

Au 電極上固定化リポソーム表面での α シヌクレインの凝集・線維化の液中 AFM 観察

Observation of aggregation and fibrillization of α -Synuclein on liposomes immobilized on Au electrode surface by AFM in liquid

京工繊大・電気電子¹, 京都大・医²

○(M2) 小林 亮子¹, 澤村 正典², 山門 穂高², 野田 実¹

Kyoto Inst. Tech.¹, Kyoto Univ.²

○R. Kobayashi¹, M. Sawamura², H. Yamakado², M. Noda¹

E-mail: m9621026@edu.kit.ac.jp

【はじめに】

パーキンソン病の原因物質である α シヌクレイン(α Syn)は通常単量体 (モノマー) から凝集, 線維伸長し, 重合体 (オリゴマー, フィブリル) に変化することで神経毒性を獲得する。我々はリポソーム固定化カンチレバーセンサを用いた α Syn フィブリルの検出技術を開発し, さらに α Syn 単量体を加えて α Syn フィブリルを増幅させることにより, マウス由来 α Syn フィブリルにおいて数百 fM レベルでの高感度検出が可能であることを示してきた[1,2]。上記センサでは, 生体分子同士の相互作用により生じる応力を検出することができるため, α Syn の凝集過程を検出できると考えている。一方で, カンチレバー表面上での α Syn の凝集・線維化現象自体は定性的・定量的に観測されていなかった。本研究では, 上記センサ測定系であるカンチレバーAu 表面上に固定化したリポソームとターゲット分子である α Syn フィブリルの相互作用の状況を液中 AFM 装置を用いて観察を行った。

【実験内容と結果】

Si MEMS プロセスにより形成したカンチレバーセンサチップ内でカンチレバー表面近傍の同一表面材料を有する箇所 Au 薄膜, SAM(Self-Assembled Monolayer)を順に形成し, その上に人工細胞膜リポソーム(脳細胞膜モデル)を固定化した測定試料を作製した。それを液中 AFM 装置に設置し, 最初に PBS 2 mL 中で基板表面を測定した。その後 α Syn モノマー 35 μ M 100 μ L, フィブリル 70 μ M 100 μ L を添加して一定時間経過後に測定を行った。

PBS 中で観察したところ, 球形 20 nm 程度のリポソームが観察された (Fig. 2 左)。今回表面高さが均等ではなく, 部分的にリポソームが形成されていないような形態が見られた。この原因としてチップ表面の塗布性絶縁膜の表面粗さに関係すると考えられた。 α Syn 添加後 30 分では添加前と比べ, リポソームの球形分布とは明らかに異なる線維状の形態が観察された (Fig. 2 右)。測定後 30 分で長さ 50 nm 程度の線維状となっていることから, α Syn の凝集はかなり速く生じることが示唆された。(実験に協力頂いた京都大学ナノテクノロジーハブ拠点岸村眞治氏, 高橋英樹氏に感謝する。本研究の一部は科研 19K22964, 20H00663 の助成を受けて行った)

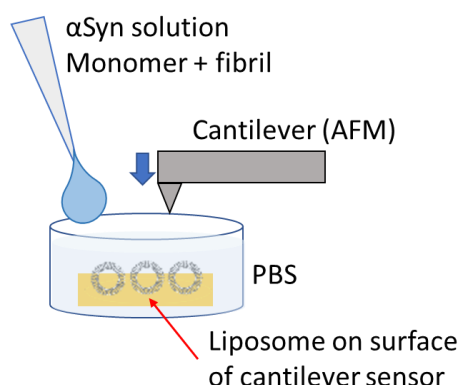


Fig. 1 An illustration of AFM measurement of α Syn behavior on the liposome immobilized on Au surface of cantilever sensor.

【参考文献】

- [1] 小林亮子 他 : 2019 秋応物 19a-E203-1
- [2] R. Kobayashi et al. : IEEE SENSORS 2019, C3L-A-2, 1274

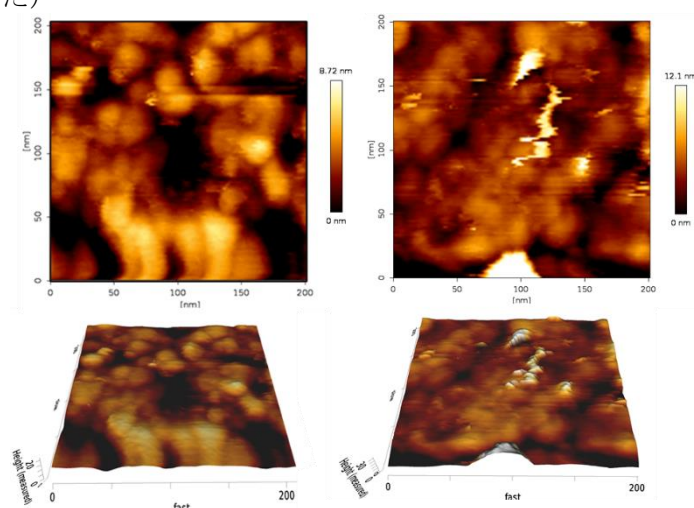


Fig. 2 AFM images (upper: height, lower: birds-eye view: 200 nm $\times$ 200 nm) of liposomes immobilized on Au surface of cantilever sensor (left: in PBS, right: after addition of α Syn (monomer 35 μ M, fibril 70 μ M) in PBS).