カンチレバーバイオセンサを用いたリポソーム脂質膜上での Aβ タンパク質動態の経時変化の検討 Time Course Investigation of Dynamic Behavior of Amyloid Beta Protein on Liposome Using Cantilever-based Biosensor 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(AD)の発症原因として、本来可溶性のアミロイドβ(Aβ)タンパク質が凝集して 不溶性の線維形成がなされて脳神経細胞に沈着・蓄積することが考えられているが[1]、Aβが脳内で異常に凝集する 過程の詳細、および凝集過程中でのAβ細胞毒性と細胞膜破壊機構についてはいまだ解明されていない。これに対す る知見は、ADの有効な予防法と根本的な治療法の研究開発に不可欠である。前回、我々は100 µMのAβ(1-40)溶液 を常温で各9、12、15、18、21、40時間静置して自然に凝集させ、各凝集段階のAβとリポソームの相互作用をNiCr 歪ゲージカンチレバーセンサにより検出、検討し、リポソーム(模擬生体細胞膜)の存在しない溶媒中でのAβの凝 集過程と各凝集状態のAβの特徴も明らかにした[2]。今回、リポソーム上でのAβタンパク質の凝集・線維伸長を伴 うAβタンパク質とリポソーム脂質膜の相互作用の経時変化をカンチレバーセンサで測定した。また、本手法により AD 早期診断技術の開発へ貢献するために、AD 患者血液中の通常のAβ 濃度である 200 nM と同程度の低濃度Aβの 検出を目標としている。

【実験内容と結果】前回報告したPDMS液滴保持構造付きリポソーム固定 NiCr歪ゲージカンチレバーセンサ[2,3]において、本研究ではターゲット溶液 (約10 µL)を液滴保持構造に入れた後、液滴保持構造と硬化済PDMSカバ ーの間を未硬化のPDMSで封止することにより、液滴保持構造と蓋の密封性 を高めた。Fig. 1は24時間静置前後における液滴保持構造中のターゲット溶 液の写真を示す。24時間経過後も溶液の量を十分維持でき、カンチレバーが 同溶液へ完全に浸漬していることを確認した。これより24時間以上安定な測 定が可能であると考えられる。次にAβ検出実験として、0.1 wt%のアンモニ ア水で調製したAβ(1-40)溶液(Aβの濃度:1 µM、10 µM、100 µM)を対象と して準備した。調整直後のAβ(1-40)溶液でカンチレバーを浸漬し、各濃度の Aβ(1-40)とカンチレバー上に固定化したリポソームの相互作用をNiCr歪ゲ ージの抵抗変化により24時間測定した。

Fig. 2 は純水中、各濃度の A β (1-40)溶液中でのカンチレバーセンサの抵抗 変化 ($\Delta R/R_0$)を示す。まず、抵抗値は純水中では経時的に安定しているこ とが確認された。次に A β (1-40)溶液中においては、濃度に関わらず、最初の 9 時間は抵抗がほとんど変化していない。この結果は前回の結果とよく一致 しており、9 時間以下では A β (1-40)は DPPC リポソームと強く相互作用でき る A β 凝集体になっていないことが示唆された。これとは対照的に、9 時間 以降全ての A β (1-40)溶液中での抵抗は時間の増加とともに増加した。この結 果から 9 時間以降 A β (1-40)はリポソーム上で凝集、線維伸長することが考え



Fig. 1. Cross-sectional photographs of the droplet-sealing structure with sealed target solution, a) as sealed and b) after 24 h.



られる。また、抵抗の増加率は A β (1-40)の濃度に依存し、特に今回は 1 μ M という低濃度 A β を検出できることが確認できた。さらに、約 17 時間以降、各 A β (1-40)溶液中での抵抗は飽和した。このことから、約 17 時間後リポソーム上での A β の線維化が完了したと考えられる。前回の結果[2]との比較からは、リポソームの存在により、A β 線維化の時間が短くなることが分かった。以上より、今回改良されたカンチレバーセンサを用いてリポソーム脂質膜上での A β タンパク質動態の経時変化を測定、評価でき、目標濃度 200 nM に至れる低濃度 A β の検出可能性が示唆された。(謝辞)本研究の一部は科研基盤 A(一般)25249048 の助成を受けて行われた。

【参考文献】[1] J. Hardy et al.: Science 297 (2002) 353. [2] 張子洋他: 2014 秋応物 20p-A2-5. [3] 張子洋他: 電気学会バイオ・マイクロシステム研究会 BMS-14-029.