1D02

油/水界面でのコンゴーレッド凝集に基づいた組織学的アミロイド凝集の簡略化モデルの作成

（東京理大薬[1]，東京理大総研[2]）
○和田 崇[1]，飯島 羽[1]，遅沢 周亮[1]，南 賀子[1]，島田 洋輔[1,2]，後藤 了[1,2]

Creating a Simplified Model of Histological Amyloid Aggregation Based on Congo Red Aggregation at the Oil / Water Interface

(Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci.[1], Res. Inst. Sci. Tech., Tokyo Univ. Sci.[2])
○Takashi Wada [1], Tsubasa Iijima [1], Syusuke Osozawa [1], Yoshiko Minami [1], Yohsuke Shimada [1,2], Satoru Goto [1,2]

［背景］アルツハイマー型認知症、BSE、リウマチなど30種類以上のアミロイド関連疾患は、タンパク質の自己組織的な凝集によりアミロイドが形成されて誘発される。アミロイド線維はタンパク質の種類や分子量によらずクロスβシートを基本とする構造をもつ。アミロイド線維の形成は物質の結晶形成に類似しており、アミロイド核の形成と伸長反応の 2 段階からなる。アミロイド線維は分子間相互作用によって強固に安定化されており、体内の細胞に凝集・沈着するとされるが、アミロイド凝集の原子レベルでの形成機構や、核形成反応の詳細は不明である。アミロイド線維と相互作用すると考えられるコンゴーレッド（CR, Fig.1）はアミロイド線維を特異的に染色し、アミロイド線維形成の阻害作用を持つとされている。また酸性水溶液中のCR同士が凝集・会合し、リボン状ポリマーを形成すると考えられている。我々はアミロイド核形成を引き起こすタンパク質の凝集機構とCRの凝集機構に何らかの物理化学的共通性があると仮定し、溶液中のpHおよび全てのイオンの指標であるイオン強度（J, Eqn.1 ）を変化させ、生体内環境のモデルとして油/水界面におけるCRの凝集のメカニズムを解明した。これとアミロイド線維を形成するタンパク質として、多くの実験に用いられるヒトインスリン（rHI）やニワトリ卵白リゾチーム（HEWL）溶液中のpHやJによる変化を比較し、凝集機構を検討した。

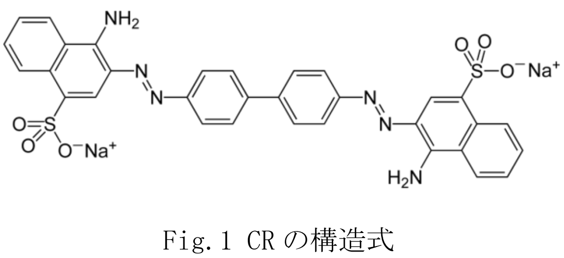

Fig.1 CRの構造式

$$J = \frac{1}{2}\sum mz^2 \qquad (1)$$

m：イオンのモル濃度
z：イオンの価数

［実験］様々なpHやイオン強度の緩衝液中におけるCRを緩衝水溶液/1‐オクタノール分配系の分配係数を測定した。イオン強度調整にはNaCl溶液を用いた。またrHI やHEWLについても同様に、pHやイオン強度を調整し、チオフラビンT(ThT)の蛍光によるアミロイド線維形成評価と、走査型顕微鏡（SEM）により凝集機構を検討した。

［結果・考察］CR の凝集は pH やイオン強度(J)に大きく影響を受けた。pH 3.0 以下では両性イオン型の CR の二量体が凝集して青色になった pH 4.0、5.0 では両性イオン型とアニオン型の CR が 1：1 で反応して、紫色になった。pH 6.0 以上ではアニオン型と水のエマルジョンが形成された（Fig. 2）。また J 増加によって凝集が促進されたのは、$[Na^+]$によってアニオン型の CR の負の静電的反発が弱まったためだと考えられる。以上より pH や J の条件によって CR の凝集体形成凝集を制御可能であることが示された。pH 6.0 以上において J=0.17 以下でのみエマルションが観察された点については議論の余地がある。

