



Title	超音波によるアミロイド β ペプチドの凝集加速現象の機構解明
Author(s)	中島, 吉太郎
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61821
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

超音波によるアミロイド β ペプチドの
凝集加速現象の機構解明

平成 29 年 3 月

中島 吉太郎

超音波によるアミロイド β ペプチドの
凝集加速現象の機構解明

博士 (工学) 論文提出先
大阪大学大学院基礎工学研究科

平成 29 年 3 月

中島 吉太郎

Abstract

The principal target of this study is amyloid β ($A\beta$) peptide which is a cause protein of Alzheimer's disease. The $A\beta$ peptides aggregate to form the so called amyloid fibril in vivo and show cytotoxicity to the neuronal cells. Because neuronal-cell death has been finished at clinical definition of Alzheimer's disease, it is important to detect the aggregation reaction in the early stage for effective cure for Alzheimer's disease. However, because the fibrillation reaction of $A\beta$ takes a long term, the aggregation-acceleration method has been required for the solution of Alzheimer's disease and understanding the mechanism of fibril formation which remains unclear. In 2005, Goto and coworkers reported that the fibrillation reaction of β 2-microglobulin is drastically accelerated by the ultrasonic irradiation to the monomer solution. Although the reaction can be applied as the aggregation-acceleration method, the mechanism still remains unclear. In this thesis, I worked on the mechanism clarification of the reaction.

The aggregation reaction is the opposite to the conventional decomposition reaction induced by the ultrasonic irradiation, and this mechanism is highly interesting in the view point of the sonochemistry. Ultrasonic irradiation to the protein solution possesses several possible factors to accelerate the aggregation reaction, including cavitation bubble, temperature increase of the bulk solution, and stirring effect. First, I investigated the dominant factor of the aggregation acceleration in the possible factors. I used insulin as a model protein in the neutral pH solution, which shows ultra-stable conformation against to the fibrillation and enables us to evaluate some factors, independently. The experimental results revealed that the cavitation bubble is the dominant factor in the mechanism.

Second, the aggregation reaction of the $A\beta_{1-40}$ is researched under the ultrasonic irradiation with various irradiation conditions. I discovered the optimum frequency to accelerate the nucleation reaction near 30 kHz and succeeded in increasing the rate constant for the nucleation reaction by a factor of 1000 with optimization of the irradiation condition. I also suggest the aggregation acceleration model focused on the bubble dynamics including dual effects of the local condensation and local heating. By calculating the frequency and acoustic pressure dependences of the nucleation reaction, theoretically, I succeeded in reproducing the experimental results based on the aggregation acceleration model.

Finally, the role of the $A\beta$ oligomers in the aggregation reaction is investigated with optimized ultrasonic agitation, being the powerful and pathway-oriented agitation for fibrillation. I performed ultrasonic irradiation experiments for two types of $A\beta$ oligomers, with and without β -sheet structure. The experimental results indicated that the oligomers without β -sheet structure are intermediate aggregates on the pathway for fibril. However, the β -sheet oligomers are independent dead-end products, different from the fibrillation pathway.

目次

第 1 章	緒言	1
1.1	アミロイドーシス	1
1.2	超音波による線維形成加速現象	2
1.3	本研究の目的	3
第 2 章	アルツハイマー病	4
2.1	病理	4
2.2	$A\beta$ ペプチド	4
2.3	診断法開発の現状	6
2.4	アミロイド線維とオリゴマー	6
2.5	過飽和モデル	7
第 3 章	インスリンを用いた超音波による凝集加速因子の特定	10
3.1	インスリン	10
3.2	超音波による凝集加速効果	11
3.3	実験手法	12
3.3.1	インスリンサンプル	12
3.3.2	チオフラビン T アッセイ	12
3.3.3	超音波照射実験	13
3.3.4	チューブ内の温度と音場の測定	14
3.3.5	高速攪拌実験	16
3.3.6	電子顕微鏡観察	16
3.4	実験結果	17
3.4.1	HSS 条件化でのインスリンの活性化エネルギー	17
3.4.2	超音波照射の凝集加速効果	17
3.4.3	超音波照射条件と凝集反応の関係	19
3.5	考察	21
第 4 章	$A\beta$ の凝集反応の超音波周波数・音圧依存性	25
4.1	超音波キャビテーション	25
4.2	超音波の照射条件と化学反応	25
4.3	実験手法	26
4.3.1	$A\beta$ サンプル	26
4.3.2	周波数・音圧可変装置	26

4.3.3	超音波照射実験	27
4.3.4	プローブの感度校正	28
4.3.5	円偏光二色性スペクトル測定	30
4.3.6	ビーズを用いた凝集加速実験	30
4.4	実験結果	31
4.4.1	冷凍処理の影響	31
4.4.2	$A\beta_{1-40}$ の凝集反応の活性化エネルギー	31
4.4.3	超音波照射により形成される線維の構造	31
4.4.4	凝集反応の周波数依存性	34
4.4.5	超音波照射条件の最適化	35
4.4.6	界面が凝集反応に及ぼす影響	38
第 5 章	凝集加速モデルの構築と理論計算	41
5.1	キャビテーションに着目した凝集加速モデル	41
5.2	気泡の半径運動	42
5.3	気泡圧壊時の周囲温度場	44
5.4	核生成反応の周波数・音圧依存性	50
第 6 章	超音波を用いた 2 種類の $A\beta$ オリゴマーの研究	53
6.1	オリゴマー研究の現状	53
6.2	攪拌処理により作成される $A\beta$ 凝集体	54
6.3	抗体実験	55
6.3.1	無線無電極水晶微小天秤センサ	56
6.3.2	実験装置	57
6.3.3	実験方法	57
6.3.4	実験結果	58
6.4	シーディング実験	58
6.5	毒性試験	59
6.6	2 種類のオリゴマーへの超音波照射実験	61
6.7	考察	62
第 7 章	結言	67
参考文献	68

第1章 緒言

1.1 アミロイドーシス

タンパク質は、アミノ酸が直鎖上に連結した高分子であり、生命活動において重要な役割を果たす。一部のタンパク質は、特定の立体構造に折り畳まれることにより、その機能を発揮する。タンパク質が細胞内で産出されてから立体構造を形成するまでの過程をフォールディングと呼び、機能を発揮する状態を天然状態と呼ぶ。フォールディングが正常に行われなわれず、間違った折り畳みをすることや、天然状態が壊れ、変性状態に陥ることが原因で引き起こされる病気の総称をフォールディング病という。1997年、Prusinerは、プリオン (Prion Protein: PrP) と呼ばれるタンパク質の形成する凝集体がプリオン病の原因物質としてふるまうことを明らかにし^[1-3]、ノーベル生理学・医学賞を受賞した。PrPは、健常者の体内にも存在するタンパク質であり、天然状態のPrPは細胞接着等の機能を果たす^[4]。しかし、プリオン病に感染した生体内で見られるPrPの構造は天然状態とは異なる構造を有し、凝集反応を経て、アミロイド線維と呼ばれる凝集体を形成し、組織に沈着することでプリオン病を引き起こす^[5,6]。このようなアミロイド線維を原因として発症する病気の総称をアミロイドーシス^[7]と呼び、アルツハイマー病やパーキンソン病などもこれに分類される。アミロイドーシスの原因タンパク質は、病気によって異なり、例えば、アルツハイマー病ではアミロイド β (A β)^[8]、パーキンソン病では α -シヌクレイン^[9,10]が原因タンパク質であると報告されている。Table 1.1 にアミロイドーシスの例とその原因タンパク質を示す。

アミロイド線維は、それを構成するタンパク質の種類に関わらずいくつかの特徴的な共通の性質を示すことが知られている。それらを構成するモノマーの二次構造は、 β -シート構造であり、線維は直径 ~ 10 nm、長さ ~ 1 μ m程度の針状の形態である^[14-16]。モノマーからアミロイド線維が形成される過程に関するモデルは多く存在する。OosawaとKasaiは、溶液中に分散しているタンパク質分子が一次的に整列することでらせん状の凝集体が形成されるというOosawa-Kasaiモデル^[17,18]を提唱した。Oosawa-Kasaiモデルにおいては、モノマーが直

Table 1.1 Typical diseases caused by amyloid fibrils, corresponding proteins, and their amino-acid-residue numbers.

Disease	Cause protein	Number of residues
Alzheimer's disease	Amyloid- β peptides ^[8,11]	38-43
Parkinson disease	α -synuclein ^[9,10]	140
Dialysis amyloidosis	β 2-microglobulin ^[12]	99
Prion disease	Prion protein ^[6]	253
Huntington's disease	Huntingtin ^[13]	3144

線状に重合する過程と線維軸周りにらせん状に重合する2つの過程により凝集反応を表現する。このモデルは、アクチンやチューブリンの重合反応に関する理論モデルであるが、アミロイド線維もモノマーが協同的に重合することから Oosawa-Kasai モデルに基づいて議論されることが多い^[19]。Finke と Watzky は、アミロイド線維の形成過程を核生成と線維伸長の二段階からなる反応とする Finke-Watzky(2 段階) モデル^[20,21] を提唱した。第一段階では、凝集の起点となる凝集核が形成され、第二段階では凝集核を起点として線維が伸長する^[20]。このうち、核生成反応は高いエネルギー障壁^[22,23] を有する反応であり、長い時間を要する。一方、線維伸長は核生成がなされれば即座に完了する反応であり、このことは、前もって作成した凝集核を含む溶液をモノマー溶液に添加すると線維凝集体が即座に形成されるシーディング反応により確認される^[14,24]。核生成反応に着目した線維形成モデルは多数存在し^[25-28]、例えば Lomakin らは、モノマー同士が結合・解離を繰り返すうちに、臨界サイズより大きな凝集体が形成され、それが構造変化を起こすことにより核生成反応が起きるというモデルを提案した^[29]。このモデルのように、多くのモデルは、凝集体の構造変化に伴う核生成反応を含むモデルである。しかし、Goto らは核生成反応を過飽和溶液からの析出現象としてとらえたモデルを提唱した^[30](詳細は 2.5 節)。これは例えば、タンパク質の結晶化現象^[31] などのようにある物質の過飽和溶液にその結晶相の核を添加すると、過飽和が破れ、即座に溶液全体に結晶体が析出する現象と等価である。この過飽和モデルは、他のモデルとは異なり、核生成反応を相変態ととらえた新たな概念に基づくモデルである。このように、アミロイド線維の形成過程に関しては、様々なモデルが提案されているが、すべての現象を包括的に説明するモデルは存在せず、未解明のことも多く残る。生化学の分野において、膨大な量の系統的な実験を行い、対象の性質を調査することは重要であるが、アミロイド線維に関しては、試験管内においてもその核生成反応に数日かかる場合があり、系統的な実験の実施が困難である。このことが研究の妨げとなり、その生化学的性質や機能に関して解明されていないことが多い。そのため、アミロイド線維の凝集加速手法の確立が重要な課題である。

