

繊維状ペプチド単分子膜の分子凝集に及ぼす Congo Redの影響の分光学的研究

日大生産工(院) 佐藤 賀子, 東工大院理工 長谷川 健
日大生産工 平田 光男, 日大生産工 藤井 孝宜

【はじめに】

人間の脳内での β -アミロイドペプチド($A\beta$)の凝集は,アルツハイマー病やプリオン病などの原因のひとつであると考えられているが, $A\beta$ の凝集沈着のメカニズムは解明されていない。そこで, $A\beta$ の凝集沈着のメカニズムを詳細に検討するため, $A\beta$ 中の主要なペプチドセグメントを含むモデル化合物を用いて単分子膜を作製し,分光学的手法やトポグラフィック解析を試みている。

これまでに, $A\beta$ 中の主要なペプチドセグメント(IIGLM)を含むモデル化合物 C_{18} IIGLM-X($X = -NH_2$ と $-OH$)を用いて,それぞれ純水表面上に作製した2種類の単分子膜の凝集構造を解析した。その結果, C_{18} IIGLM- NH_2 単分子膜は,逆平行 β -シート構造を形成し, C_{18} IIGLM- OH 単分子膜は,平行 β -シート構造を形成している¹⁾ことがわかり,末端基が異なるだけで大きく構造が異なることが明らかになった。

一方,Congo Red(CR)分子は,アミロイドペプチドと結合することが知られている²⁾。この結合特性によりCR分子と C_{18} IIGLM- NH_2 分子が相互作用を示し,単分子膜の凝集を抑制することが期待される。

本研究では, C_{18} IIGLM- NH_2 単分子膜を希薄なCR水溶液を下層溶液として作製し,この単分子膜の圧縮に伴う表面圧と表面双極子モーメントの変化の測定とBrewster角顕微鏡

(BAM)観察を行い,CR分子と C_{18} IIGLM- NH_2 分子の相互作用を検討した。さらに,2種類の C_{18} IIGLM- NH_2 1層LB膜を作製し,UV-vis分光法と赤外多角入射分解(MAIR)分光法による構造異方性解析を行った。

【実験】

本研究で用いた両親媒性分子 C_{18} IIGLM- NH_2 (図1(a),分子量 779.17 g mol^{-1})は,米国マイアミ大学のLeblancグループにより提供された。この化合物をクロロホルム-メタノール(体積比5:1)混合溶液(0.375 mg mL^{-1})とし,3種類の異なるCR(図1(b))水溶液($0, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-5}\text{ M}$)に展開して単分子膜を作製した。その後,BAMにより,この単分子膜の凝集体の成長を観察すると同時に,表面圧(π)-表面積(A)と表面双極子モーメント($\Delta\mu_{\perp}$)-表面積曲線を測定した。さらに, C_{18} IIGLM- NH_2 1層LB膜をガラス基板上とゲルマニウム(Ge)基板上にそれぞれ作製し,UV-vis分光法と赤外MAIR分光法により解析をした。

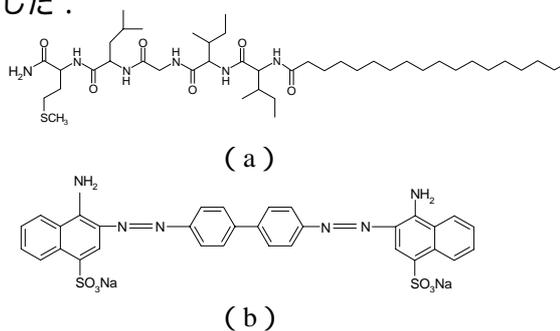


図1. (a) C_{18} IIGLM- NH_2 と(b) CRの化学構造

Spectroscopic Study of Fibril Formation of a Peptidelipid in Monolayers
on a Congo Red aqueous solution