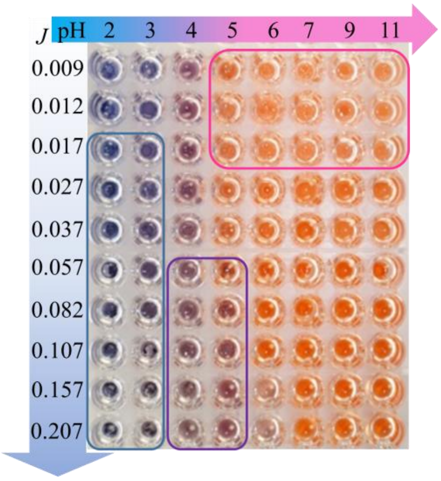

Fig. 2 各 pH, Jにおける CR 凝集

加熱処理した rHI や HEWL 溶液においても CR 同様に pHやJが凝集に影響を与えた。pH 2.0 ではJ増加に比例してアミロイド線維形成がした（Fig. 3）。それに対して pH 7.0 では J=0.02 においてアミロイド線維形成が最大となった(Fig. 4)。また SEM で観察した rHI の画像においても pH 2.0 では堅いアミロイド凝集を形成した。一方、pH 7.0、J=0.02 では柔らかい凝集を形成した(Fig. 5, 6)。これは pH や Jを変化させたことで、それぞれのタンパク質の電荷が変化したためであると考えられる。以上より rHI や HEWL の凝集も pH や Jによって影響を受け、それぞれ特異な凝集機構を有することが示唆された。これらの実験結果から CR とアミロイドにおける疎水的分子間相互作用の共通性が見出され、物質の構造や分子量の大小に関わらず、溶媒や物質の電荷が特異な凝集機構を誘導することが示唆された。

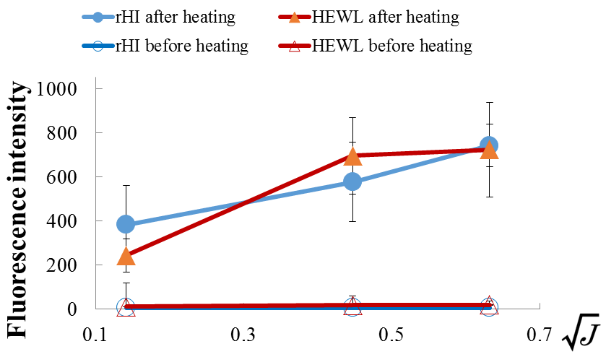

Fig. 3 pH 2.0 における rHI、HEWL の ThT 蛍光強度

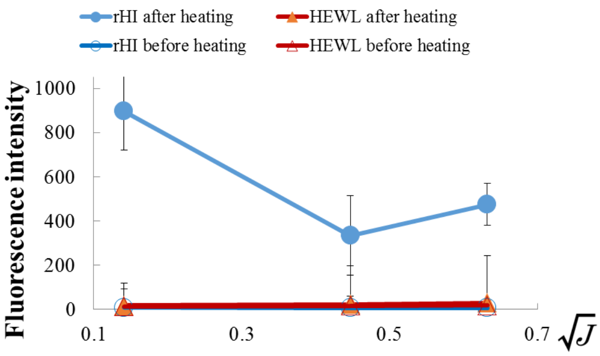

Fig. 4 pH 7.0 における rHI、HEWL の ThT 蛍光強度

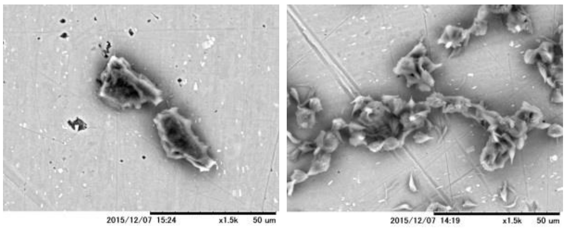

Fig. 5 pH 2.0 における rHI の SEM 画像（左 J=0.02 右 J=0.40）

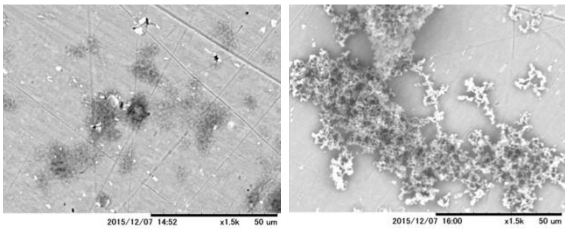

Fig. 6 pH 7.0 における rHI の SEM 画像（左 J=0.02 右 J=0.40）