1.2 超音波による線維形成加速現象

これまでに、アミロイド線維に関する研究では、攪拌^[30,32] や振とう^[33,34] などの力学的刺激により凝集反応を加速する手法が広く用いられてきた。近年、Goto らは、 β 2-ミクログロブリンのモノマー溶液に対し、超音波を照射することにより、その凝集反応が劇的に加速されることを発見した^[35,36]。この反応は、プリオン^[37]、 $A\beta$ ペプチド^[38,39]、 α -シヌクレイン^[40]、リゾチーム^[39,41]、インスリン^[39,42] など、他のアミロイド生成性タンパク質でも確認されている。しかし、この現象の凝集加速機構に関して調査した研究は今までになく、その機構は未解明である。

従来、アミロイド線維の研究分野では、超音波照射は、一度形成したアミロイド線維を破碎し、線維シードを形成するために用いられてきた^[43,44]。Chatani ら^[44] は、 β 2-ミクログロ

ブリンのアミロイド線維に超音波パルスを照射し、照射パルス数の増加に伴い、線維が分断され、短い線維の数が増えることから、超音波の線維分解能力を確認している。超音波照射により促進される化学反応は、このような分解反応がほとんどであり、実際に有機物質の分解^[45, 46]や超音波洗浄機等に応用されている。一方、タンパク質の凝集反応促進は、モノマーの重合促進を意味し、分解反応とは正反対の反応であり、超音波化学反応学の分野においてもその機構は極めて興味深い。

超音波照射による凝集加速機構を解明することは、アミロイド線維の凝集反応を加速するために最適な照射条件を特定し、実験をより効率的に行うことにつながる。また、超音波の照射条件を制御することにより、アミロイド線維の形成過程や凝集形態を制御できるようになると、アミロイドーシスの創薬研究や診断法の開発への多大なる貢献が期待される。これについては、2章で詳しく述べるが、アルツハイマー病やパーキンソン病の治療においては、早期診断法の開発が重要な課題であり、超音波による凝集加速法は、これに応用することが期待される。しかし、生体内中のタンパク質濃度は極低濃度であり、その凝集反応を引き起こすためには、超音波による凝集加速機構を解明し、凝集加速に最適な超音波の条件を特定する必要がある。

1.3 本研究の目的

以上のような背景から、本研究では、超音波誘起凝集加速現象の機構解明を目指す。アミロイドーシスの典型例であるアルツハイマー病の原因タンパク質である $A\beta$ を標的とし、その凝集反応を加速するために最適な条件を探索し、最適超音波照射を用いて $A\beta$ が形成する凝集体の生化学的性質について知見を得ることを目的とする。

本論文では、アミロイド線維の基礎研究のみではなく、アルツハイマー病の診断にも応用可能な超音波凝集加速手法の確立を目指すため、2章では、アルツハイマー病に関する研究の現状や現在報告されている診断法となりうる技術について言及する。3章では、超音波誘起凝集加速現象の凝集加速因子を特定するために、アミロイド生成性タンパク質のモデルタンパク質として広く用いられるインスリンに対して超音波凝集加速実験を行い、凝集加速機構に関して論じる。4章では、 $A\beta_{1-40}$ ペプチドに対して様々な周波数と音圧の超音波を照射し、凝集加速に適した照射条件を探索する。5章では、その凝集反応の周波数・音圧依存性を超音波キャビテーションの運動に着目した理論モデルにより再現することを目指す。6章では、最適超音波照射を用いて、アルツハイマー病の重要な有毒物質候補である2種類のオリゴマー凝集体の性質を調査する。最後に、本研究で得られた成果と知見を7章に示す。

第2章 アルツハイマー病

2.1 病理

1984年、Glennerら^[47]は、アルツハイマー病患者の脳内から、 β -シート構造からなるアミロイド線維を単離し、その構成タンパク質を調査することで、アルツハイマー病の原因タンパク質が $A\beta$ であることを明らかにした。アルツハイマー病の代表的な病理として、 $A\beta$ 凝集体が形成する老人斑^[48]と、リン酸化されたタウタンパク質が細胞内に蓄積することで引き起こされる神経原線維変化^[49]があげられる。これらが、ニューロン等に神経毒性を示すことで、神経細胞が死滅し、脳の萎縮・認知機能の低下等の障害を引き起こす。アルツハイマー病の研究分野では、これらの症状の最上流に位置するのは、 $A\beta$ が形成する老人斑とするアミロイドカスケード仮説^[50,51]が広く受け入れられており、 $A\beta$ の凝集反応とアルツハイマー病の深い関連が示唆されている。

2.2 $A\beta$ ペプチド

$A\beta$ は、アミノ酸約40残基からなる分子量約4.3 kDaのアミロイド生成性タンパク質である^[47]。 $A\beta$ は、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein: APP) が酵素分解されることにより産出される^[52]。膜貫通型タンパク質である APP は、細胞膜を貫通して存在しており、本来は、 α -セクレターゼというタンパク質分解酵素により切断され、この産物は凝集せず、毒性も示さない^[53,54]。しかし、頻度は高くないが APP が細胞外で β -セクレターゼに、細胞膜内で γ -セクレターゼにより切断された場合に、 $A\beta$ は産出される^[55]。Fig. 2.1 に APP より $A\beta$ が産出される様子を、Fig. 2.2 には、 $A\beta$ のアミノ酸配列を示す。生体内では、アミノ酸40残基の $A\beta_{1-40}$ と42残基の $A\beta_{1-42}$ がおよそ9:1の割合^[56,57]で存在している。また、その存在割合は非常に低いものの、43残基の $A\beta_{1-43}$ に着目した研究も存在する^[58]。その残基数は、細胞膜内で γ -セクレターゼにより切断される際の位置によって決まる。

産出された $A\beta$ は、健常者の体内では、血液や髄液中に溶解して存在するが、患者の体内では、凝集体を形成し、大脳皮質等に沈着する。Batemanら^[59]は、遺伝性アルツハイマー病を発症した親を持つ128人の被験者を対象に、40歳頃から血中の $A\beta$ 濃度や脳組織への $A\beta$ 凝集体の蓄積量、海馬の体積等をおよそ40年間にわたって調査した。その結果から、アルツハイマー病患者の体内において、認知機能の低下がみられるおよそ25年前から、髄液に溶解している $A\beta$ 濃度は減少し始め、同時に、脳への沈着が始まることが明らかになった。また、発症の15年前から海馬の体積も減少し始め、神経細胞等が死滅し始めていることが示唆された。一度死滅してしまった神経細胞や萎縮した脳を回復させることは極めて困難であるため、このことはアルツハイマー病の治療のためには早期診断法が不可欠であることを意味する。

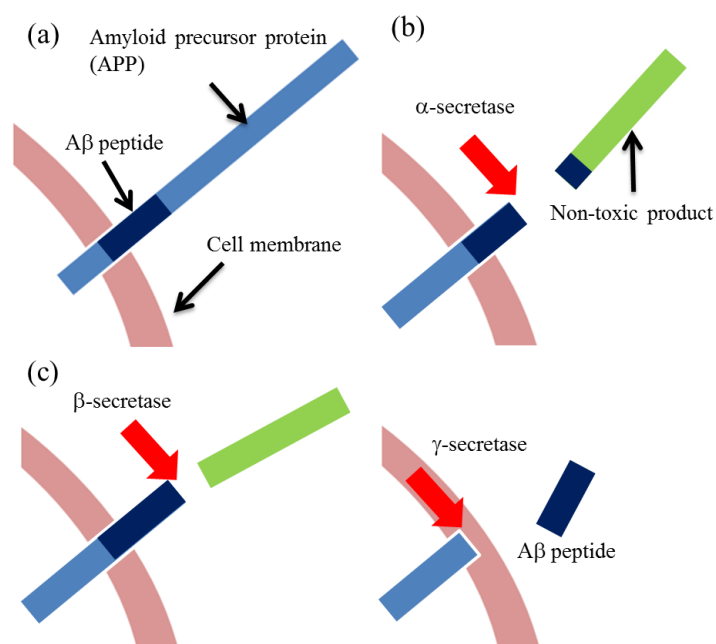


Fig. 2.1 Production mechanism of $A\beta$ peptide. (a) Amyloid precursor protein (APP) exists through the cell membrane. (b) When APP is cleaved by α -secretase, non-toxic product is released. (c) When APP is cleaved by β - and γ -secretases, $A\beta$ peptide is produced.

