

新規「ヌードル」状インスリン凝集体の構造と細胞毒性

物質系専攻 086020 小林 隆宏

指導教員：前田 瑞夫（教授）

キーワード：インスリン、アミロイド線維、細胞毒性、細胞吸着性

【緒言】

タンパク質の凝集体の1つであるアミロイド線維は、アルツハイマー病や2型糖尿病などを含む20種類以上の病気の原因であることが知られている。アミロイド線維は一般的に直径数nm、長さ数 μm の線維状の形状を示し、線維軸に対して垂直方向に β ストランドが配列するクロス β 構造とよばれる規則的な内部構造を有している。一般的に様々なストレス条件下においても安定に存在する不溶性物質であり、いくつかのアミロイドについては高い細胞毒性を有することが報告されている。しかし、アミロイド線維による細胞死のメカニズムやアミロイド線維の構造特性など、まだ不明な点が多く、アミロイドによる疾患の治療法の確立のためにもこれらの解明が急がれている。アミロイド線維の研究には、インスリンがモデルとして多く用いられている。インスリンは糖尿病患者の治療に用いられるホルモンペプチドであり、A鎖とB鎖の2つのペプチド鎖がジスルフィド結合により結合した構造をとる。インスリンを酸性、高温条件下においてインキュベーションすることで、インスリンフィブリルと呼ばれる直線状のアミロイド線維を形成することが知られている。近年、当研究室において、還元剤 tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP)の添加条件下において、通常のアミロイド線維とは異なる、屈曲した形状のインスリンアミロイド線維(インスリンフィラメント)が生成されることを発見した(Fig. 1)。このインスリンフィラメントは、インスリンフィブリルと同様にシート構造を有するが、アミロイド線維のクロス構造に特異的に結合する thioflavin T (ThT)の結合特性がほとんど得られないことがこれまでにわかっている。よって、インスリンフィブリルとインスリンフィラメントは構造特性に違いがあることが予想される。また、インスリンフィブリルはラット副腎髄質細胞(PC12)に対して毒性があるが、インスリンフィラメントはほぼ無毒性であった¹。そこで本研究では、PC12とは別の細胞(ヒト胎児膵臓由来細胞(HEK293))を用いて、インスリンアミロイドの細胞毒性に関する検討を行った。さらに、インスリンフィラメントの構造に関して質量分析(MS)、ゼータ電位測定より検討した。また、インスリン同様にフィラメント状アミロイド線維を形成することが知られる β 2microglobulin(b2m)を用いて、インスリンアミロイドの特性との相同性を検討した。

【実験】

<二種類のインスリンアミロイド調製>ウシ膵臓由来のインスリンをインスリンフィブリル生成溶液(20% 酢酸、100 mM NaCl、pH 1.6)、インスリンフィラメント生成溶液(20% 酢酸、100 mM NaCl、20 mM TCEP、pH 1.6)に終濃度 2 mg/mlとなるように混合した。これらの溶液を 70 の恒温槽で13時間インキュベートすることでインスリンフィブリル及びインスリンフィラメントを作製した。各アミロイド線維を作製後、透析もしくは超遠心により未反応のインスリンを除去し、さらに溶媒を超純水に置換した。b2m フィブリル、b2m フィラメントの作製は既報に従った²。

<細胞毒性評価実験と細胞吸着実験>アミロイドの細胞毒性評価は、一般的に用いられる MTT アッセイにより行った。50,000 cells/well となるように 96well プレートに細胞を培養した。各アミロイドを所定濃度で培地に添加し、24時間のインキュベーションを行った。その後、MTT 試薬を添加し、生成したテトラゾリウム塩をマイクロプレートリーダーを用いて 550 nm の吸収を測定した。細胞生存率は、アミロイド非添加の細胞と比較することで求めた。また、アミロイドの細胞表面に対する接着性を蛍光顕微鏡で観察した。新規なアミロイド蛍光プローブである polythiophene acetic acid (PTAA)³を用いて蛍光測定を行った。20 mM リン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)にインスリンアミロイドと PTAA

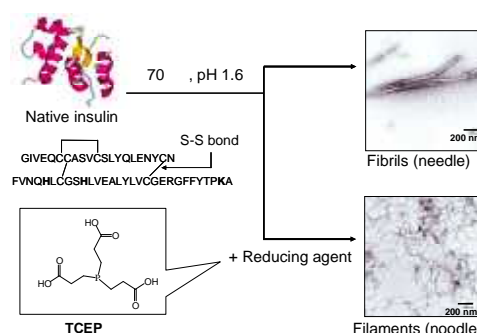


Figure 1. Production process and TEM images of insulin fibrils and filaments.

