

課題番号 : F-19-KT-0130  
利用形態 : 技術補助、機器利用  
利用課題名(日本語) : 脂質膜リポソーム上プリオン様タンパク質の動態変化  
Program Title(English) : Change in molecular dynamics of prion-like protein on phospholipid liposome  
利用者名(日本語) : 小林亮子、野田実  
Username(English) : R. Kobayashi, M. Noda  
所属名(日本語) : 京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科 電気電子工学系  
Affiliation(English) : Electronics, Graduate School of Sci. and Eng., Kyoto Inst. Tech.  
キーワード/Keyword : 分析、カンチレバー、バイオ&ライフサイエンス、液中 AFM

## 1. 概要(Summary)

認知症の中でもパーキンソン病はアルツハイマー病に次ぎ2番目に患者数が多く、その発症メカニズム、伴う治療方法に係る研究が現在まで精力的に進められている[1,2]。パーキンソン病の原因物質としてプリオン様タンパク質である $\alpha$ シヌクレインが知られているが、特にその凝集体である線維が毒性を示すことが明らかになっており、ヒトの脳髄液、血中にも通常存在する $\alpha$ シヌクレインのモノマー(単量体)と区別して凝集体、凝集化状態を検出することが、早期診断の観点で特に重要である。

我々は脳細胞モデル膜として脂質二分子膜からなるリポソームを用いたカンチレバーセンサにより、同表面での $\alpha$ シヌクレインの凝集化を検出しており、今までに現在臨床現場で実用される ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)の検出能力に至る数百 fm の同検出を確認してきた(1,2,3)。ちなみに ELISA ではモノマーと凝集体の分別はできない。

一方上記カンチレバー表面上での $\alpha$ シヌクレインの凝集自体は定性的・定量的に観測されていなかった。そこで今回上記センサ表面測定系と同様の状況で $\alpha$ シヌクレインとリポソーム表面の相互作用を京大ナノハブの液中 AFM 装置を用い観察することにした。

## 2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】 液中 AFM

【実験方法】

当方の 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と同じ表面材料を有する箇所に Au 薄膜, SAM(Self-Assembled Monolayer)を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。同試料を京大ナノハブの液中 AFM 装置に設置し、最初に参照溶媒

溶液 PBS(Phosphate Buffered Saline)中で測定、続いて共同研究先である京都大学医学部で調製されたリコンビナント $\alpha$ シヌクレインを添加して一定時間経過後に測定を行った。

尚、今回初めての測定であり、線維形成ができるだけ観察できるように、センサ測定時より数桁高濃度のリコンビナント $\alpha$ シヌクレインを添加した。

## 3. 結果と考察(Results and Discussion)

最初に溶媒となる PBS 中でカンチレバー構造最表面に形成された Au/SAM 上固定化リポソーム表面を観察した(Fig. 1)。同カンチレバー最表面には塗布性絶縁膜が形成されており、一般によく用いる Au/熱酸化 SiO<sub>2</sub>/Si 基板表面上でのリポソームとの相違が観察された。Au/熱酸化 SiO<sub>2</sub>/Si 基板表面ではリポソームはほぼ一様に分布するが、今回の表面では部分的に表面高さが低くなっているか、あるいは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。この原因として塗布性絶縁膜の表面粗さが関係する可能性が推測された。

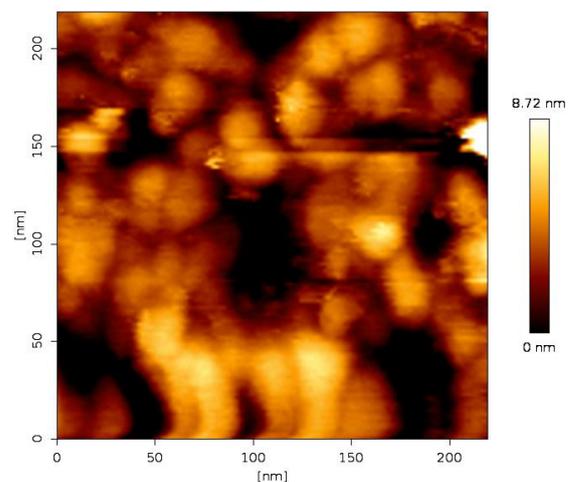


Fig. 1 AFM image (height: 200 nm x 200 nm) of liposomes immobilized on surface of cantilever sensor in PBS solution.

この後に、リコンビナント $\alpha$ シヌクレインをかなり高濃度である $70\mu\text{M}$ 添加してAFM撮像を行った(Fig. 2)。添加後の経時特性として直後(約5分後)、約30分後の2条件で測定した。Fig. 2より、 $\alpha$ シヌクレインの添加前と比べ、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。

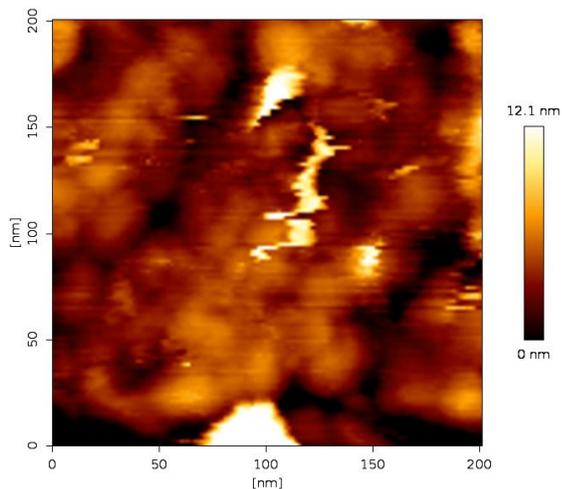


Fig. 2 AFM image (height: 200 nm x 200 nm) of liposomes immobilized on surface of cantilever sensor after addition of  $\alpha$ -synuclein ( $70\mu\text{M}$ ) in PBS solution.

$\alpha$ シヌクレインの線維化の撮像による観察結果の報告は殆ど無いため、本結果は大変興味深い。本画像はAFMプローブ測定掃引時にx方向に画像がやや引きずられた感があるため、測定周波数を低下する等最適化を図りたい。本現象の考察、理解のためにはさらに $\alpha$ シヌクレイン溶液の条件、測定パラメータを増やした観測が必要なので、上記カンチレバーセンサの測定結果、あるいは他者関連報告を参考に、今後も同観察を進めていきたい。

#### 4. その他・特記事項(Others)

・参考文献

- [1] V. N. Uversky, Journal of Neurochemistry (2007), 103, 17–37.
- [2] Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, and Second Department of Neurology, University of Athens Medical School, Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Feb;2(2):a009399.

・共同研究者: 京都大学医学部同附属病院 山門穂高、澤村正典 様

#### 5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

- (1) R. Kobayashi, M. Sawamura, H. Yamakado, M. Sohgwawa, M. Noda, Transducers 2019, Berlin, Germany, June. 23–27 (2019)
- (2) R. Kobayashi, M. Sawamura, H. Yamakado, M. Sohgwawa, M. Noda, IEEE Sensors 2019, Montreal, Canada, October. 27–30 (2019) 1274.
- (3) R. Kobayashi, M. Sawamura, H. Yamakado, M. Sohgwawa, M. Noda, 2019 IEEE International Meeting for Future of Electron Devices, Kansai Kyoto, Japan, November. 14–15 (2019)

#### 6. 関連特許(Patent)

- (1) 野田実他、特許出願済み