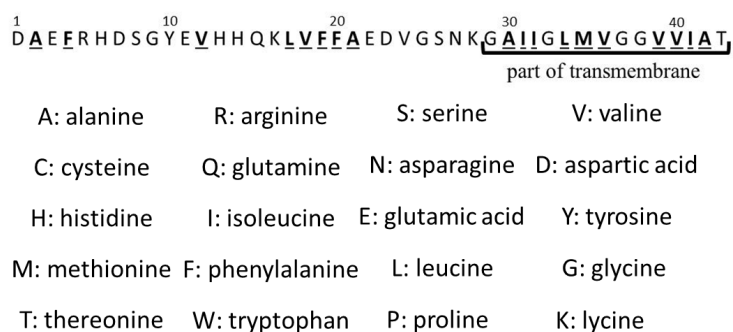


Fig. 2.2 Amino-acid sequence of $A\beta$ peptide and contracted names of amino acids. Superior number means number of amino acid counted from C-terminal of $A\beta$ peptide. Under-line means hydrophobic amino acid residues.

2.3 診断法開発の現状

現在、医療の現場においては、陽電子放射断層撮影 (positron emission tomography: PET) 検査^[60]によるアルツハイマー病診断が受診可能になりつつあるが、検査にかかる費用が莫大であることや限られた医療機関でしか受診できないことなど障壁が多く、一般的に普及しているとはいえない。また、前述のアルツハイマー病の性質上、認知機能障害が露見してからの診断では、すでに $A\beta$ の凝集反応・組織への沈着はすでに終わっており、手遅れである。そのため、定期健康診断などで誰でも簡便に受けることのできる検査方法が必要である。

プリオン病の診断に関しては、振とう法を持ちいる RT-QuIC(real-time quaking conversion) 法^[61] やシーディング反応を持ちいる PMCA(protein misfolding cyclic amplification) 法^[62] などにより、患者の髄液中のプリオンの凝集反応を選択的に増幅し、評価する方法が提案されている。近年、Salvadores ら^[63] は、アルツハイマー病患者、健常者、アルツハイマー病以外の神経変性疾患という3種類の被験者から髄液を採取し、検体中の $A\beta$ オリゴマーを選択的に増幅し、アルツハイマー病患者と他の2群の間に有意な差を見出すことに成功した。この方法は、 $A\beta$ -PMCA($A\beta$ -protein misfolding cyclic amplification) 法と名付けられ、今後、アルツハイマー病診断法として実用化されることが期待される。しかし、この方法では、一検体を調べるために ~200 h という長い時間を要するため、多くの人が検査を受けることは困難である。

超音波による凝集加速現象を用いることで、短時間での簡便な検査が実現可能と考えられる。被検者の髄液などの検体に超音波を照射し、髄液内の $A\beta$ の凝集反応を評価することで数時間で検査が完了することが期待される。しかし、髄液中の $A\beta$ 濃度は $A\beta_{1-40}$ が 10 ng/ml(nM オーダー)、 $A\beta_{1-42}$ が 100 pg/ml(100 pM オーダー) 程度^[56] と報告されており、やみくもに超音波を照射するだけでは、その凝集反応を引き起こすことは困難だと考えられる。そこで、超音波による凝集加速現象の機構を理解し、最適な条件の超音波を照射することが必要であり、場合によっては、PMCA などの手法と組み合わせることで、さらに有意義な検査を行うことができる可能性がある。

2.4 アミロイド線維とオリゴマー

$A\beta$ の凝集反応に関して、これまでに様々な凝集モデルが提案されてきたが、すべての現象を包括的に説明できるモデルは無く、未解明の事柄が多く残る。Fig. 2.3 に示すのは、Kato らが提案する凝集モデルである^[64]。凝集の最小構成要素であるモノマーが、凝集反応の中間体であるオリゴマーと呼ばれる数分子程度の小さな凝集体を形成する。その後、構造変化を経て、凝集の起点となる凝集核を形成し、核を起点とする線維伸長反応により、アミロイド線維が形成されるというモデルである。 $A\beta$ のモノマーは、特定の構造を示さないランダムコイル構造を有する^[65,66] が、凝集反応が進み、凝集核やアミロイド線維を形成すると、 β -シー

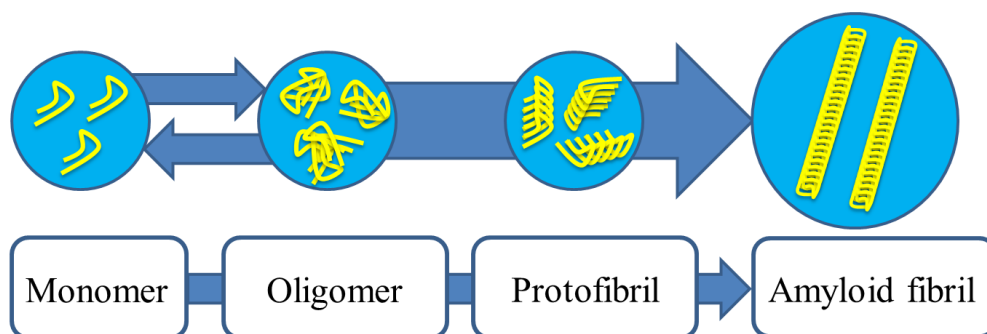


Fig. 2.3 An aggregation model of A β peptide suggested by Kato and coworkers^[64].

ト構造と呼ばれる規則的な構造を持つようになる^[11,67,68]。Fig. 2.4 にアミロイド線維の構造の模式図を示す。アミロイド線維は、直径 ~ 10 nm、長さ ~ 1 μ m 程度の針状の凝集体である^[14–16]。それを構成するモノマーは β ヘアピン構造と呼ばれるヘアピン状の構造を有しており、ヘアピンの長手方向が線維の長さ方向と垂直になる向きに規則的に整列しており^[69]、モノマー同士の間隔は ~ 4.7 Å であり、水素結合により結合している^[70,71]。これをプロトフィブリルと呼び、アミロイド線維は複数のプロトフィブリルがらせん状に絡み合うことで形成されている^[72]。このような構造は、他のタンパク質が形成するアミロイド線維にも共通する^[7]。

アルツハイマー病患者の脳内から多量の A β のアミロイド線維が発見されたこと^[47] や、他のアミロイドーシスにおいてもアミロイド線維が神経毒性を発することで病気が発症することなどから、アルツハイマー病においてもアミロイド線維が神経毒性を示す凝集体だとする研究が多かった。しかし、近年、凝集の中間体として扱われることの多かったオリゴマーこそが、真に毒性を示す物質であるとする研究報告^[73,74] が多数見受けられる。オリゴマーの神経毒性が報告^[75,76] されて以来、オリゴマーの構造や凝集反応における位置づけなどを調査する研究が多く行われてきた。その成果から、A β の形成するオリゴマーには、可溶性^[77] のものや一部構造を有する^[78] ものなど、様々な形態・構造のものが存在することが明らかになった。また、これまで、オリゴマーは凝集の中間体として扱われることが多かったが、オリゴマーが線維とは異なる経路の独立なデッドエンドである可能性が示唆され^[79,80]、凝集過程における位置づけも見直す必要がある。このような背景から、オリゴマーの性質を知ることがアルツハイマー病の解決に不可欠であり、本研究でも、6 章で超音波による力学的刺激を用いてその性質の調査に取り組む。

2.5 過飽和モデル

ある溶媒に溶けている溶質は、その溶解度を超えると液相から固相として析出し、飽和濃度の溶液と固相の二相の状態になる。しかし、溶解度を超えても液相一相として存在することがある。この準安定状態の溶液を過飽和溶液と呼び、過飽和溶液は何らかの刺激を与えるとその過飽和状態が破れ、固相が析出する。水の過冷却状態もこれに類似した現象である。水の凝固

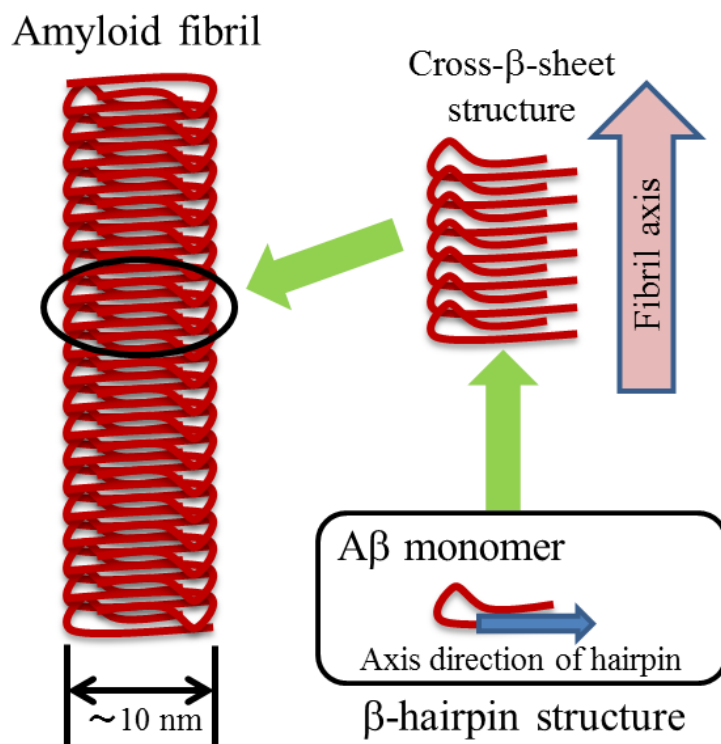


Fig. 2.4 Schematic illustration of the β -sheet structure of amyloid fibril. The constituent monomers possess hairpin structure called β -strand structure. Axis directions of hairpin and fibril are perpendicular to each other.