をそれぞれ終濃度 10 μM 、0.5 μM となるように混合し作成した PTAA-インスリンアミロイド複合体を終濃度 0.5 μM になるように HEK293 細胞に添加後、488nm 励起による PTAA 由来の蛍光を蛍光顕微鏡により観察した。

<MS によるアミロイド線維の構造解析> インスリンアミロイドをジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した後メタノールで 10 倍に希釈し、マトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型質量分析(MALDI-TOFMS)のサンプルとした。50% アセトニトリルと 0.1% トリフルオロ酢酸の混合溶液中に 5 mg/ml α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、2 mM クエン酸アンモニウムを混合した溶液をマトリックス溶液として用いた。各サンプルと、マトリックス溶液は 1:1 で混合し、MALDI プレート上で乾固後に測定した。

<ゼータ電位測定によるアミロイド線維の表面電荷の検討> インスリンアミロイドを超純水中に 100 μM となるように調製した。このサンプルを測定用セルに注入し、ゼータ電位測定装置により 25 で測定を行った。

【結果と考察】

MTT アッセイにより 2 種類のアミロイド線維が及ぼす細胞毒性を評価した。Figure 2 に、各アミロイド線維の PC12 及び HEK293 細胞に対する細胞生存への影響を示した。インスリンフィブリル添加によって、PC12 及び HEK293 において生存率がともに低下する傾向が示された。一方、インスリンフィラメントは両細胞に対し低毒性であることが分かった。また、b2m フィラメントにおいても、インスリンフィラメント同様に 2 種類の細胞に対して低毒性であることが分かった。このことから、フィラメントは、タンパク質の種類に依らず一般的に細胞低毒性であると考えられる。次に、各アミロイドの細胞表面に対する接着性を蛍光顕微鏡により観察した。初めに、アミロイドの蛍光プローブである PTAA が、それぞれの状態のアミロイド線維に結合し得るか検討した。各アミロイド線維に PTAA を添加し、蛍光光度計によりスペクトル測定を行った。2 種類のインスリンアミロイドは、ともに PTAA のみよりも蛍光強度が増加した(Fig. 3)。この結果は、PTAA がインスリンフィブリル、インスリンフィラメントのどちらにも結合することを示している。また、PTAA の結合はインスリンアミロイドの細胞毒性に影響しないことも確認した。PTAA-アミロイド線維複合体を細胞に添加しインキュベート後、細胞と相互作用しなかったアミロイドを洗浄し、蛍光観察を行った。その結果、インスリンフィブリルは細胞表面に吸着するがインスリンフィラメントは吸着しないことが分かった(Fig. 4)。同様の結果は、b2m フィブリルと b2m フィラメントでも得られた。従ってフィラメントは一般的に細胞吸着能が低い細胞低毒性であることが示唆された。

次に、各インスリンアミロイド線維の構造の違いを検討した。それぞれのアミロイド線維を DMSO に溶解させたときのインスリン分子の分子量を MS で測定した。インスリンフィブリルはインスリンモノマーの分子量(5733.49 g/mol)とほぼ変わらない 5737.86 g/mol であった(Fig. 5)。よってインスリンフィブリルを構成するインスリン分子は A 鎖と B 鎖が結合したままの状態であることが確認された。一方、インスリンフィラメントにおいては、2 つのピークが観測された。これらのピークはそれぞれ 2338.29 g/mol、3400.75 g/mol であり、A 鎖と B 鎖の理論値(それぞれ 2339.64 g/mol、3399.89 g/mol)とほぼ変わらなかった。よって、インスリンフィラメントを構成するインスリン分子は A 鎖と B 鎖が分離した状態にあることが分かった。次に、それぞれ

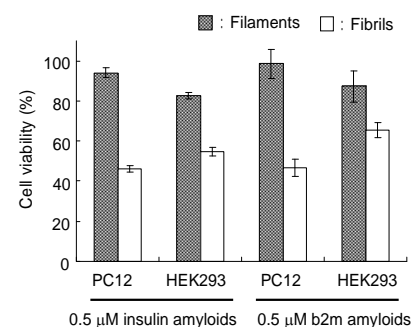


Figure 2. Cell toxicities of the insulin amyloids and b2m amyloids

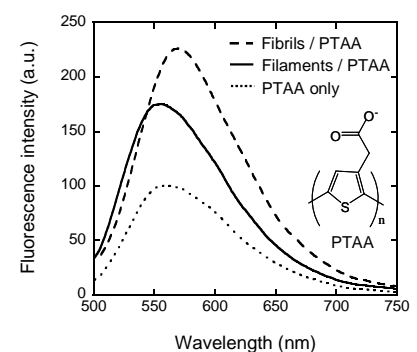


Figure 3. PTAA fluorescence spectra.

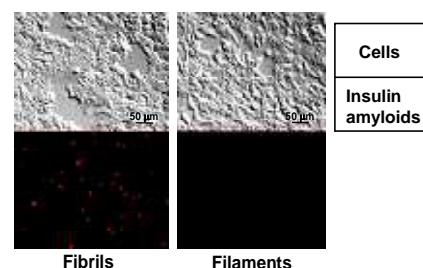


Figure 4. Insulin amyloids binding on HEK293 cell surface.

