

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860020

研究課題名(和文) 神経毒性アミロイド 凝集体構造決定と分子間相互作用解析

研究課題名(英文) Structure and molecular interactions in aggregation of amyloid beta protein

研究代表者

池田 恵介 (Ikeda, Keisuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：00553281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病患者脳内におけるアミロイド タンパク質(A β)の凝集・沈着および毒性体の形成は、疾患の発症メカニズムにおいて重要な過程であると考えられている。近年、脂質膜がA β をその表面へ集積させ、構造変化を誘導することでA β 凝集を促進することが報告されている。本研究では、A β -脂質膜間結合、脂質膜上のA β 構造変化およびアミロイド線維形成を、高い正の曲率を持つ脂質ベシクルが促進することを明らかにした。また、脂質膜の物理化学的性質の違いにより、脂質膜上のA β 構造が異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Conversion of amyloid- β (A β) protein from a non-toxic monomer into the toxic aggregates is the possible pathogenic pathways in Alzheimer's disease. Recent studies have suggested that lipid membranes play key roles in protein aggregation. However, the binding modes and the mechanisms of A β aggregation on lipid vesicles are not fully understood. Here, we observed that a high positive curvature of lipid vesicles with diameters of ~30 nm enhanced the binding of A β with anionic membranes in the liquid crystalline phase and with zwitterionic membranes in the gel phase. The binding modes of A β to these membranes differ in terms of the depth of the protein in the membrane and of the protein structure. Amyloid fibril formation of A β was accelerated in the presence of the vesicles. Our findings suggest that packing defects on membranes with high curvatures might result in the accumulation of toxic protein aggregates.

研究分野：生物物理化学

キーワード：アミロイド 脂質膜 膜曲率

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、進行性の神経変性疾患であり、その病理学的特徴は、患者脳内に蓄積する老人斑と神経原線維変化である。アミロイドタンパク質(A β)は、老人斑の主要構成成分である。A β の単量体は毒性を示さず、抗酸化作用と、神経保護作用を持つ。毒性を持たない可溶性のA β は決まった構造を持たないが、シート構造を形成してオリゴマーやアミロイド線維などの凝集物へと変換することで細胞毒性を発揮することが、AD発症の重要な段階であると考えられている。近年の研究で、A β の構造変化・凝集に生体膜を構成している脂質二重膜が関与する可能性が指摘されている。加えて、脂質膜存在下で形成されたA β 凝集体が神経モデル細胞に対して高い毒性を示すことも報告されている。しかし、脂質膜上に形成されるA β の凝集体構造や分子間相互作用の詳細については、明らかではない。また、近年新たに、脂質膜曲率がA β の凝集過程に影響を与えているとの報告がされたが、その相互作用メカニズムは未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、A β -脂質膜間相互作用の詳細を明らかにするとともに、膜上に形成されるA β 複合体構造を解析することを目的として研究をおこなった。特に、本研究では膜環境因子の一つである膜曲率に着目してA β と脂質膜の相互作用の評価を行った。

3. 研究の方法

(1) ペプチド溶液作製

40残基からなるA β -(1-40)およびA β 変異体はFmocペプチド固相合成法により合成し、逆相HPLCで精製した。精製ペプチドは、氷上で0.02% NH₃ aqに溶かした。凝集核を取り除くために、ポリカーボネートチューブ(4mm)に入れて、卓上超遠心機Optima TLXにより、527,000g、3時間、4℃の条件で遠心し、上清を分注した。液体窒素で凍らせ、実験で使用するまで-80℃で保存した。上清の濃度はMicro BCAタンパク質分析により決定した。

(2) 脂質膜調製

脂質はメタノール:クロロホルム(体積比=1:2)に溶解し、溶液をナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧留去し、フラスコ底部ガラス壁面に脂質薄膜を形成した。その後、一晚の真空乾燥にて完全に溶媒を除去した。PCの脂質薄膜には150mM NaCl, 1mM EDTAを含む10mMのTris-HCl緩衝液(pH 7.0)を加え、PGの脂質薄膜に1mM EDTAを含む10mMのTris-HCl緩衝液(pH 7.0)を加え、vortexをすることで脂質を水和させた後、凍結融解を7サイクル行った。その脂質懸濁液を孔径100nmのポリカーボネートメンブレンフィルターを

