アルツハイマー病原因物質アミロイドβ線維の形成に対する非平衡分子科学的解明

所属：山形大学理学部

助成対象者：並河英紀

概要

本研究では、脳脊髄液流動を模倣したマイクロ流路システムを構築し、Aβ 線維化挙動に対する流動の役割を検証し、アルツハイマー病を非平衡分子科学という独自の視点からとらえ、Aβ 線維化に対する脳脊髄液流動の微小流動効果の明確化議論を目指した。この目的へ向け構築した非平衡マイクロ流路内にて人工細胞膜上での Aβ 線維化挙動を観察した結果、微小流動が Aβ の線維化および凝集体形成を促進することが明らかとなった。更に、微小流動下では Aβ の線維化および凝集体形成にともない細胞膜が破壊されることも実験的に確認された。以上の結果は、流動作用による Aβ 線維化の促進に加え、carpet model に基づいて Aβ が細胞膜内の脂質分子との間で水溶性ミセルを形成し、このミセルが微小流動によるせん断応力により細胞膜から脱離し、その後、細胞膜上で集合化し細胞膜へ再付着する機構によるものであることが提案された。

abstract

The self-assembly of amyloid-β (Aβ) peptides and lipids in non-equilibrium and non-quiescent cerebrospinal fluid (CSF) flow is associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Although the macroscopic role of CSF flow in removing Aβ has been revealed, the molecular mechanism through which it modulates Aβ-lipid interactions and flow-triggered cytotoxicity has not yet been clarified. Unlike most reports on Aβ-lipid interactions in equilibrium

systems, this study examined the role of biologically-relevant, non-equilibrium, non-quiescent flow in the desorption, diffusion, and integration of Aß-lipid assemblies at the membrane surface. We propose that non-equilibrium and non-quiescent flow manifolds influence the inter- and intra-molecular process of Aß fibril formation at a molecular scale and trigger the formation of amyloid-plaques at a macroscopic scale. Understanding the interactions between Aß and cell membranes under biologically relevant flow conditions could clarify the molecular origin of flow-coupled Aß peptide cytotoxicity associated with AD.

研究内容

背景

長寿高齢化社会を迎える日本に重くのしかかるアルツハイマー病患者数増加の抑制へ向け、その発症予防は喫緊の課題である。発症にはアミロイドβペプチド（Aβ）の神経細胞上での線維化が関与しているが、このAβ線維化に関し脳内を満たす脳脊髄液の「微小流動」がAß線維化を「抑制」する、または「促進」するという相反する結果が示され、発症予防へむけ混乱を極めている。この矛盾は、脳脊髄液の「微小流動」が線維化に関与していることの実験的証明が困難であることを示す一方、その明確化は脳脊髄液流動の正常化を基軸とした新規治療法・薬剤設計を期待させる。そこで本研究では、超精密シリンジ、アクティブ除振台、マイクロマニピュレーション単一分子観察顕微鏡を融合させた脳脊髄液流動模倣システムを独自に設計・開発し、流速を 1 μm/s の速度分解能にて制御・再現した脳脊髄液流動模倣マイクロ流路システムを構築する。そして、Aβ線維化に対する流動の役割を配向性制御（エントロピー項）と分子間相互作用（エンタルピー項）から議論する。本実験・議論より、アルツハイマー病を非平衡分子科学という独自の視点からとらえ、Aß線維化に対する脳脊髄液流動の微小流動効果の明確化議論を目指す。この研究目的を立案した背景には、近年の実験・理論研究により明らかとされつつある微小流動下での分子自己組織化の促進機構がある。すなわち、ペプチドなどの高分子化合物は、媒体の流れ（流束）下では分子配向性が揃い、エントロピー（ΔS_f）の低下並びに自由エネルギー（ΔG_f^*）

の増加が引き起こされる（図 1)。その結果、これら化合物の核形成速度が増加し、線維化等の自己組織化が促進される。生体内では血液・リンパ液・間質液など様々な体液が流動しており、正常な流動は物質・エネルギー代謝に重要な役割を果たしている一方、流動条件の乱れが生体高分子の自己組織化を促進・抑制し神経疾患等を誘発している可能性が示唆されている。具体的には、脊髄液流動の異常により、オリゴマー状態で Aβ ペプチドの配向が揃い核形成が促進される可能性である。そこで本研究では、自作の脳脊髄液流動模倣システムを駆使し、脳脊髄液流動異常性と Aβ ペプチド線維化異常性を定量的に評価することを目的とした。特に、流動による配向性制御（エントロピー項）と分子間相互作用（エンタルピー項）について検討することで Aβ ペプチド線維化と流動効果に関する分子科学的解明を目指し、アルツハイマー病の発症予防へ向けた分子機序解明などの基礎的知見を得ることを目指す。

