11月2日-5日, 済州島, 韓国

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島内 寿徳 (SHIMANOUCHI TOSHINORI)
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授
研究者番号: 10335383