用いたエクストルージョン法によって、平面膜のモデルである粒径約100nmのlarge unilamellar vesicle (LUV)を調製した。また、脂質懸濁液に対して水上、N₂気流下で3分間の超音波処理と3分間の冷却のサイクルを複数回繰り返し、湾曲膜のモデルである粒径約30nmのsmall unilamellar vesicle (SUV)を調製し、チタン屑を12,000rpm、10minの遠心で沈殿させ取り除いた。それぞれの粒子を調製後、粒子の直径は動的光散乱法(FRAP-1000、大塚電子)によって確認した。また、PCの濃度は、Phospholipids C-テスト(Wako)、PGの濃度はリン酸モリブデン法により定量した。

(3) トリプトファン蛍光測定

蛍光測定はF-4500蛍光分光光度計(HITACHI)により行った。測定条件は、スリット幅励起2.5nm、蛍光5.0nm、励起波長280nm、蛍光波長280-450nm、フォトマル電圧700Vとした。恒温槽の温度は、DMPCベシクルでは4℃、POPCおよびPOPGベシクルでは25℃とした。四面透過石英セルに、全量2mL、A β [Y10W]またはA β [Y10W/H13K] (2.5 μ M)溶液をTris-HCl緩衝液を用いて調製した。緩衝液として脂質懸濁液と同様のものを用いた。光度計にセルを設置し、温度一定になるまで10分間静置後、蛍光スペクトルを測定した。セルを取り出し、ベシクル添加後、十分に攪拌を行い、A β とベシクルの結合が平衡に達するまで3分間静置した後測定した。以下、同様にベシクルを滴定することでLipid/Protein (L/P)比を上げていき、蛍光スペクトルを測定した。ブランクとしてサンプルと同濃度のベシクル懸濁液を測定した。散乱光の補正のコントロールとして、トリプトファン溶液(2.5 μ M)で同様に測定した。実測スペクトルからブランクを引き、300-450nmにおけるコントロールの蛍光強度の積分値で規格化した。

(4) 円偏光二色性スペクトル測定

測定には円二色性分光計J-805(日本分光)を用いた。A β (2.5 μ M)に対して、PCベシクルがL/P比=0、64、120、240、640となる溶液をそれぞれ調製し、光路長5mm、4℃、195-250nmの範囲で測定した。測定前に5分間セルを静置した。8回測定した平均値から、サンプルと同濃度のベシクル懸濁液であるブランクを差し引いた値を測定値として使用した。塩化物イオンのスペクトルへの影響を除くために、NaClをNaFに置き換えて測定を行った。POPG-SUVがL/P比=0、12、16、20、60、96となる溶液を調製し、光路長5mm、25℃で測定を行った。

(5) チオフラビン-T (ThT) アッセイ

Wild-type A β -(1-40)の濃度が15 μ Mとなるようにベシクルと混合した溶液を調製し、静置した状態で4℃または37℃において

インキュベーションした。インキュベーション時間 0、3、8、7、14、21 日の溶液を一部取り出し、その溶液と 5 mM ThT 溶液を 50 mM グリシンバッファー (pH 8.5) で希釈することで、四面透過石英セルに全量 2 mL で、A 濃度 0.5 μ M、Th-T 濃度 5 μ M となる溶液を調製した。5 mM ThT 溶液は ThT をエタノールに溶かして、吸光度を測定することで作製した。これをスリット幅 励起 2.5 nm、蛍光 5.0 nm、励起波長 446 nm、蛍光波長 490 nm、フォトマル電圧 700 V、恒温槽 25 の条件で、F-4500 蛍光分光光度計 (HITACHI) により 60 秒間の時間変化測定し、強度の平均値を得た。

(6) 透過型電子顕微鏡観察 (TEM)

