

平成 2 7 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570185

研究課題名(和文)脂質膜上でのアミロイド凝集と膜動態に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of amyloid aggregation on dynamic properties of lipid membranes

研究代表者

笹原 健二(SASAHARA, KENJI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20432495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド形成ペプチドとして知られる膵島アミロイドポリペプチドとアミロイド ペプチドを平面モデル脂質膜上に吸着させ、脂質膜界面で起こるアミロイド凝集と膜動態を観察する実験系を構築した。実験系において、ペプチドの膜吸着と膜上でのアミロイド凝集反応を検出し、各反応に対して膜の流動性変化を定量化した。更に、アミロイド凝集体の膜界面への沈着に対して、ラフト成分が凝集体に取り込まれること、この取り込みに対してラフト成分の相分離挙動が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We created the experimental methodology using supported planar lipid bilayers to observe the membrane binding of two peptides (islet amyloid polypeptide and amyloid beta-peptide) and their membrane-mediated amyloid aggregation. In the experimental system, the changes of membrane fluidity were quantitatively estimated for the membrane binding and subsequent aggregation of the peptides. Furthermore, it was found that the raft components of lipids were incorporated into the aggregates that deposited into the membranes in which phase separation of the raft components were involved.

研究分野：生物学

キーワード：アミロイド 脂質膜

1. 研究開始当初の背景

近年、生体内でタンパク質が微細な線維構造(アミロイド凝集体)を形成し、病気の引き起こされる例が多く報告されてきた。アミロイド凝集体の沈着する疾患をアミロイド病と総称し、アルツハイマー病、2 型糖尿病、パーキンソン病、プリオン病など、現在、約 30 種類が知られている。タンパク質がアミロイド凝集体へと構造転移し、アミロイド病が発症又は進行する機構の解明は、蛋白質科学及び医学の分野で重要な研究テーマである。これまでの研究から、アミロイド凝集体は、1) 脂質膜存在下でその凝集核形成が促進される、2) 脂質膜の機能障害や破壊を起こすことによって細胞毒性を示す、3) 脂質成分、特にラフト成分と会合体を形成する、などが報告されている。これらの結果は、生体系でのアミロイド凝集体形成に脂質膜が大きく関与していることを示す。

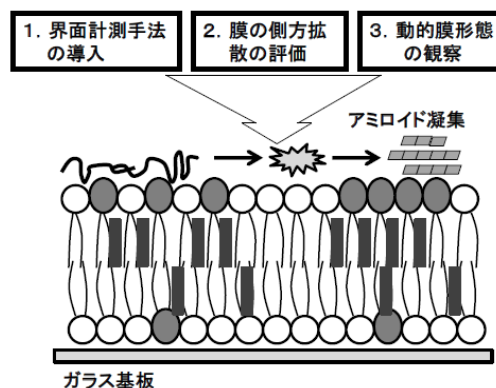
生体膜は、側方拡散で特徴づけられる流動性を持つ二重膜を構成し、ラフト形成、非対称性配向などの特性を活かして、膜タンパク質などの生体分子とダイナミックな活動をしている(動的な膜の特性・挙動をここでは“膜動態”という言葉で表す)。脂質膜上でアミロイド凝集体が形成されるとき、膜の流動性やラフト成分(コレステロール、スフィンゴ脂質)のドメイン形成といった膜動態が受ける影響についてこれまでほとんど報告がなかった。その理由として、アミロイド凝集に伴う膜の動的特性や挙動の変化、更には膜界面で起こる生体分子間相互作用を高感度に検出するあるいは観察する手法の導入が困難であったことがあげられる。この問題を解決するため、平面モデル脂質膜を導入して、アミロイド凝集体による膜の機能喪失及び構造破壊機構を“膜動態”に焦点を当て解明する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、ガラス基板上に生体膜のラフト構造を模した平面脂質二分子膜(平面モデル脂質膜)を形成し、その脂質膜上でアミロイド凝集及びそれに伴う膜動態変化を観察する実験系を構築する。アミロイド形成ペプチドとしてアミロイド ペプチド(42 残基、A と略す)と 膵島アミロイドポリペプチド(37 残基、IAPP と略す)を用いる。A はアルツハイマー病患者脳内でアミロイド凝集体(老人斑)を形成し、神経細胞に対して毒性を示す。IAPP は、2 型糖尿病患者の膵臓内でアミロイド凝集体を形成し、インスリンを分泌する細胞に対して毒性を示す。これらのペプチドのアミロイド凝集が、膜の動的な性質である流動性やラフト成分による膜ドメイン形成といった“膜動態”に及ぼす影響を明らかにする。結果をアミロイド凝集阻害研究へと発展させる。

