

1P053

ヒトインスリンにおける低密度の表面電荷と粒子間反発減少に 起因するアミロイド形成促進

東京理大・薬

○笠井 崇央, 和田 崇, 阪口 知代, 南 賀子, 島田 洋輔, 大塚 裕太, 後藤 了

Elucidation of amyloid formation in human insulin due to reduction of surface charge density and interparticle repulsion

○Takahiro Kasai, Takashi Wada, Tomoyo Sakaguchi, Yoshiko Minami,
Yohsuke Shimada, Yuta Otsuka, Satoru Goto
Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ Sci.

【Abstract】 Insulin is reported to one of the proteins forming amyloid. Amyloid has been observed in patients with type II diabetes and during the course of normal aging, as well as after subcutaneous insulin infusion or repeated injection. Amyloidogenic proteins form amyloid through misfolding, nucleation and nuclear elongation. However, the mechanism of misfolding has not yet been elucidated. Human insulin is solubilized by forming colloidal particles in the blood, but some factor contributes to the formation of amyloid. Therefore, in this study, focusing on the pH and ionic strength related to the dispersion stability of colloidal particles, we investigated the factors forming amyloid by controlling pH and ionic strength. As a result, amyloid was not formed at high pH, but it was remarkably formed at low pH and high ionic strength. This suggests that the surface charge of insulin contributes to amyloid formation.

【序】

ヒトインスリン (HI) は、糖尿病患者等におけるインスリン製剤投与時に、稀にアミロイドを形成するタンパク質である[1]。アミロイドはタンパク質のミスフォールディングによって形成される線維状タンパク質であり、30種類以上の疾患に関連するとされる[2]。HIのアミロイド形成過程において、ミスフォールディング、核形成、伸長を経て形成するが、その凝集機構は未だに解明されていない。HIは血中でコロイド粒子を形成し可溶化しているが、凝集によりアミロイドが形成する。低分子化合物を添加してアミロイド形成を阻害する研究がされている。代表的なアミロイド形成を阻害する低分子化合物として、ターメリックから抽出されるクルクミンやお茶に含有するケルセチン(QCT)[3]、酸化還元剤であるジチオスレイトール(DTT)[4]が挙げられる。本研究では、線維形成に先立ち、粒子間反発と表面電荷によって支配される凝集過程がアミロイド形成に重要であることを見出し、これに対する低分子化合物の影響を測定することで新たな機構の阻害剤の開発を模索する。

【方法】

種々の pH とイオン強度 (J) における HI の凝集実験は、NaCl でイオン強度を調整したクエン酸-リン酸緩衝液を用いて HI 溶液を調製した。低分子化合物の添加実験は、上述の調製に加えて更に QCT 或いは DTT を添加した。45 分間 90°Cにおける

静置及び 30 分間室温での振盪の過程を 3 サイクル行った。励起波長 430 nm でチオフラビン-T (ThT)による蛍光測定を行った。

【結果・考察】

アミロイド特異的に結合し、波長 480 nm で蛍光を発する ThT を用い、種々の pH 及びイオン強度に対する HI の凝集実験を行ったところ、高 pH 下においては蛍光変化がなかったが、低 pH かつ高イオン強度下では蛍光増大が観察された (Fig.1). $pH > pI$ では、アミロイドが形成しなかったが、 $pH \leq pI$ ではイオン強度依存的にアミロイドが形成した。このことより、 pI 前後の pH でアミロイド形成量が全く異なるため、HI の表面電荷の違いがアミロイド形成に寄与すると示唆された。ここで、 $pH \leq pI$ におけるカチオンのイオン半径は、 $pH > pI$ のアニオンのイオン半径よりも大きいと考えられることから、表面電荷密度が小さいカチオンにおいて凝集力が強いことがアミロイド形成促進に寄与したと考えられた。また、イオン強度依存的にアミロイド形成量が増加したことから、DLVO 理論に従い、コロイド粒子間の反発力減少によりアミロイド形成が促進したことが示唆された。

この実験を応用した、QCT 添加時のアミロイド形成量は、QCT 濃度依存的に減少した (Fig. 2)。この結果は、先行論文で報告されたウシインスリンに QCT を添加した際の結果に一致し、アミロイド形成阻害効果を示した [3]。DTT 添加時のアミロイド形成量は、DTT 濃度依存的に減少した (Fig. 3)。この結果は、HI 同様にアミロイドを形成する鶏卵白リゾチームの論文で報告された、DTT 添加によるアミロイド形成抑制の結果 [4] と一致し、再現性が保証された。アミロイド形成阻害するこれらの化合物を用いて構造的要因の探索を行い、アミロイド形成を阻害する必要因子についても報告したいと思う。

【参考文献】

[1] R. Jeremy Woods *et al.* *Journal of Diabetes Science and Technology*. **6**, 2 (2012)
 [2] Jean D. Sipe *et al.* *Journal of Structural Biology*. **130**, 88–98 (2000)
 [3] Wang, J. B. *et al.* *Biochem. Biophys.* **415**, 675–679 (2011),
 [4] Steven S.-S. Wang, *Eur Biophys J.* **39**, 1229–1242 (2010)

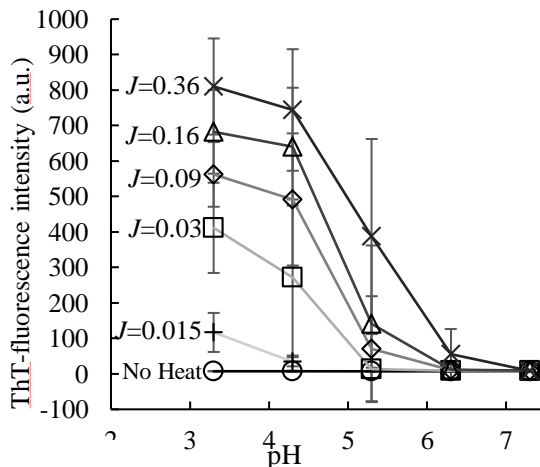


Fig. 1 Amount of amyloid formation relative to pH and J

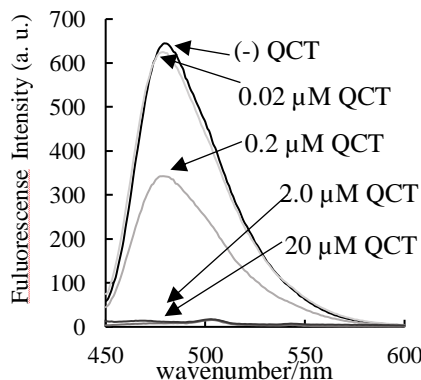


Fig. 2 Amount of amyloid formation by addition of QCT (0.3 mg/mL rHI solution, pH 4.3, J=0.16)

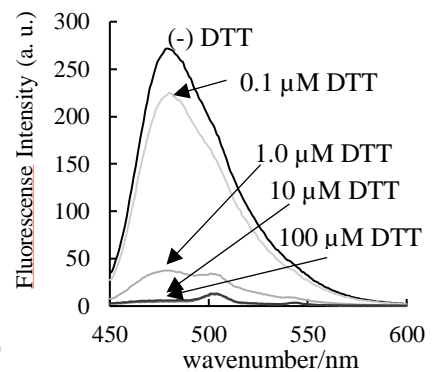


Fig. 3 Amount of amyloid formation by addition of DTT (0.1 mg/mL rHI solution, pH 4.3, J=0.16)