点は大気圧下で 0°C であるが、その温度を下回っても水として存在し、振動や衝撃を与えると一気に氷へと相転移する。

アミロイド線維の形成機構を過飽和状態からの析出現象ととらえる研究は、古くから存在する。1967年、Griffithは、プリオン病の一種であるスクレーピーの発症機構におけるアミロイド線維の自己複製モデルとして、過飽和からの結晶析出に基づく凝集モデルを提唱した^[81]。また、1976年、Hofrichterらは、鎌型赤血球症患者の有するヘモグロビンSが変異体を有し、末梢でヘモグロビンSが線維状凝集体を形成することで発症することを報告した^[82]。彼らはこの機構に関し、酸素分圧の低い末梢でヘモグロビンSの溶解度が低下し、過飽和度が上昇することにより一部のヘモグロビンSが一気に結晶化する過飽和からの析出現象がその機構の本質であると説明している。近年、Gotoらは、この過飽和からの固相析出現象に着目し、アミロイド線維形成を説明するモデルを提唱した^[30]。そのモデルの概念図をFig.2.5に示す。図中の黒線はタンパク質の溶解度曲線であり、一般にNaClを添加すると、溶解度は低下する。領域2は準安定領域であり、この溶液条件化では溶液の過飽和度は低く、自発的には核生成を起こさない。領域3は不安定領域で溶液の過飽和度が高いために、結晶性の析出が起き、凝集核が生成される。領域4はガラス領域で、溶液の過飽和度が非常に高いために、溶液中に無数

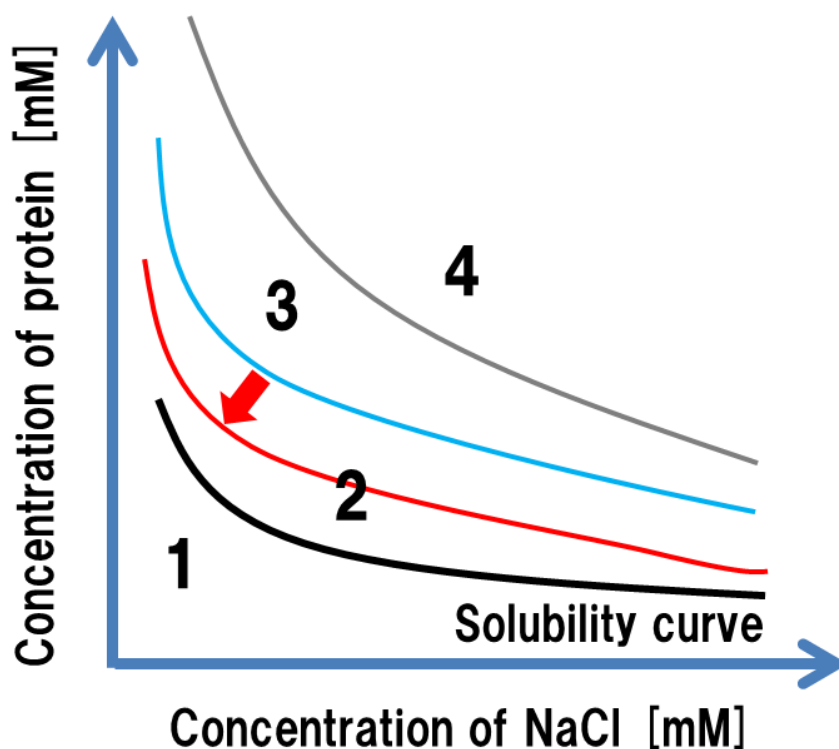


Fig. 2.5 Schematic diagram of supersaturation model suggested by Goto and coworkers in reference 30. Because the concentration of protein solution is lower than its solubility at region 1, the protein molecules are dissolved in the solution. Region 2 is the metastable region. In this region, the solution does not cause spontaneous nucleation reaction because of their low degree of supersaturation. Region 3 is the labile region in which the solution spontaneously forms the nucleus of fibril. Amorphous aggregates are likely formed in the region 4 called the glass region.

の核が生成され、結果として結晶性でなく、不定形な凝集体が形成される。Goto らは超音波アジテーションを与えたときには、準安定領域と不安定領域の境界が溶解度曲線側に接近し、本来準安定領域にある溶液も核生成反応を起こすと考えた。このことは、自発的には核生成を起こさないリゾチウムの溶液に超音波を照射するとその結晶化現象が促進されること^[83]からも裏付けられる。溶液の過飽和状態が破れることにより凝集核が析出し、溶液中のモノマーがその核を起点として即座に伸長反応が進行することがアミロイド線維伸長反応の本質であることを示唆するモデルである。このモデルは、超音波照射による凝集加速機構を考えるうえでも重要な概念である。

第3章 インスリンを用いた超音波による凝集加速因子の特定

従来、超音波照射により加速される化学反応は分解反応であり、正反対の凝集加速現象の機構に関する研究はない。超音波が溶液にもたらす効果は、超音波キャビテーションの生成、溶液全体の温度上昇、溶液に対する攪拌効果が主である。本章では、それらの中から凝集加速現象において支配的なものを特定することを目指した。実験では、凝集能の極めて低い中性のインスリンをモデルタンパク質として採用した。

3.1 インスリン

インスリンは、51 アミノ酸残基からなる分子量約 5.8 kDa のアミロイド生成性タンパク質である。そのモノマーは、21 アミノ酸残基からなる A 鎖と 30 アミノ酸残基からなる B 鎖により構成される^[84]。実験に用いたウシインスリンモノマーのアミノ酸残基配列を Fig. 3.1 に示す。インスリンは、中性溶液中では安定な天然構造を有する^[85]ため凝集傾向は低いが、酸性・高温条件化では変性状態に陥り、アミロイド線維を形成する^[86,87]。この性質から、酸性のインスリン溶液は、アミロイド線維の形成機構などを調査するためのモデルとして広く用いられる。例えば、Chatani ら^[88]は、インスリンを 25 mM の塩酸 (pH ~1.6) に溶かし、80 °C の温度下に置くことにより、その核生成反応機構を調査した。この溶液条件では、インスリンの核生成反応は、~1 h 以内に完了する。しかし、本論文の実験結果で示すように、中性に調整した溶液中では、その溶液を 70 °C で放置しても ~100 h 以内に凝集反応は見られなかった。ある条件下でのみアミロイド線維が著しく加速的に形成されるインスリンの性質は、次節で示すような超音波による凝集加速因子の中から支配的なものを特定するために適していると考え、中性 (pH 7.4) のインスリン溶液の凝集反応を様々な条件下で調査することにより、超音波誘起凝集反応の支配的因子の特定に取り組んだ。

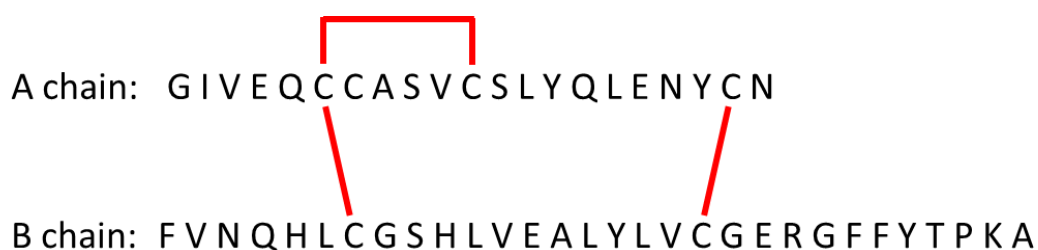


Fig. 3.1 Amino acid sequence of bovine insulin monomer^[84]. It is composed of A and B chains, and their are bonded by the disulfide bridges. Red lines denote the disulfide bridge.

3.2 超音波による凝集加速効果

超音波による化学反応の促進機構は、ソノケミストリーの分野で古くから研究されてきた。有機物質等の分解反応には、超音波キャビテーションの圧壊時に発生する衝撃波^[89]や超高温($\sim 15,000\text{ K}$ ^[90])のホットスポット付近で水分子が熱分解されることにより生成されるOHラジカル^[46,91]がその機構に深く関連していることが明らかになっている。しかし、凝集反応は正反対の重合反応の促進を意味し、超音波がどのようにその反応を促進するかは明らかになっていない。一般に超音波がもたらす化学反応加速因子としては、以下のような事柄が予想される。

1. 攪拌効果

溶液が超音波照射を受けると、超音波の攪拌効果^[92]により溶解しているタンパク質分子の運動がブラウン運動以上に活発になり、分子同士の衝突回数が増加することにより凝集反応が加速される可能性がある。

2. バルク溶液の温度上昇

溶液中に発生したキャビテーション内部の気体が気泡圧壊時に高温となることや溶液の粘性摩擦などにより溶液温度が上昇し、それにより凝集反応が加速される可能性がある。

3. キャビテーションの半径運動

超音波の圧力変動とともに膨張・収縮を繰り返す気泡の運動により、局所的に凝集反応が加速される可能性がある。例えば、疎水性相互作用や静電相互作用により気泡表面に引き付けられたモノマーが気泡の圧壊に伴い、その中心に濃縮され、局所的な濃度が上昇することなどが予想される。

4. キャビテーション表面でのタンパク質の表面変性

タンパク質は、親水性と疎水性アミノ酸残基を有する両親媒性物質であり、溶液中のタンパク質は天然状態では親水性アミノ酸残基を溶液側に露出して存在することが多いが、気液界面等にタンパク質分子が吸着すると疎水性アミノ酸残基を表面に露出し、天然構造が崩れることがある。これを表面変性と呼び、キャビテーション付近に存在するタンパク質分子は、表面変性により凝集傾向が高くなり^[93]凝集加速される可能性がある。

5. ひずみ場の周期と構造揺らぎの一致

溶液中でのタンパク質分子の構造は、構造揺らぎ^[94]と呼ばれる時間的な変化を有している。この構造の揺らぎと、超音波音場が溶液中に作り出すひずみ場の周期が一致したときに、タンパク質の構造変化が加速され、凝集核生成が一気に進行する可能性がある。

これらの因子が加速メカニズムを支配することが可能性として挙げることができるが、本章では、特に 1~3 の効果に着目し、それらの凝集反応に対する寄与を実験的に調査する。因子 4 に関しては、4 章で比較的凝集能の高い $A\beta_{1-40}$ に対してその効果を検討する (4.4.6 節)。因子 5 に関しては、本研究で用いた超音波の周波数 (26 kHz) がタンパク質の構造揺らぎの周波数 (GHz~THz オーダー^[95]) と著しく異なることから以下の議論では無視した。