チオフラビン T 蛍光により線維形成が確認されたサンプルを、2 % リンタングステン酸でネガティブ染色し、透過電子顕微鏡 (JEM-1400TC、JEOL) で観察した。

4. 研究成果

(1) 結合に対する膜曲率の影響の評価

A [Y10W] と脂質膜の結合に対する脂質膜の大きさや膜曲率の影響を評価するために、粒径約 30 nm の SUV と粒径 100 nm 以上の LUV を用いて測定を行った。ベシクルを形成する脂質として、静電的に中性な PC と陰イオン性の PG を用いた。中性でゲル相を形成する脂質膜と負電荷を持ち液晶相を形成する脂質膜とは A が相互作用するが、中性で液晶相を形成する脂質膜とは相互作用しないとの報告がある。今回の実験条件では、DMPC を中性でゲル相を形成する脂質、POPC を中性で液晶相を形成する脂質、POPG を陰イオン性で液晶相を形成する脂質として用いた。トリプトファン残基が脂質膜の疎水性領域に埋め込まれることによって、その蛍光強度の増大と最大蛍光波長のブルーシフトが起こることから、A [Y10W] は A と脂質膜との相互作用を評価するのに用いることができ、A [Y10W] も A⁻(1-40) と同様のアミロイド線維を形成するため、A の挙動を調べるための良いモデルである。A⁻膜結合を定量的に評価するために、相対的蛍光強度増加 (R 値) を定義した。それぞれの系において、蛍光強度変化を R 値と最大蛍光波長の変化から評価を行った。DMPC-SUVs を A [Y10W] 溶液に添加したところ、脂質濃度の増加に伴い蛍光強度の増大とブルーシフトが見られた。一方、DMPC-LUVs または POPC-SUVs、POPC-LUVs を A [Y10W] に加えてもスペクトルに変化は見られなかった。また、A [Y10W] に POPG-SUVs を添加したところ、蛍光スペクトルに変化が見られたが、POPG-LUVs では見られなかった。以上の結果から、今回用いた脂質膜では、A [Y10W] がゲル相にあるまたは負電荷を持つ曲率の高い膜に選択的に結合することが示された。興味深いことに、

DMPC-SUVs では L/P 比の増大に伴い R 値が上昇し続けたが、POPG-SUVs では L/P 比の増大に伴い R 値が増加した後、減少に転じた。この違いは 2 つの系で結合様式が異なることから生じているのではないかと推測した。A が DMPC-SUVs に結合し POPC-SUVs には結合しなかったことから、膜の流動性が結合に影響を与えていると考え、POPC にコレステロールを加えて膜の流動性を低下させた SUVs を用いて結合実験を行ったが、結合は見られなかった。

(2) 二次構造変化に対する膜曲率の影響

A の脂質膜上での二次構造変化を CD スペクトル測定により評価した。DMPC-SUVs と POPG-SUVs を A [Y10W] 溶液に加えることによりスペクトルの変化が観察されたことから、膜結合に伴い A [Y10W] の構造が変化したことが分かった。一方、DMPC-LUVs と POPG-LUVs、POPC-SUVs を加えた場合はスペクトルの変化が観察されなかったこれらの結果は結合実験の結果と一致した。DMPC-SUVs 存在下では、208 nm と 220 nm 付近に負の極大が観察されたことから、A [Y10W] が DMPC-SUVs と結合することでヘリックス構造を形成することが分かった。POPG-SUVs 存在下では、L/P 比が 20 以下と脂質が少ない条件だと 218 nm 付近に負の極大を示すシートリッチな構造を形成し、L/P 比が 64 以上と脂質が多くなるとヘリックス構造を形成することが分かった。以上の結果から、結合実験において POPG-SUVs を添加した場合に高い L/P の領域で蛍光強度が減少したのは、A [Y10W] の構造がストランド構造からヘリックス構造へと変化することで、13 番目のヒスチジン残基 (H13) と 10 番目のトリプトファン残基 (W10) との距離が近くなり、H13 が持つイミダゾール基の影響でトリプトファンの蛍光が消光されたことが原因であると仮説を立てた。H13 の影響を評価するために、H13 をヒスチジンと同じ塩基性アミノ酸であるリジンに置換した A [Y10W/H13K] を用いて、トリプトファン蛍光測定を POPG-SUVs に関して行った。すると、A [Y10W] とは異なり、L/P 比が大きい領域での R 値の減少が見られなくなった。また、CD スペクトルの変化は A [Y10W] と類似しており、同様の構造変化が起こることが分かった。以上の結果から、POPG-SUVs 存在下において、ストランド構造からヘリックス構造へと変化することで H13 と W10 の距離が近くなり、イミダゾール基の影響でトリプトファン蛍光が消光されたことが示唆された。一方、A [Y10W/H13K] を DMPC-SUVs に添加した際の蛍光スペクトル変化は A [Y10W] と同様であった。これらの結果から、DMPC-SUVs 上では A がヘリックスリッチな構造を形成するが、H13K 変異により R 値が増大しなかったことから、W10 と H13 を含む領域はヘリックス構造を形成していないことが示唆された。