3. 研究の方法

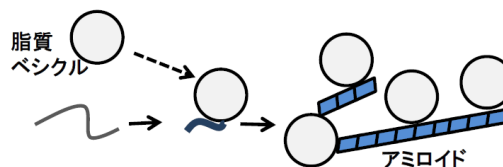
本研究で用いるガラス基盤上の二分子膜は、グリセロリン脂質 DOPC(ホスファチジルコリン)と DOPS(ホスファチジルセリン)にラフト成分としてコレステロール、スフィンゴミエリン、糖脂質ガングリオシドを加えて調製した脂質ベシクルをガラス基板上に滴下し、脂質分子の自己組織化反応を利用して形成した(ベシクル融合法)。形成された平面脂質二分子膜は、ガラス基板との間に 1-2nm の水の層を含むため、脂質分子の側方拡散を高精度で測定できる、更に膜の形態・構造変化の動的過程を、様々な界面計測手法・顕微鏡観察によって高分解・高感度で検出・観測できるという利点がある。ペプチドの膜結合、結合の速度論的挙動を水晶発振子質量分析装置(QCM-D)で解析した。ペプチドの膜結合と膜界面上でのアミロイド凝集に伴う膜流動性変化を、FRAP(Fluorescence recovery after photobleaching)法から脂質の側方の拡散係数を求め定量化した。アミロイド凝集に伴う膜形態変化を、各種蛍光色素(脂質に標識された蛍光色素、アミロイド凝集体やラフト成分のマーカーとなる蛍光色素)を用い蛍光顕微鏡で観察した(下図参照)。



4. 研究成果

(1) アミロイド凝集体の脂質ベシクルへの会合反応

IAPP、A アミロイド凝集体と(脂質組成のことなる)脂質ベシクルとの会合体形成を混合溶液の濁度の経時変化から速度論的に解析できることを見出した。生理的溶液条件下で IAPP アミロイド凝集体は、A アミロイド凝集体より脂質膜との会合性が高いことがわかった。本研究で見出した濁度測定は、各種アミロイド凝集体の脂質膜親和性を評価する簡便な手法として利用される。



(2) IAPP と A の平面モデル脂質膜への結合とアミロイド凝集

モノマー状態にある IAPP と A のラフト成分含有・非含有二分子膜結合の速度論的挙動を QCM-D で解析し、ペプチドの膜結合量がラフト成分含有膜において増加することを明らかにした。更に、ペプチドの膜結合状態から生理的溶液条件下において膜界面上でアミロイド凝集反応を起こし、凝集成長を顕微鏡で観察する実験系を構築した。

IAPP アミロイド凝集体は、凝集体形成後すみやかに脂質分子と会合体を形成し脂質膜内に沈着した。この沈着挙動は、ラフト成分含有量が増加するにつれて顕著になった。A アミロイド凝集体は、IAPP アミロイド凝集体より脂質膜との親和性は低く、膜外の水相で凝集反応を示す傾向を示した。しかし、膜中のラフト成分含有量の増加に伴い A アミロイド凝集体は膜上で形成し、その後膜内に沈着した。IAPP と A アミロイド凝集体の脂質膜への沈着は、(1)の溶液濁度変化から求めた脂質膜親和性の結果と一致した。

(3) アミロイド凝集による脂質膜流動性変化

IAPP と A の平面脂質膜結合、膜界面上でのアミロイド凝集反応に対して、それぞれの反応の前後で FRAP 法により脂質分子の側方拡散係数を求め、膜流動性変化を定量化した。ペプチドの膜結合、アミロイド凝集に伴い膜流動性が、脂質膜特有の値から 1/10 程度に大きく減少することを明らかにした。膜流動性低下の程度は、A より IAPP の方が大きく、この結果は、膜上で IAPP の方が A よりアミロイド凝集体を形成する顕微鏡観察の結果と対応した。脂質膜上でのアミロイド凝集と膜流動性の低下には相関性があり、膜流動性の観点から、膜動態への影響を明らかにした。

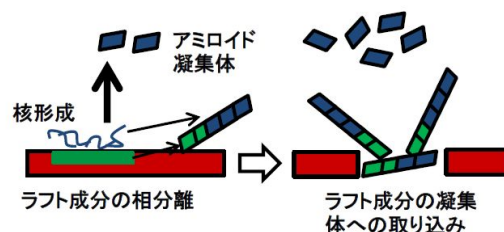
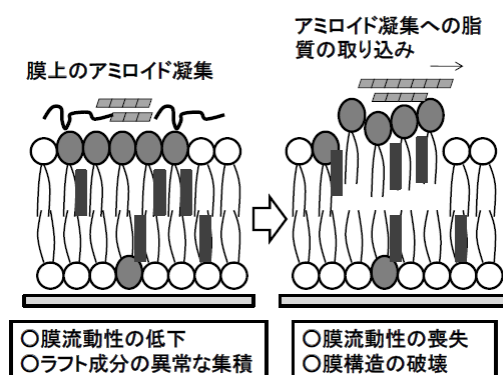
(4) A アミロイド凝集によるラフト成分の異常凝集と膜破壊