Yoshiko SATO, Takeshi HASEGAWA, Mitsuo HIRATA, and Takayoshi FUJII

【結果および考察】

CR分子が C_{18} IIGLM-NH₂分子間の凝集に与える影響を検討するために、3種類の異なるCR水溶液 ($0, 1 \times 10^{-7}$, 1×10^{-5} M) 上に単分子膜を作製し、圧縮に伴う各単分子膜の表面圧の変化を測定した。その結果、2種類のCR水溶液上では純水面上に比べて、いずれの極限面積(分子の断面積に相当する)の値も大きく、膜が拡張していることがわかった。また、CR水溶液上では 1×10^{-5} Mより希薄な 1×10^{-7} Mの方が極限面積の値が大きくなり、膜の広がりが大きかった。表面圧変化と同時に測定したBAM像から、純水面上では気体膜領域ですでに多くのドメインが形成されているのに対し、CR水溶液上ではドメインがほとんど見られなかった。さらに、CR水溶液上では、分子配向変化を反映する双極子モーメントの立ち上がりが表面圧の立ち上がりより早く、純水上に比べて気体膜領域での双極子モーメントの測定値が非常に不安定であった。これらは、 C_{18} IIGLM-NH₂分子が緩くつまっているモデルで理解できる。以上のことから、 C_{18} IIGLM-NH₂分子の自己凝集が抑制されることが裏づけられた。

C_{18} IIGLM-NH₂分子間にCR分子がどのように入り込み、自己凝集を抑制しているかを検討するために、会合状態が異なると想定した3つのCR試料 (1×10^{-7} M, 1×10^{-5} M, キャスト膜) とCR水溶液上で作製した C_{18} IIGLM-NH₂ 1層LB膜のUV-vis スペクトルをそれぞれ測定した(図2)。

異なる会合状態を想定したCR試料のUV-vis スペクトルでは、会合が進むにつれ、短波長側では338 nm から345 nm にシフトし、長波長側ではキャスト膜に新たなバンド(549 nm)が出現している。一方、 C_{18} IIGLM-NH₂ 1層LB膜のUV-visスペクトルの長波長側では、500と549 nm付近のバンドが重なって見かけ上520 nm付近にバンドが出現している。これは、CR分子の会合体の存在を示唆する。また、339 nmのバ

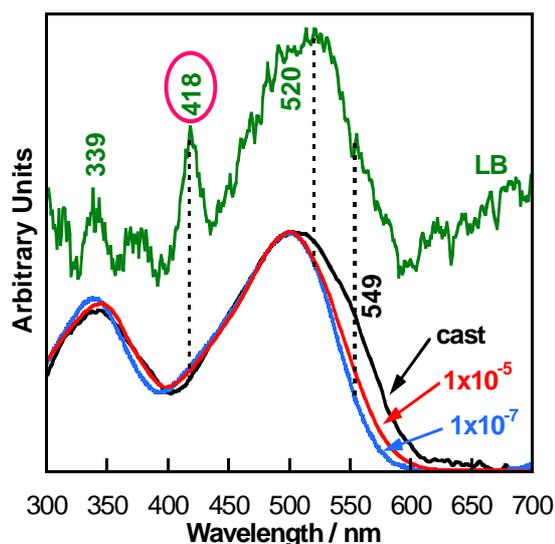


図2. 会合状態の異なる3つのCR試料 (1×10^{-7} M, 1×10^{-5} M, キャスト膜) とCR水溶液上で作製した C_{18} IIGLM-NH₂ 1層LB膜のUV-vis スペクトル

ンドから、モノマーの存在も考えられる。さらに、418 nm に特徴的なシャープなバンドが現れている。これは、 1×10^{-7} MのCR水溶液のスペクトルにも現れたことより(二次微分法により確認)、モノマー由来であるといえる。このように、 C_{18} IIGLM-NH₂ 1層LB膜中には、CR分子の会合体とモノマーが共存していることが示唆された。

一方、 C_{18} IIGLM-NH₂ 1層LB膜中で418 nm に特異的に強調されてバンドが現れている(赤丸)。これは、LB膜中でCR分子が配向しているためと考えられる。すなわち、CR分子の長軸が膜面内方向に配向し、短軸が膜法線方向を向いた状態で、膜中にモノマーとして入り込み、ペプチド分子同士の凝集を阻害するモデルが得られた。

赤外MAIR分光法による構造異方性解析の詳細は講演で述べる。

【参考文献】

- 1) T. Hasegawa, et al., *J. Phys. Chem. B*, **109**, 12856 (2005).
- 2) Roterman, I. et al., *Medical Science Monitor*, **7**, 771 (2001).