3.3 実験手法

3.3.1 インスリンサンプル

上述の通り、インスリンは pH2.0 以下の塩酸中などで線維化傾向を示す^[96] が、本研究では、超音波誘起加速現象の支配的因子を特定するために、線維化傾向が極めて低い中性のリン酸緩衝液 (phosphate buffer saline: PBS) 中でインスリンの凝集反応を調査した。

凍結乾燥されたウシインスリン (Sigma Aldrich, I1882) 粉末をジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO) に溶解し、200 rpm の攪拌速度で 15 min 攪拌する。その後、100 mM の NaCl を含む 100 mM の PBS でインスリンの濃度が 100 μ M になるように希釈する。DMSO と PBS の体積分率は、1:19 とした。

3.3.2 チオフラビン T アッセイ

本研究では、アミロイド線維の形成過程をモニタリングするために、チオフラビン T (thioflavin-T: ThT, 化学式: $C_{17}H_{19}ClN_2S$) と呼ばれる蛍光分子^[52] を用いた。ThT はそれ自身では蛍光を発さないが、アミロイド線維が形成されるとその β -シート構造に特異的に結合し、強い蛍光を発する^[97]。そのため、ThT 蛍光強度の上昇は、アミロイド線維形成反応の進行を意味する。Fig. 3.2 に ThT 蛍光強度の経時変化と凝集反応の進行を対応付けた模式図を示す。その蛍光強度は、核生成反応中には上昇しないが、核生成反応が完了し、線維伸長反応が始まると上昇し始め、やがて、線維伸長反応が終わると、その強度も飽和する。

粉末状の ThT 分子は、50 mM のグリシン-水酸化ナトリウム溶液 (pH 8.5) に溶解し、その濃度を 1 mM に調整した。1 mM の ThT 溶液は、ストック溶液として 4 °C の冷蔵庫中に保管した。保管中は、光退色を防ぐためにアルミニウム箔で容器を覆い、暗所に保管した。ストック溶液は、使用前に再びグリシン-水酸化ナトリウム溶液で 5 μ M に希釈し、使用した。

サンプルの ThT 蛍光強度を測定するために、5 μ L のサンプル溶液と 50 μ L の ThT 溶液を混合し、水晶セルに注入する。そして、そのセルを蛍光分光器 (JASCO: FP-6200) にセットし、蛍光分光計測を行う。ThT 分子の励起・蛍光波長は、それぞれ 450, 485 nm^[98,99] であるため、蛍光分光器の励起波長は、450 nm に設定した。放出された光は、440~500 nm までその蛍光強度を走査し、その範囲内での最大の値をその時間での蛍光強度とした。アミロイド線維が形成されている場合とそうでない場合の ThT 蛍光分子の蛍光スペクトルを ThT の化学構造を併せて Fig. 3.3 に示す。

本研究では、今後の 4, 6 章でもこの方法により、サンプルの ThT 蛍光強度を測定した。こ

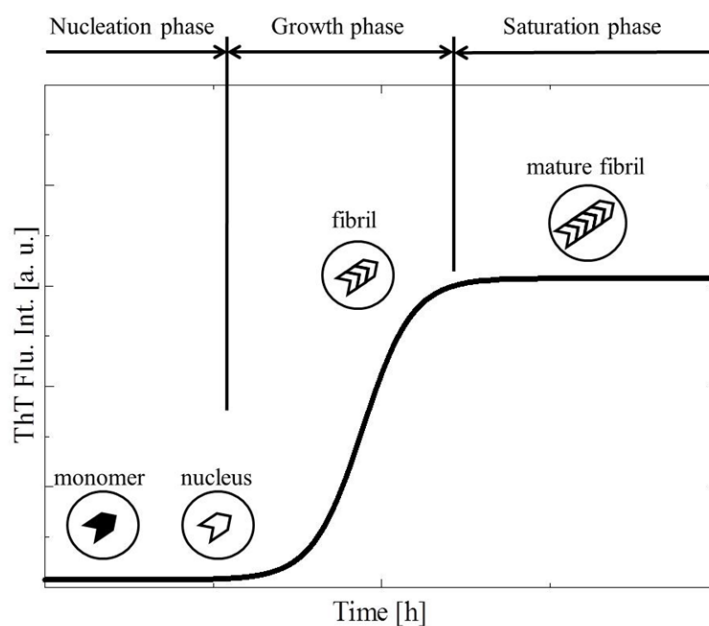


Fig. 3.2 Time course of the ThT fluorescence intensity and the progression of the aggregation reaction. The fluorescence intensity remains unchanged in the nucleation phase. In the fibril-growth phase, it begins to increase the level. When mature fibrils are formed, the level saturates.

れまでも多くの研究において ThT アッセイが行われてきたが、それらのほぼすべてにおいて、サンプル溶液中に ThT 分子をあらかじめ添加した状態で超音波アジテーションを行っており [36, 39, 80], アジテーションが ThT 活性に与える影響が除去不可能なベースラインとして常に存在していた。実際, ThT を添加することにより, A β ペプチドの線維化が促進されるという報告も存在する [100]。しかし, 本研究においては, 超音波照射を行ったサンプルの一部を採取して, そこに ThT を添加する手法を用いたため, ThT 蛍光分子が超音波音場や高温下等にさらされることはなく, 外部からの影響により蛍光消光や不活性化などの状態に陥ることはない。

3.3.3 超音波照射実験

インスリンへの超音波照射実験を行うために, Fig. 3.4 のような実験系を製作した。Fig. 3.4(a) には実験系の俯瞰図を, (b) には実験系の詳細図を示す。また, 実際の実験系の写真を Fig. 3.5 に示す。500 μ L のサンプル溶液をサンプルチューブ (ポリプロピレン製, 1.5 mL vol.) に注入し, 超音波照射器の上部に設置した。水槽内に設置した基本周波数 26 kHz の超音波照射器 (KAIJO: 43103) より水面のインスリンを含むサンプルチューブへ下方から超音波を照射する。水槽内の水は, 気泡の発生による音圧損失を防ぐために脱気システム (KAIJO: 40006A) により十分に脱気した。水槽内の温度は, 冷却システム (THOMAS KAGAKU Co.,

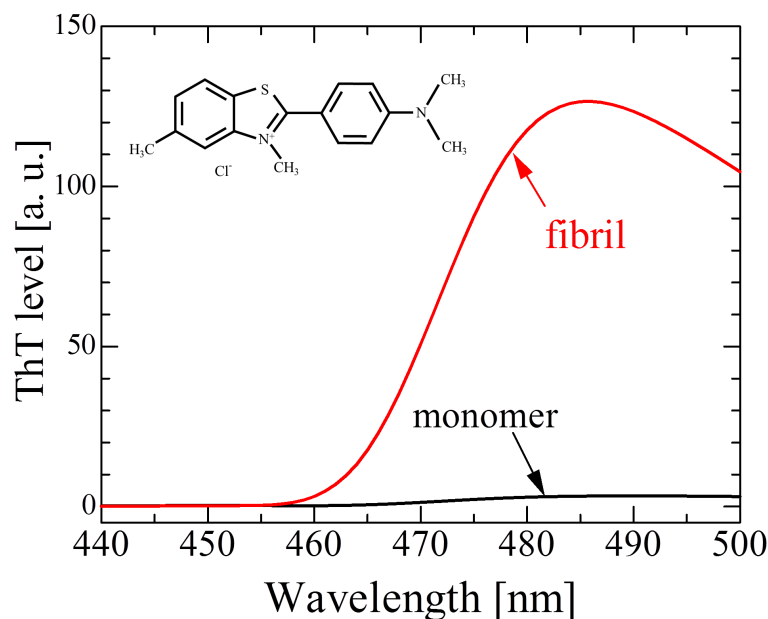


Fig. 3.3 ThT spectra of the monomer and fibril samples. The fibril's spectrum has the fluorescence peak near the wavelength of 485 nm. Inset shows the chemical structure of the ThT molecular.

Ltd.: TRL-107NH) を用いてその温度を $\sim 10^{\circ}\text{C}$ に調節した。水槽内の水を低温に設定したのは、大振幅の音場を発生させるための超音波発振器自身の温度が上昇することによる素子への負担を軽減するためである。

超音波照射器の出力は、リレースイッチにより制御し、1 min の超音波照射ののち、4 min 放置するという 5 min のサイクルを実験終了まで繰り返した。30 min に一度程度、チューブからサンプルを抜き取り、ThT アッセイを行った。

3.3.4 チューブ内の温度と音場の測定

チューブ内のサンプル溶液の温度変化は、非接触型放射温度計 (KEYENCE: FT-H10) により計測した。計測は超音波照射開始から、上昇した温度がベースラインに戻るまでの間、0.1 s 毎に行った。チューブ内の音場は、あらかじめ感度校正 (4.3.4 節参照) を行った自作の直径 $\sim 2\text{ mm}$ の PZT プロブをバッファー溶液に挿入することで計測した。その写真を感度校正用ハイドロホンと併せて Fig.3.6 に示す。PZT は圧電素子であるため、音場により材料内に発生したひずみを電圧波形に変換することができる。PZT プロブの出力は、デジタイザー (National Instruments, USB-5133) を通し PC に取り込み、高速フーリエ変換 (fast Fourier transformation: FFT) を施すことにより解析した。Fig. 3.4(b) に計測の様子を示す。

