

カンチレバーバイオセンサによる異種脂質膜-A β タンパク質間相互作用の検出

Detection of Interactions between Various Lipid Membranes and Amyloid Beta Proteins Using Cantilever-Based Biosensors

京都工芸繊維大学¹, 新潟大学²

○張 子洋¹, 寒川 雅之², 山下 馨¹, 野田 実¹

Kyoto Inst. Tech.¹, Niigata Univ.²

○Z. Zhang¹, M. Sohgawa², K. Yamashita¹, M. Noda¹

E-mail: zhang-zy@kit.ac.jp

【はじめに】アルツハイマー病において、凝集物が形成されるアミロイド β タンパク質(A β)の構造異常化に伴うアミロイド性凝集物の形成が症状の発現原因として指摘されているが[1]、生体膜脂質がアミロイド形成に関与している可能性が考えられており、種々の脂質膜とA β の相互作用の検出並びに特徴抽出はA β 構造異常化過程の解明に不可欠である。リン脂質二重膜からなる閉鎖系小胞(リポソーム)は、古くからモデル生体膜として利用されているが[2]、近年、我々はリポソームセンサ技術により、DPPC脂質膜とA β の相互作用を種々検出してきた[3,4]。前回、カンチレバーセンサを用いて、DPPCリポソーム脂質膜上において1 μ M程度の低濃度のA β タンパク質動態の経時変化を検出した[5]。今回は、DPPC以外の種々の脂質から構成されたリポソームをカンチレバー上に固定化し、異種脂質膜上でのA β 動態変化の評価を通じて、異種脂質膜-A β 間相互作用を検出することを目的とした。同時に、バイオ技術による同センサのA β 検出感度の向上を目指し、本研究の結果を通じてA β の認識に高い感度を持つリポソームの種類を考察、検討した。

【実験内容と結果】リポソーム固定NiCr歪ゲージカンチレバーセンサに高密封性のPDMS液滴保持構造を付加形成し、これを用いてターゲット溶液中にて24時間以上安定な測定を可能としている。今回、POPC、DPPC、コレステロール(33 at%)含有DPPCの各脂質で調製した種々のリポソーム(直径:約100 nm)を各々カンチレバー上に固定化した。その後、調製した直後のA β (1-40)水溶液(10 μ M)をターゲット溶液として各液滴保持構造に10 μ L注入し、密封後にリポソームとA β (1-40)の相互作用によるカンチレバー撓みに起因するNiCr歪ゲージの抵抗変化をデジタルマルチメータにより測定した。その結果から各脂質膜とA β (1-40)の相互作用の特徴を比較、抽出した。

Fig. 1は異種の脂質膜とA β の相互作用による歪ゲージの抵抗変化を示す。DPPC、POPCどちらにおいても、同濃度のA β との相互作用による抵抗変化の傾向はほぼ同様である。前回報告した通り[5]、9時間以下ではA β はあまり凝集せず、非凝集状態のA β は脂質膜と相互作用しないため、どちらの脂質とも抵抗はほとんど変化しない。一方9時間から約17時間までは、線維化過程のA β が両脂質膜と相互作用するため、両者の抵抗はともに大きく上昇したが、DPPCの方がより高い抵抗上昇率を示している。不飽和脂肪酸を持たない脂質分子はこれを有するものよりA β との相互作用が大きいという報告があり[6]、不飽和脂肪酸を持たないDPPCで抵抗変化が大きいという今回の結果と一致する。約17時間以降はA β の線維化が完了して両脂質膜との相互作用が小さくなり、抵抗の増加はともに減速した。一方、コレステロール含有DPPCの場合は、抵抗は5時間しか安定せず、5時間から13時間まで、抵抗の上昇率が最も高いことが分かった。この結果から、コレステロールの添加により、脂質膜上のA β の凝集進度が速くなり、また脂質膜とA β の相互作用が大きくなることが示唆された。以上より、不飽和脂肪酸を持たないコレステロール含有リポソームがより高いA β 認識感度を有することが示唆され、上記リポソーム固定カンチレバーセンサにてさらに低い濃度のA β を検出できることが期待される。

(謝辞) 本研究の一部は科研基盤A(一般)25249048、挑戦的萌芽研究26630157の助成を受けて行われた。

【参考文献】 [1] R. L. Nussbaum *et al.*: N. Engl. J. Med **384** (2003) 1356. [2] M. Dathe *et al.*: Biochemistry **35** (1996) 12612. [3] 張子洋 他: 2014 秋応物 20p-A2-5. [4] 吉川知貴 他: 2014 秋応物 19a-A3-3. [5] 張子洋 他: 2015 春応物 13a-D6-10. [6] A. Choucair *et al.*: Biochim. Biophys. Acta **1768** (2007) 146.

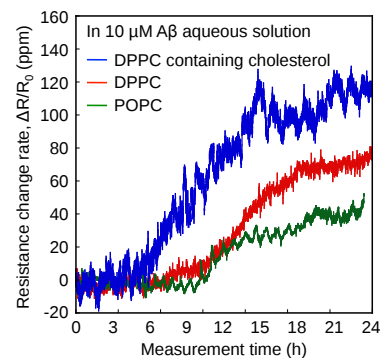


Fig. 1. Resistance change rates of cantilever immobilized with different liposomes in A β aqueous solution against time.