アミロイド凝集による膜破壊機構として、膜ドメインとしてのラフトの動的形成機能がアミロイド凝集により喪失し、マクロなドメイン(ラフト成分の異常凝集)となり、最終的にアミロイド凝集に取り込まれると仮定した。この仮定を証明するために、脂質膜中のラフト成分含有量・組成を変えることで、アミロイド凝集反応によるラフト成分のマクロなドメイン形成と局在化、更に膜流動性の喪失、ラフト成分のアミロイド凝集体への取り込み、膜構造破壊を包括的に観察できる実験系を構築した。

ラフト成分内の糖脂質ガングリオシドに特異的に吸着する蛍光色素を用いた観察から、膜界面上での A アミロイド凝集に伴いラフト成分がマクロな集積を起こし(相分離)、最終的にアミロイド凝集体に取り込まれることを明らかにした。

更に、ラフト成分が A アミロイド凝集体に取り込まれた直後の脂質膜の不均一性(membrane heterogeneity)を観察すること

に成功し、ラフト成分が取り込まれた脂質領域は、その周辺の領域と比べて、ラフト成分以外のグリセロ脂質に富んでいる状態(liquid disordered region)であることを明らかにした。



(5) インスリンの IAPP アミロイド凝集阻害効果

生体内においてインスリンは、IAPP とともに細胞から分泌され、血糖値をコントロールする。これまでの研究から、2型糖尿病患者のインスリン/IAPP 比は、健常者と比べて大きく低下することが知られている(インスリン分泌量の低下)。本研究で構築した実験系から、脂質膜上での IAPP アミロイド凝集(沈着)は、インスリンが存在すると著しく阻害されることを明らかにした。この結果は、インスリンは、IAPP アミロイド凝集に対して阻害効果を示し、生体系においてインスリン/IAPP 比と IAPP 凝集の関連性を示唆する。

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 5 件)

Kenji Sasahara, Kenichi Morigaki,
Yasuko Mori

Uptake of raft components into amyloid
-peptide aggregates and membrane
damage

Anal. Biochemistry in press (2015)

Kenji Sasahara, Kenichi Morigaki,
Kyoko Shinya

Amyloid aggregation and deposition of
human islet amyloid polypeptide at
membrane interfaces

FEBS Journal, 281, 2597–2612 (2014)
Kenji Sasahara, Kenichi Morigaki,
 Kyoko Shinya
 Effects of membrane interaction and
 aggregation of amyloid -peptide on
 lipid mobility and membrane domain
 structure
Phys. Chem. Chem. Phys. 15, 8929–8939
 (2013)
Kenji Sasahara, Yuji Goto
 Application and use of differential
 scanning calorimetry in studies of
 thermal fluctuation associated with
 amyloid fibril formation
Biophysical Reviews, 5, 259–269 (2013)
Kenji Sasahara, Kenichi Morigaki,
 Takashi Okazaki, Daizo Hamada
 Binding of islet amyloid polypeptide to
 supported lipid bilayers and amyloid
 aggregation at the membranes
Biochemistry, 51, 6908–6919 (2012)

〔学会発表〕(計 8 件)

笹原健二

Interaction of lipid membranes with
 amyloid

蛋白研セミナー, 2015 年 2 月 5 日、大阪

笹原健二

Microscopic observation of amyloid
 deposits associated with lipids of
 amyloid -peptide

第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9
 月 26 日、札幌

笹原健二、新矢恭子

Dynamic Association of IAPP aggregates
 with lipids and amyloid deposition

動的秩序と機能(新学術領域)第 2 回国
 際シンポジウム、2014 年 1 月 12 日、京
 都

笹原健二、新矢恭子

Amyloid deposition of islet amyloid
 polypeptide on model membranes

第 86 回日本生化学 2013 年 9 月 12 日、横
 浜

笹原健二、新矢恭子

モデル脂質膜上での IAPP アミロイド沈着

第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6
 月 26 日、鳥取

笹原健二、新矢恭子

Effects of raft components on the
 membrane-mediated aggregation of IAPP

第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9
 月 23 日、名古屋

笹原健二、新矢恭子

脂質膜上でのアミロイド凝集と膜動態に
 及ぼす影響

揺らぎと生体機能(新学術領域) 2012 年 8
 月 1 日、仙台

笹原健二、新矢恭子、森垣憲一

脂質膜上での IAPP 凝集と脂質組成の効果

第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6
 月 21 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹原 健二 (SASAHARA KENJI)

神戸大学・医学研究科・研究員

研究者番号：20432495

(2) 研究分担者

森垣 憲一 (MORIGAKI KENICHI)

神戸大学・遺伝子実験センター・准教授

研究者番号：10358179