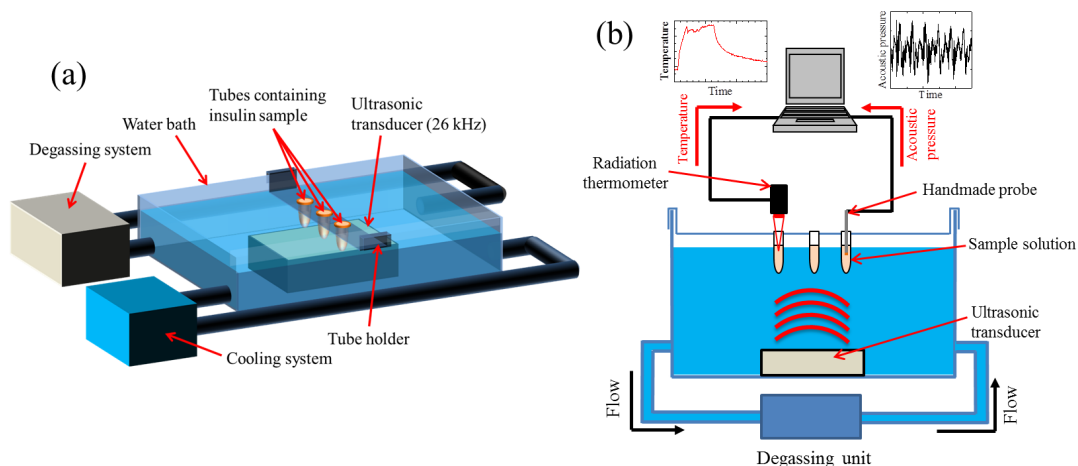


Fig. 3.4 (a)Schematic illustration of the laboratory-built experimental system for the ultrasonic irradiation experiment. Tubes containing insulin sample are set above the ultrasonic transducer with fundamental frequency of 26 kHz. The water bath is filled with water degassed by the degassing unit. (b)Sectional view of the experimental system. The temperature change and acoustic field in the sample tube are measured by the non-contact radiation thermometer and the handmade piezoelectric probe, respectively.

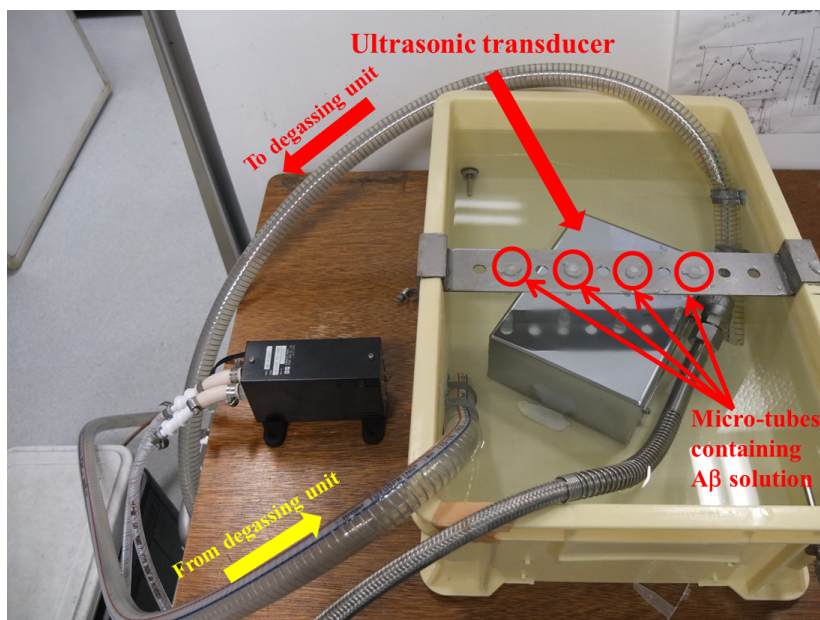


Fig. 3.5 Appearance of the experimental system for ultrasonic irradiation experiment.

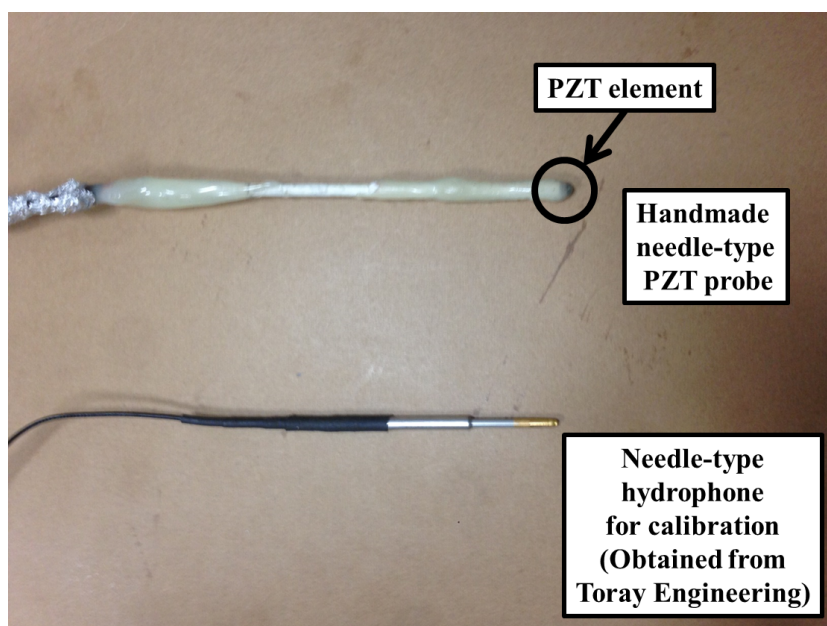


Fig. 3.6 Appearance of handmade PZT probe and needle-type hydrophone for the calibration experiment.

3.3.5 高速攪拌実験

本研究では、超音波照射の比較実験として 1200 rpm の高速攪拌実験を行った。ここで、高速と表記するのは、1200 rpm という攪拌速度は、アミロイド線維の研究分野で用いられるそれ (~500 rpm) よりも著しく速いからである。例えば、Cremades ら^[32] は、 α -シヌクレインの凝集反応を加速するために 200 rpm の攪拌を、Yoshimura^[30] らは、 β_2 -ミクログロブリンの線維化を誘発するために 600 rpm の攪拌処理を用いている。以下、この 1200 rpm の攪拌処理のことを HSS(high speed stirring) と表記する。

HSS 実験においても、超音波照射実験に用いたものと同様のサンプルを用い、その凝集反応を評価するために、~30 min に一度程度 ThT アッセイを行った。攪拌には表面をテフロン樹脂でコーティングした攪拌子をマグネティックスターラーで回転させる方式を採用した。本論文中での攪拌処理はすべてこの方式により行った。

3.3.6 電子顕微鏡観察

凝集実験により形成した凝集体の形態を観察するために透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscopy: TEM) による観察を行った。観察には、HITACHI H-7650 システムを用いた。加速電圧は、80 kV である。サンプル溶液をカーボンコーティングしたグリッド上に 1 min 吸着させ、その後、2% のモリブデン酸アンモニウムで染色し、観察用ロッドに設置し、ネガティブ染色法による観察を行う。観察倍率は、8,000~20,000 倍にて観察を行った。

3.4 実験結果

3.4.1 HSS 条件化でのインスリンの活性化エネルギー

まず初めに、インスリンの線維形成反応の活性化エネルギーを求めるために、異なる温度条件化 (20, 50, 60, 70 °C) で HSS アジテーションを与えたときの凝集反応を調査した。Fig. 3.7 にその実験結果を示す。なお、実験の再現性を確認するために、各温度で 3 回ずつ独立な実験を行った。各サンプルの ThT 蛍光強度の経時変化は、蛍光強度の変化しないラグタイムを経て急激に上昇し、その後、飽和するという二段階の凝集過程を示した。これは、アミロイド線維が形成される際の典型的な ThT 蛍光強度変化の曲線であり、20 °C で作製した凝集体を TEM で観察すると、Fig.3.7 に示すような線維が観察された。ThT 蛍光強度は形成された線維の量と比例すると考えられるため、各プロットに対し核生成-線維伸長二段階理論モデル^[20, 21] によるフィッティングを行い、核生成の反応速度定数 k_n と線維伸長の反応速度定数 k_g を算出した。理論モデルによる線維濃度 $[B]$ の時間変化は、以下の式で表される。

$$[B] = [A]_0 \left[1 - \frac{k_n + k_g[A]_0}{k_n \exp(k_n + k_g[A]_0)t + k_g[A]_0} \right] \quad (3.1)$$

ここで、 $[A]_0$ はモノマーの初期濃度 (100 μ M) である。アレニウスの式から、反応速度定数と活性化エネルギーの関係は、以下のように書くことができる。

$$k = A \cdot \exp \left(-\frac{E_a}{k_B \cdot T} \right) \quad (3.2)$$

ここで、 k, A, E_a, k_B, T は、ある反応の反応速度定数、前因子、活性化エネルギー、ボルツマン定数、絶対温度である。この式の両辺の自然対数を取り、変形すると、

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{k_B} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.3)$$

となる。横軸に $1/T$ 、縦軸に反応速度定数 k の対数をとったものはアレニウスプロット (Arrhenius plot) と呼ばれ、この近似直線の傾きを求めることで反応の活性化エネルギーを求めることができる。中性溶液中で HSS アジテーション下でのインスリンの核生成反応と線維伸長反応のアレニウスプロットを Fig. 3.7 の差し込み図に示す。なお、 k_n, k_g の単位はそれぞれ、 $[1/h], [1/\mu M \cdot h]$ である。これらの直線から求めたそれぞれの過程における活性化エネルギーは、核生成反応 $E_a^n = 734$ kJ/mol、線維伸長反応 $E_a^g = 49.1$ kJ/mol であった。

3.4.2 超音波照射の凝集加速効果

次に、超音波による凝集加速効果を調査するために、インスリンに対する超音波照射実験を行った。その ThT 蛍光強度の経時変化を Fig. 3.8 に示す。また、その比較実験として 70 °C に加熱した状態での放置実験と HSS アジテーションを与えた場合の結果も Fig. 3.8 に示す。加熱したサンプルでは、10 h 付近から ThT 蛍光強度がわずかに上昇したが、そのレベルは低