のアミロイド線維の表面電荷特性を、ゼータ電位測定装置を用いて測定した。その結果、インスリンフィブリルのゼータ電位は 30.5 mV であるが、インスリンフィラメントは -23.0 mV であった (Fig. 6)。このことよりインスリンフィブリルの表面電荷は正に帯電しており、インスリンフィラメントは負に帯電していることが分かった。この結果から、各インスリンアミロイド線維の細胞毒性の違いは、負に帯電した細胞表面との静電相互作用によるものではないかと考え、同様の実験を PTAA-インスリンアミロイド線維複合体を用いて行った。その結果、正に帯電していたインスリンフィブリルは PTAA 結合により大きく負に帯電することが示された (Fig. 6)。しかし、この PTAA-インスリンフィブリル複合体は、PTAA が結合していないインスリンフィブリルと同様の細胞毒性を有していたことから、アミロイドフィブリルと細胞の相互作用は静電相互作用が主な要因ではないことが示された。

その他 2 種のインスリンアミロイド線維の細胞吸着特性の違いの理由として、アミロイドの表面疎水性の差異が考えられる。細胞膜には疎水性の高い脂質が存在しており、表面構造の異なるインスリンフィブリルとインスリンフィラメントと細胞との相互作用に差が生じた可能性がある。

【まとめ】

屈曲した形状であるインスリンフィラメントの細胞毒性と構造を検討した。その結果、インスリンフィラメントは PC12 と HEK293 の 2 種類の細胞に対して低毒性であり、細胞表面への吸着能も低いことが分かった。同様の結果は、b2m フィラメントでも得られた。従ってフィラメントは一般的に細胞吸着能が低いため細胞低毒性であることが示唆された。また MS からインスリンフィラメントを構成するインスリン分子は A 鎖と B 鎖が分離した状態にあることが分かった。さらにゼータ電位測定からインスリンフィラメントの表面電荷はインスリンフィブリルとは異なり、負に帯電していることが分かった。しかし細胞吸着能の違いの主な要因は 2 種のインスリンアミロイドの表面電荷の違いではなく、表面構造の異なる 2 種のインスリンアミロイドと細胞との間に別の相互作用の差が生じたためであると考えられる。

【参考文献】

1. Zako T, *et al.*, *Biophys. J.* (2009) **96**, 3331
2. Ohhashi Y, *et al.*, *J. Biochem.*, (2002) **131**, 45
3. Nilsson KP *et al.*, *ACS Chem Biol.* (2007) **2**, 556

【学会発表】

第 46 回 日本生物物理学会年会

「新規インスリンフィラメントの構造解析と生化学特性」

第 47 回 日本生物物理学会年会

「新規発光共役系高分子によるインスリンフィラメントの細胞毒性と内部構造解明」

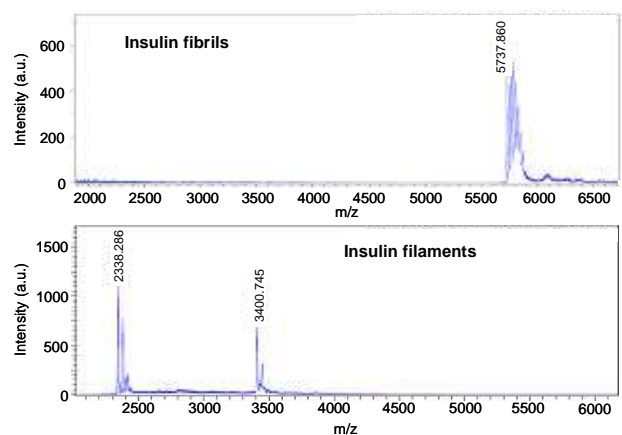


Figure 5. MS measurements of the insulin amyloids.

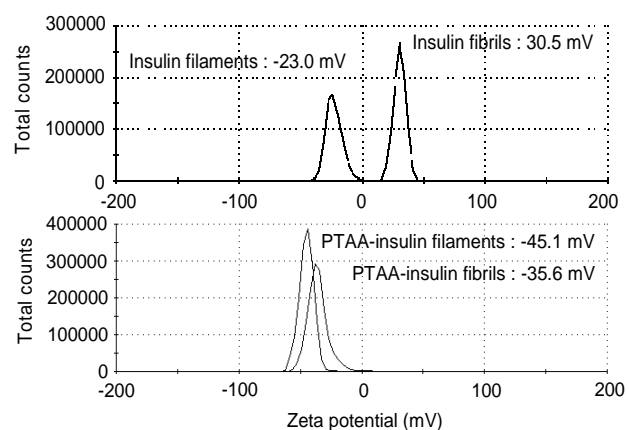


Figure 6. Zeta potential measurements of the insulin amyloids