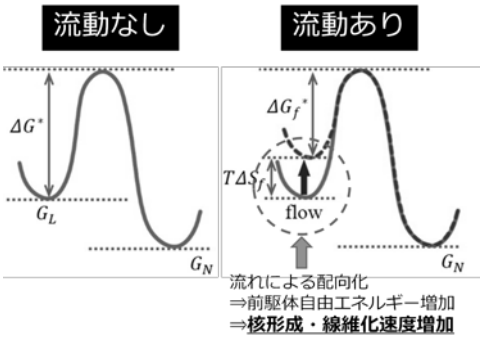

図 1. 流動による線維化エネルギーの変調(Wang et al., Macromol. 2016)による、核形成・線維化速度の増加.

結果

Aβ ペプチド線維化ならびに細胞膜との相互作用における流動作用の解明へ向け、本研究室では、超微量シリンジポンプ、温度可変ステージ、マイクロ流路、高感度カラーCCD カメラを組み込んだ蛍光顕微鏡を設計した（図 2)。具体的な実験では、まず、洗浄済みのマイクロ流路へガラス基板を固定し、温度可変ステージへとセットした。その後、シリンジポンプを用いて DMPC リポソームを流路へ導入し、ベシクルフュージョンによりガラス基板上へ DMPC 二重膜を構築した。その後、超微量シリンジポンプを用いて蛍光標識 Aβ(1-42)水溶液を流路へ導入する。蛍光標識 Aβ(1-42)水溶液で流路が満たされたのちにシリンジポンプからの供給を停止し 24 時間静置し、その後の細胞膜および Aβ ペプチド線維化を蛍光顕微鏡にて観察し

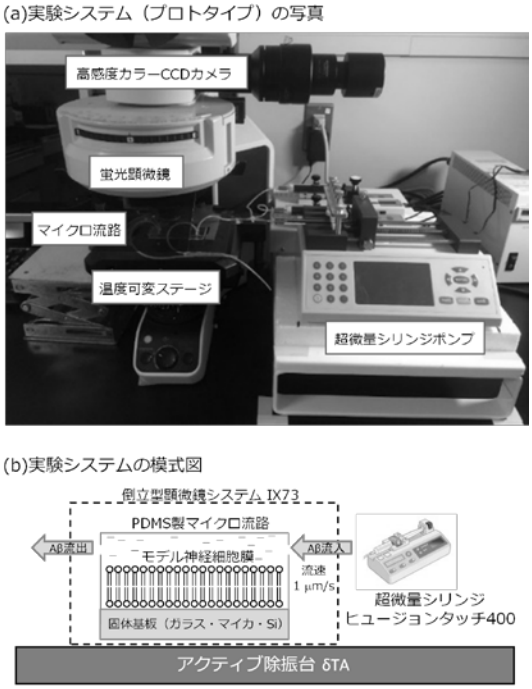

図 2. (a) 微小流動下での Aβ 線維化の実験システムの写真および(b)模式図.

たものを、「無流動系」実験とする。一方、蛍光標識 Aβ(1-42)水溶液で流路が満たされたのちも、流路内での平均流動速度が 10 μm/s となるように超微量シリンジポンプで流入を継続し同様の観察を行った場合を「流動系」実験とした。以上の二つの条件での線維化および細胞膜構造の差異を検証した。

その結果が図 3 である。図 3A および 3C には無流動系で 24 時間経過後の DMPC 膜の構造を示しているが、サブミクロンスケールの構造体が多数形成していることが確認された一方、Aβ 線維を染色している ThT に由来する青色蛍光は明瞭には観測されていなかった。また、細胞膜においてもサブミクロンスケールのポアが形成していることも確認された。一方、図 3B および 3D の流動系 24 時間後においては、10 μm を超す巨視的な凝集体が形成するとともに、細胞膜にも同様のサイズのポアが形成していることが確認された。更に、この巨視的な凝集体には Aβ 線維を染色している ThT に由来する青色蛍光が観測されており、流動条件下では Aβ 線維化および巨視的凝集体の形成が促進されていることが確認された。本結果は、**流動作用による Aβ 線維化の促進に加え、carpet model に基づいて Aβ が細胞膜内の脂質分子との間で水溶性ミセルを形成し、このミセルが微小流動によるせん断応力により細胞膜から脱離し、その後、細胞膜上で集合化し細胞膜へ再付着する機構によるものであることが提案された。**