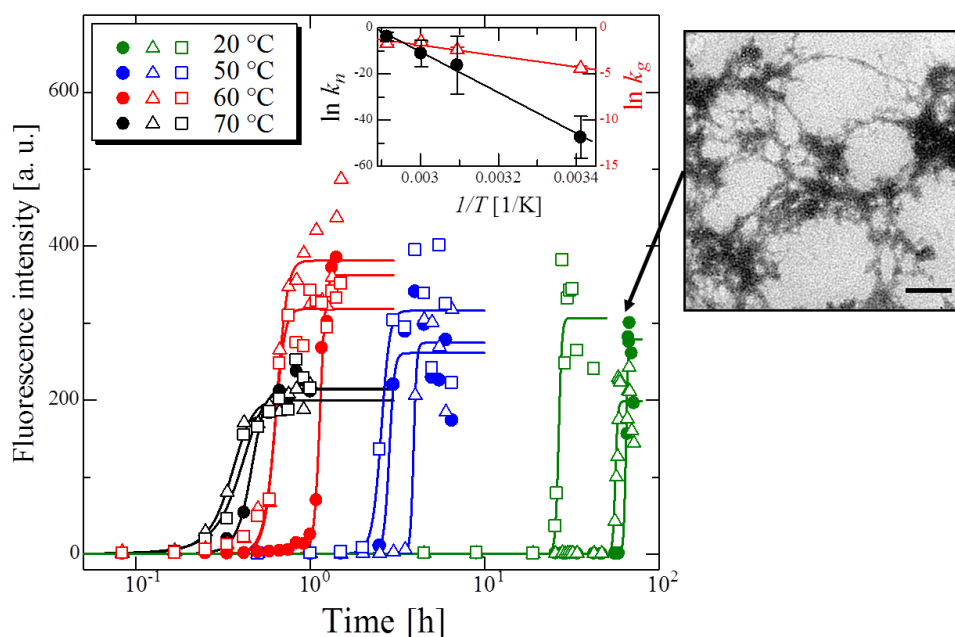


Fig. 3.7 Experimental results to obtain the activation energies in the nucleation and fibril elongation reaction of insulin. Time courses of the ThT fluorescence intensity caused by HSS agitation under four various temperatures are fitted by the nucleation-growth two-step model to extract rate constants for nucleation and growth. Inset shows the Arrhenius plots for the nucleation and growth reaction. The TEM image shows the morphology of the aggregates formed under 20 °C. The scale bar denotes 200 nm.

く、100 h 以内に線維形成は観察されなかった。20 °C で HSS を与えたサンプルでは、およそ 50 h 程度で ThT 蛍光強度が上昇し、アミロイド線維が形成された (Fig. 3.7 参照)。一方、超音波を照射したサンプルでは、その ThT レベルは、数分で上昇するという劇的な加速現象が観察された。形成された凝集体を TEM 観察すると、攪拌で形成された線維よりも太く短い形態の凝集体が多く観察された。これは、超音波の分解効果^[43]により一度形成された長い線維が短く分断されたためと考えられる。

超音波照射したサンプル中の温度変化を調べたところ、1 周期当たりの平均温度はおよそ 20 °C であった。これは、Fig. 3.8 に示す HSS のサンプルと同じであるが、ThT 蛍光強度が最大値の半分の値に到達する半値時間を比較すると、超音波照射したサンプルは、~7 min, HSS を加えたサンプルでは ~50 h と顕著な差がみられた。実験結果から、超音波照射は HSS に比べ、インスリンの線維化に要する時間を ~430 倍に短縮できるということが明らかになった。

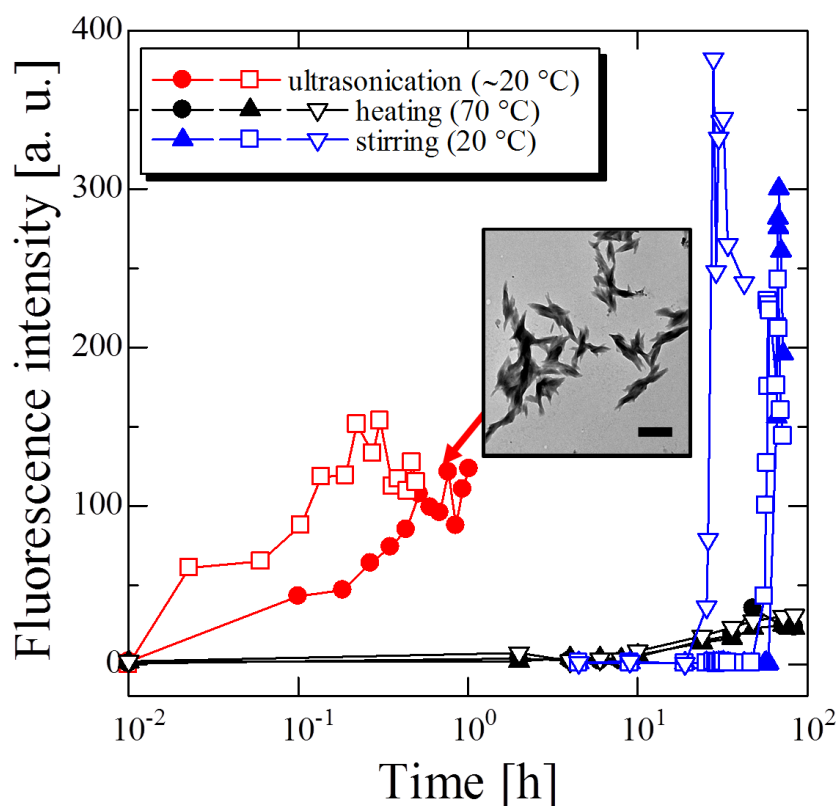


Fig. 3.8 Time courses of the ThT fluorescence intensity caused by ultrasonic, stirring, and heating agitations. The solution temperatures during applying agitations are shown in the labels. (The temperature for the ultrasonic agitation is the average during the 5-min sequence, being identical to the temperature under the stirring agitation.) Inset shows a TEM image of fibrils formed under the ultrasonic irradiation. The scale bar denotes 200 nm.)

3.4.3 超音波照射条件と凝集反応の関係

超音波照射によりチューブ内に作り出される温度場・音場とインスリンの凝集反応の関係を調査するために、音圧の異なる周波数 26 kHz の超音波を用いて超音波照射実験を行った。超音波照射実験を行うにあたり、まず初めに、超音波照射器の出力とチューブ内音場の関係を調査した。その結果を Fig. 3.9 に示す。この図の縦軸は、サブハーモニックと呼ばれる基本波の 1/2 の周波数を有するモードの強度 ($I_{1/2}$) を基本波の強度 (I_1) で正規化したものであり、取得した音圧波形の FFT スペクトルより求めた。後に詳細に議論するが、サブハーモニックの強度は、気泡の運動と深く関連していることが知られている^[101] ため、ここではサブハーモニックの強度を気泡の存在の指標として用いる。この実験では超音波照射器の出力を 7~10 の

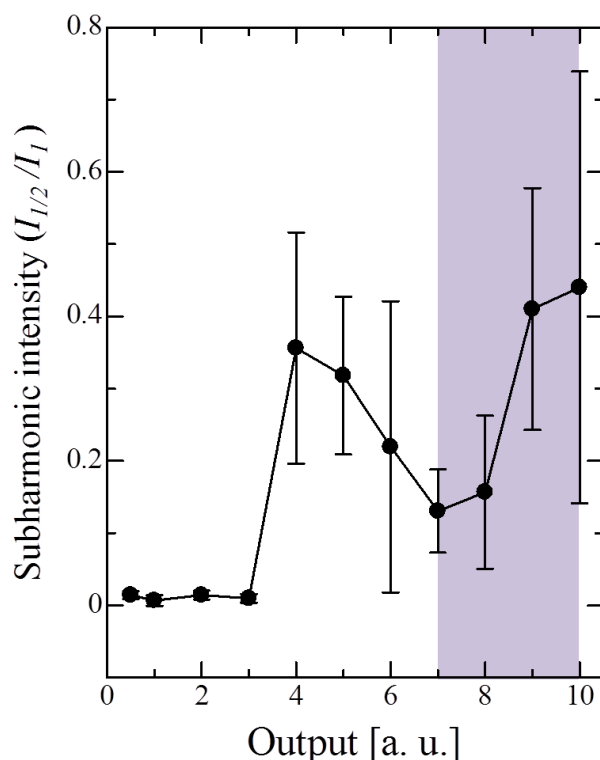


Fig. 3.9 Change in the normalized subharmonic intensity as the output power level of the ultrasonic generator increases. The shaded region indicates the output level used in the aggregation reaction. Shaded area is the output range used in the experiments. Error bars denote standard deviation among six independent measurements.