したがって、DMPC-SUVs 上と POPG-SUVs 上で形成する A の ヘリックスの構造は異なることが明らかになった。

(3) 脂質膜存在下におけるアミロイド線維形成

アミロイド線維の形成を、アミロイドに特異的に結合することで蛍光強度が増大する色素である ThT を用いて評価した。SUVs 非存在下または POPC-SUVs 存在下(L/P 比 4-50)、37 の条件で A をインキュベーションした場合、21 日間蛍光強度が増大しなかったことから、アミロイド線維が形成していないことが分かった。POPC-SUVs 存在下、L/P 比 200 の場合はわずかに蛍光強度が増大した。DMPC-SUVs (T_m : 24) 存在下、4 の条件では 14 日間で wild-type の A の線維形成が見られなかった。そこで、37 においてゲル相を形成する DSPC-SUVs (T_m : 55) を DMPC-SUVs の代わりに用いることにした。DSPC-SUVs 存在下では、時間経過と共に蛍光強度が増大したことから、線維が形成したことが示された。L/P 比 50 において、他の L/P 比 4、20、200 と比べて線維形成がより促進された。DSPC-SUVs と同様に、37 で L/P 比 4 において POPG-SUVs でも線維形成の促進が顕著に見られたが、L/P 比 20-200 では見られなかった。また、4 では DMPC-SUVs または POPG-SUVs が存在しても、21 日間で線維形成は見られなかった。結合実験から 4 でも DMPC-SUVs または POPG-SUVs と相互作用することは明らかになっていることから、低温であることが線維形成の障害となっていると考えられる。以上の結果から、膜上の結合サイトが飽和し、A が膜上で高密度に存在することで核形成や凝集が促進され、線維形成が生じることが分かった。電子顕微鏡観察下、A アミロイド線維形成が確認された。

(4) 考察

本研究では、A -(1-40)の 10 番目のチロシンをトリプトファンに置換した A [Y10W]のトリプトファン蛍光を用いて、A と脂質膜の結合に対する膜曲率の影響を評価した。A が、DMPC-SUVs と POPG-SUVs には結合したが、それぞれの SUVs と POPC-SUVs には結合しなかったことから、A が結合するには、膜曲率が高いことに加え、ゲル相を形成するか負電荷を持つ必要があることが示唆された。高い曲率を持つことで、脂質分子の充填密度が低くなり、疎水性アシル鎖の溶媒への露出や側方圧の低下が生じること(packing defects)が、A と脂質膜の相互作用に対して重要な役割を果たすと考えられる。POPC-SUVs には A が結合しなかったことから、液晶相の packing defects の効果だけでは、A が結合するのに十分ではないことが示唆された。DMPC-SUVs と POPG-SUVs とで、R 値の最大値を比較すると、DMPC-SUVs は POPG-SUVs の約 4 倍で、かつ最大蛍光波長が

よりブルーシフトしていることが分かる。これは、A が DMPC-SUVs と結合することで、POPG-SUVs に比べて、膜中のより深く、疎水性の強い環境にトリプトファンが移行することを示している。