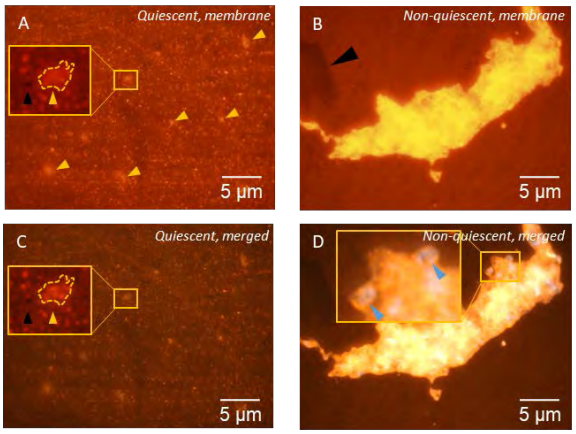

図 3. Aβ 線維化挙動・細胞膜破壊に対する流動作用.（A）と（C）は無流動系、（B）と（D）は流動系. 流動は 10μm/s となるように設定し、無流動系・流動系のいずれも Aβ 導入から 24 時間後の蛍光顕微鏡画像.（A）と（B）は細胞膜のみを染色した画像であり、（C）と（D）はその画像に Aβ 線維の青色蛍光も重ね合わせてある.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、住友電工グループ社会貢献基金からの助成を頂きました。本助成により、観察のための顕微鏡やシリンジシステムを拡張することができ、本研究を進める上で大変お世話になりました。ここに感謝を申し上げます。

本助成に関わる成果物

[口頭発表]

1. 飯田茜; 鵜浦啓; 並河英紀, 脂質膜界面でのアミロイドβ凝集に対する非平衡流動効果, 2019年日本表面真空学会学術講演会, 2019/10/28.
2. 飯田茜; 並河英紀, 脳間質液流動を想定した非平衡空間における脂質膜へのアミロイドβ凝集, 第9回　認知症研究を知る若手研究者の集まり, 2019/8/1.
3. 並河英紀, 細胞膜界面で誘起される自己組織的分子再構成：生命システムへの意義, 非共有結合系の分子科学：計測技術から探る生体分子科学の新展開, 2019/1/22.

[ポスター発表]

1. 飯田茜; 鵜浦啓; 並河英紀, 非平衡流動場における脂質膜へのアミロイドβ凝集, 第9回CSJ化学フェスタ, 2019/10/15.
2. Iida, Akane; Unoura, K.; Nabika, H, Single Molecule Observation of the Aggregation Behavior of Amyloid β Peptide under Non-equilibrium Fluidic Condition, SmaSys2019, 2019/10/10.
3. 飯田茜; 鵜浦啓; 並河英紀, Initial Process of Amyloid β Adsorption on Lipid Membrane under Non-equilibrium Fluidic Condition, 2019年度化学系学協会東北大会, 2019/9/21.
4. 飯田茜; 大内裕也; 野地美緒音; 鵜浦啓; 並河英紀, 非平衡流動場での脂質膜へのアミロイドβ吸着, 第19回日本蛋白質科学会年会, 2019/6/26.
5. 飯田茜; 鵜浦啓; 並河英紀, 脳脊髄液流動を想定した非平衡空間におけるアミロイドβ凝集, 第57回日本生物物理学会年会, 2019/9/24.
6. 安部光洋; 飯田茜; 鵜浦啓; 並河英紀, Effect of non-equilibrium flow on the interaction between amyloid beta and lipid membrane, 2019年度化学系学協会東北大会, 2019/9/22.
7. 飯田茜; 大内裕也; 野地美緒音; 鵜浦啓; 並河英紀, 非平衡流動場におけるアミロイドβペプチドと脂質膜との相互作用, 第28回　非線形反応と協同現象研究会, 2018/12/15.
8. Iida, Akane; Ouchi, Yuya; Nochi, Miona; Unoura, Kei; Nabika, Hideki, Iida, Akane; Ouchi, Yuya; Nochi, Miona; Unoura, Kei; Nabika, Hideki, Iida, Akane; Ouchi, Yuya; Nochi, Miona; Unoura, Kei; Nabika, Hideki, 2018/11/29.