

ヒト血清溶媒リポソーム—各種タンパク質間相互作用の誘電分散解析

Dielectric Dispersion Analysis of Interaction between Proteins and Liposome Suspended by Human Serum

京工繊大¹, 岡山大² ○吉川 知貴¹, 張 子洋¹, 島内 寿徳², 山下 馨¹, 野田 実¹

Kyoto Inst. of Tech.¹, Okayama Univ.² ○Tomoki Yoshikawa¹, Ziyang Zhang¹, Toshinori Shimanouchi²,

Kaoru Yamashita¹, Minoru Noda¹

E-mail: m4621044@edu.kit.ac.jp

【はじめに】アルツハイマー症の原因物質とされているアミロイドβ(Aβ)は、生体内または生体外において結合(凝集)することにより、分子鎖を形成する(線維状態となる)ことが知られており、従来からそのメカニズムならびにAβが生体内に及ぼす影響等が研究されてきている。一方、我々は以前誘電分散解析(Dielectric Dispersion Analysis: DDA)を用いて、人工細胞膜リポソームとAβ間に発生する相互作用の検出を行うことにより、Aβ線維が伸長する過程を部分的に検知できる可能性を指摘してきた。しかしながら、元来Aβは主に患者の脳髄液、血液に含まれることが知られているため[1]、ヒト血清を溶媒とした環境下でAβを検知可能か否かということが、バイオセンサとして実用化するための重要な要素となり得る。本研究では、ヒト血清中でのリポソーム—Aβ間相互作用をDDAを用いて検出することを目標に、まずヒト血清中に含まれる各種血清タンパク質とリポソームとの間に生じる相互作用を、DDAにより評価検討した。

【実験内容・結果】ヒト血清には100種類以上の血清タンパク質が含まれているが、最も代表的なものとして、ヒト血清アルブミン(HSA)と免疫グロブリン(Ig)の2種類が存在する。HSAとIgは、血清タンパク質の中でも大多数を占める(健常者の場合、HSAとIgはそれぞれ総タンパクの約60%, 35%)ため[2]、これらのタンパク質とリポソームとの相互作用を知ることが血清を溶媒とする上で最も重要となる。本実験ではリポソーム脂質膜を構成する脂質としてDPPCを使用した。血清を添加した際にリポソーム脂質膜内外の浸透圧の差によりリポソームが崩壊するのを防ぐため、リポソーム内部にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を封入し、脂質膜内外のNaCl濃度が一定となるようにした。その後、ヒト血清を添加して二者の相互作用をDDAにより確認した。まず純水、PBS、ヒト血清、ならびにヒト血清を溶媒としたDPPCリポソーム(30 mM)の誘電分散特性の測定結果をFig.1に示す。Fig.1の低周波部分(1GHz以下)に着目すると、純水の場合を除いて誘電率が急激に低下しているのが確認された。NaCl存在下では、溶媒の双極子モーメントの希釈化や、溶液中の脱分極等が進むことによって低周波側の誘電率がNaCl濃度の増加とともに小さくなることが示唆されており[3]、PBSや血清に含まれているNaClが今回測定した特性曲線に大きな影響を与えている可能性が考えられた。さらに、1GHz以上の領域に着目すると、主にヒト血清を溶媒としたリポソームの特性曲線に関して、領域I、IIの2箇所誘電緩和が検出された。我々の従前検討結果から、それらがいずれも主にリポソーム脂質膜表面に束縛されている水和水に由来している可能性を指摘している[4, 5]。この水和水の動態が変化することによる誘電緩和幅($\Delta\epsilon$)の変化が、リポソーム—外来タンパク質間相互作用のマーカーになり得る可能性を以前我々の研究で指摘することができたため、本実験ではこれらの誘電緩和に着目し、リポソーム—血清タンパク質間相互作用を検出した。

本実験では、DPPCリポソーム溶液(50 mM)にヒト血清を添加し、濃度が30 mMとなるまで希釈したのち、溶液を20℃で放置しつつ1, 2時間経過ごとに溶液をDDA測定し、検出される誘電緩和幅の経時特性を求めた(測定周波数範囲は45~6000 MHz、測定時間は0~22時間とした)。領域I、IIで観測された誘電緩和幅の経時特性を各々Fig.2に示す。その結果、いずれの領域に関しても、添加後22時間が経過しても誘電緩和幅変化はほぼ±0.1以下に抑えられているのが確認された。相互作用発生後のリポソーム—血清タンパク質凝集体は、二者間の相互作用の強弱によらず安定した挙動をとる可能性が指摘されており[6]、この報告結果が今回の測定結果に明確に現れていることが確認された。今後、この血清溶媒のリポソーム溶液に検知対象としてAβを添加し、Aβとリポソームとの相互作用ならびにAβの動的変化が把握できるかどうかを検討する。

【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] G.G.Glenner *et al.*, Biochem.Biophys.Res.Comm., 120 (1984) 885 [2] 杉山 宗平, 日本消化器病学会雑誌 第75巻 第4号 (1978) 438 [3] K.Nortemann *et al.*, J Phys.Chem.A 101 (1997) 6865-6866 [4] 高田 他 2012 春応物 16a-F1-4. [5] 吉川 他 2014 春応物 19a-E17-5. [6] Juan Sabin *et al.*: J Phys.Chem.B 113 (2009) 1660

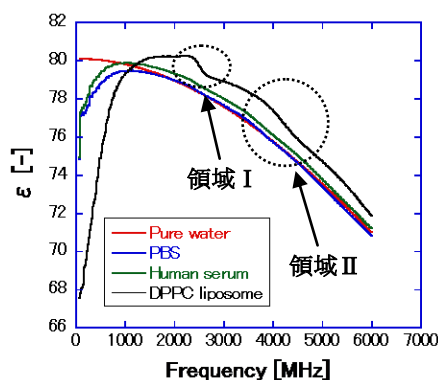


Fig.1 各溶液の誘電分散特性

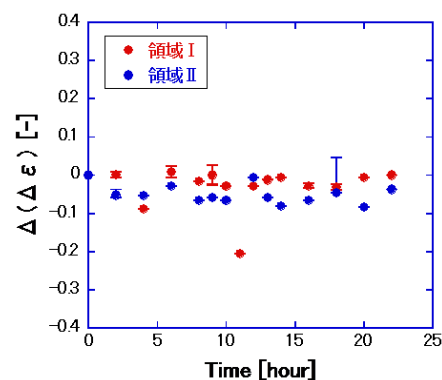


Fig.2 血清溶媒DPPCリポソーム溶液の各領域での誘電緩和幅 ($\Delta\epsilon$) 変化