ラングミュアの吸着等温式を用いて DMPC-SUVs と POPG-SUVs に対する A の結合パラメーターを算出した。DMPC-SUVs と POPG-SUVs との間で、結合サイト数については差が見られたが、結合定数については明らかな差が見られなかった。Cryo-TEM 画像から、ゲル相を形成する小さな脂質膜は、多数の微小な平面膜が屈曲して形成された多面体構造を有しているとの報告がある。DMPC-SUVs では、この膜上の屈曲している限られた領域のみが結合サイトを形成しているのに対し、POPG-SUVs では脂質膜の外葉全体が結合サイトを形成していることが、結合サイト数に差が見られた理由として考えられる。また、ゲル相の屈曲した領域ではアシル鎖が溶媒へ大きく露出しており、A が膜のより深い位置へ挿入されていることが推測される。このことは、A が DMPC-SUVs と結合することで、POPG-SUVs に比べてより疎水性の強い環境に移行する結果と一致する。液晶相の packing defects の効果だけでは A が POPG-SUVs と結合できないことから、POPG-SUVs においては、A が膜の浅い位置に存在し、脂質頭部の負電荷と静電相互作用する必要があると考えられる。

CD スペクトルとトリプトファン蛍光測定から、DMPC-SUVs 上と POPG-SUVs 上では、A が形成する構造が異なることが分かった。この違いは、膜の硬さや膜表面の静電ポテンシャルなどの物理化学的性質の違いにより生じていると考えられる。高い L/P 比において、POPG-SUVs 上では W10 と H13 の領域がヘリックスを形成するのに対し、DMPC-SUVs ではその領域がヘリックスを形成しなかった。この領域は、sodium dodecyl sulfate や lyso-GM1 ガングリオシドを用いて作製した負電荷のミセル上ではヘリックスを形成しないことから、負電荷の存在だけでは膜上で形成する構造の違いを説明するのに十分ではないことが示された。37 で 14 日間のインキュベーションにより、DSPC-SUVs または POPG-SUVs の低い L/P 比での存在下において、15 μ M の A の線維形成が確認された。lag time が見られなくなったことから、核形成の段階が加速されたことが示された。DSPC-SUVs または POPG-SUVs で測定された結合親和性は POPC-SUVs の約 1000 倍であることから、A の凝集は膜上で起こっていることが示唆される。低い L/P 比では、膜上の結合サイトがほぼ飽和しており、分子間の接触が起こりやすくなることが、A の凝集を引き起こしている。膜上のその凝集した核に溶媒中の A が結合することで、線維が伸長すると考えられる。一方、高い L/P 比では、膜上で A 分子が低密度で分布することによ

て、非凝集状態の A の方が安定化されていると考えられる。

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1件)

Sugiura, Y.; Ikeda, K.; Nakano, M. High Membrane Curvature Enhances Binding, Conformational Changes, and Fibrillation of Amyloid- β on Lipid Bilayer Surfaces. *Langmuir* 2015, 31, 11549-11557. 査読有
DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03332

[学会発表](計6件)

杉浦裕樹、池田恵介、中野実
第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2015年、熊本)
高曲率膜によるアミロイド β タンパク質の膜結合、二次構造変化、凝集の促進

池田恵介

日本薬学会第135年会(2015年、兵庫)
脂質膜環境におけるアミロイド β タンパク質の構造変化と凝集

杉浦裕樹、池田恵介、中野実
日本薬学会第135年会(2015年、兵庫)
アミロイド β と脂質膜の相互作用に対する膜曲率の影響

杉浦裕樹、池田恵介、中野実
膜シンポジウム2014(2014年、兵庫)
Amyloid- β の結合様式に対する脂質膜物性の影響

杉浦裕樹、池田恵介、中野実
日本薬学会 北陸支部 第126回例会(2014年、石川)
Amyloid- β の結合様式に対する脂質膜物性の影響

杉浦裕樹、池田恵介、中野実
日本膜学会第36年会(2014年、東京)
Amyloid- β の結合様式に対する脂質膜物性の影響

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 恵介 (IKEDA, Keisuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号: 00553281