範囲に設定した。これに関してもものに詳細に議論するが、サブハーモニックの強度は2つの閾値を持つことが知られており、1つ目の閾値 (Fig.3.9 の出力 4) を超えたところでは、出力とその強度は比例関係になく、2つ目の閾値 (Fig.3.9 の出力 7) を超えたときに出力と比例関係になるためにこの範囲で実験を行った。

Fig. 3.10(a) には、超音波を照射した4つのサンプルの ThT 蛍光強度の経時変化を示す。このうち2つのサンプルは超音波により凝集反応が加速され、1 h 程度で ThT 蛍光強度が最大値に到達し、その後、減少している。この ThT 蛍光強度の減少は超音波の分解効果^[43]に起因するものだと考えられる。一方、他の2サンプルは、超音波を照射しても6 h までその蛍光強度が上昇することはなかった。これらのサンプルの超音波照射中の温度変化を Fig. 3.10(b) に示す。これら4サンプルの温度変化曲線の明らかな差は見られず、超音波照射中に $\sim 35^\circ\text{C}$ に温度が到達し、その後、ベースラインに冷却されている。差し込み図に示したように、それらの平均温度と最大到達温度にも大きな差はない。この結果は、超音波によるバルク溶液の温度上昇が超音波による凝集加速機構の中で支配的ではないことを示唆する結果である。

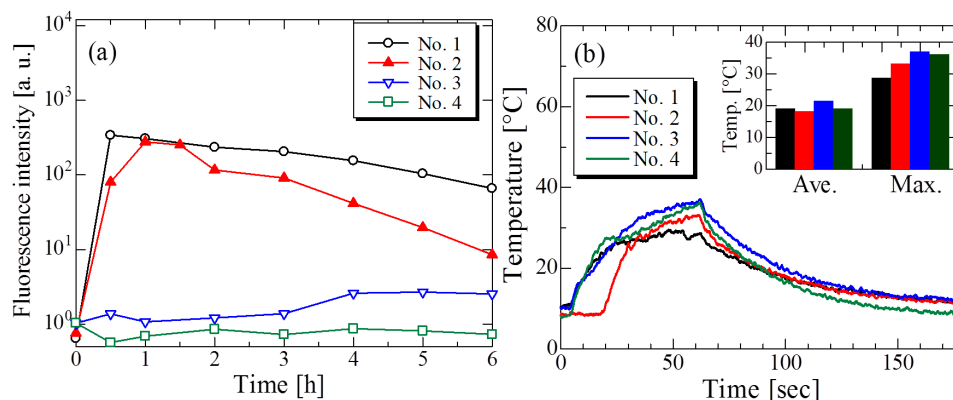


Fig. 3.10 (a)Evolutions of the ThT fluorescence of four samples exposed to ultrasonic agitation. The same power (the output level of 10) was applied to the ultrasonic transducer for samples No.1 and No.2, and the output level of 7.5 was used for measurements No.3 and No.4. (b)Temperature profiles of each sample in (a) measured from the beginning of ultrasonic irradiation. Inset shows average and maximum temperatures of the four measurements (the same color is used for individual curve.)

次に、取得した音圧波形のFFTスペクトルから、超音波音場と凝集反応の関係を調査した。Fig. 3.11(a), (b)には、Fig. 3.10(a)で示した4サンプルの音圧波形とそのFFTスペクトルを示す。FFTスペクトルの縦軸は、基本波(26 kHz)のピーク強度による正規化を施している。FFTスペクトルを比較すると、凝集反応が加速されたサンプルでは、比較的高いサブハーモニックのピークが見られる。これに着目し、Fig. 3.11(c)には、横軸にサブハーモニックの強度、縦軸に実験開始から1 h後のThT蛍光強度($\text{ThT}_{1\text{h}}$)をとり、プロットした図を示す。サブハーモニック強度が低い領域ではThT蛍光強度の上昇は見られなかったが、サブハーモニック強度が閾値($I_{1/2}/I_1 \sim 0.1$)を超えると、凝集反応が超音波により引き起こされていることがわかる。これは、超音波誘起凝集加速現象の機構にキャビテーションが深く関連することを示唆する結果である。

3.5 考察

Smithら^[96]は、pH 1のHCl溶液中、60~80 °Cの温度域でウシインスリンの線維化反応を調査し、静置条件化での核生成反応の活性化エネルギーを $117 \pm 2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ と報告している。また、Mauroら^[102]は、50~70 °Cの温度条件化でpH 1.6のKCl/HCl溶液中でヒトインスリンの線維形成実験を行い、その凝集反応の活性化エネルギーを $25 \pm 2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ と報告している。本研究において、pH 7.4のPBS中で凝集実験を行った結果(Fig. 3.7)、中性条件化のウシインスリンの核生成反応への活性化エネルギーは、 $734 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ であり、酸性のそれと比較すると高い値である。この値は、HSSアジテーションのもとで求めたものであり、

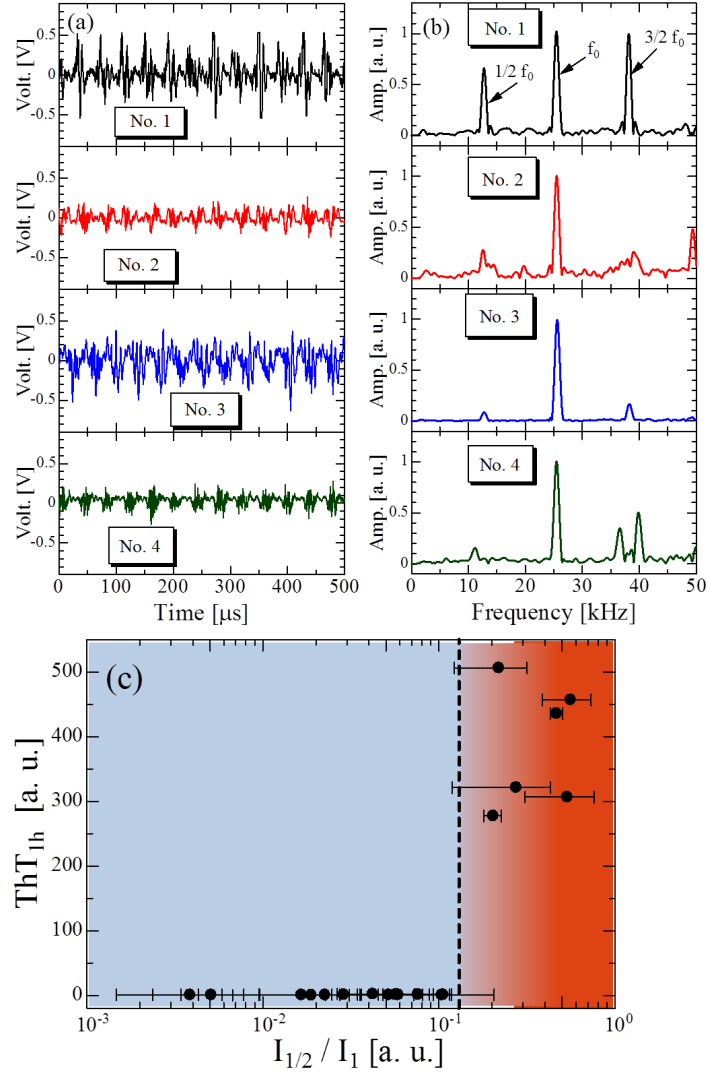


Fig. 3.11 (a) Waveforms in the samples shown in the Fig. 3.10 (a), and (b) corresponding FFT spectra of them. The vertical axis is normalized by the fundamental peak height. (c) Relationship between normalized subharmonic intensity ($I_{1/2}/I_1$) and the ThT fluorescence intensity. Each plot denotes the ThT level at 1 h after start of the experiment. The error bars denote the standard deviation among three normalized subharmonic intensities which are calculated from the waveforms measured at different times.

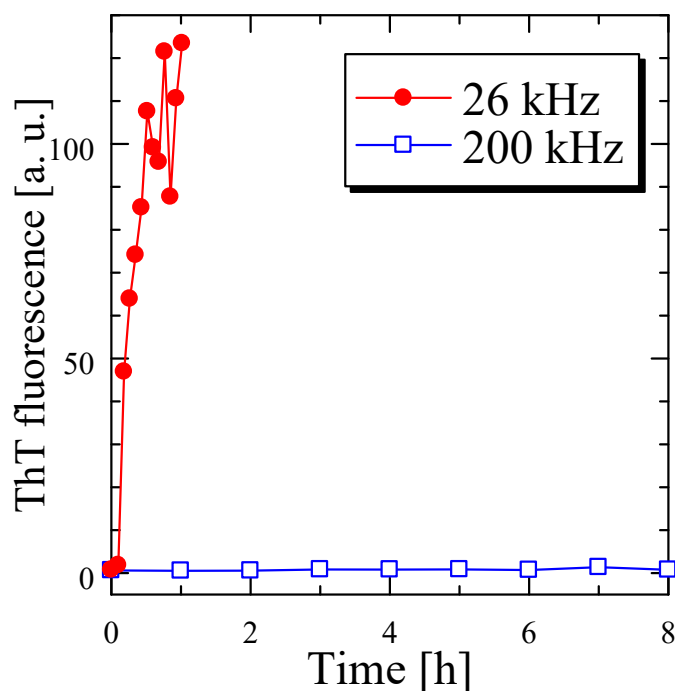


Fig. 3.12 Time courses of the ThT fluorescence intensity caused by ultrasonic irradiation with frequencies of 26 and 200 kHz.

静置条件化での核生成への活性化エネルギーは、さらに高いと考えられる。他のタンパク質 ($A\beta_{1-40}$: $95.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ^[103], $109.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ^[104], α -シヌクレイン: $72 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ^[105]) と比較しても、核生成への活性化エネルギーは高く、インスリンの中性での超安定構造は、3.2 節で述べた凝集加速因子の中から支配的なものを特定するために適していると考えられる。

超音波照射は、同じ温度下での HSS アジテーションにより引き起こされた凝集反応 ($\sim 50 \text{ h}$) と比較して、凝集反応を ~ 430 倍 ($\sim 7 \text{ min}$) も加速することが可能である。HSS アジテーションは、攪拌効果により、モノマー同士の会合回数を増加させ、静置条件化よりも凝集反応を加速する。超音波照射の溶液攪拌効果と HSS の攪拌効果を定量的に比較するのは、困難である。そこで、超音波による攪拌効果が周波数が上昇すると増大することに着目し、26 kHz と 200 kHz の超音波照射により引き起こされる凝集反応を比較した。その結果を Fig. 3.12 に示す。攪拌効果がより高いと考えられる 200 kHz の超音波照射では、インスリンの凝集反応は 8 h までには引き起こすことはできず、超音波照射による攪拌効果は凝集加速の支配的因子でないことが示唆された。また、バルク溶液の温度上昇 (因子 2) に関しては、超音波照射により 30 min 以内に凝集反応が観察されたサンプルの最大到達温度は 40°C であるが、サンプルを 70°C に加熱した場合には、100 h 以内に凝集反応が観察されなかったことや、超音波照射により凝集を加速されたものとそうでないものの温度変化に明確な差異がみられなかったことから、支配的な凝集加速因子から排除すべきである。

サブハーモニック強度が閾値 ($I_{1/2}/I_1 \sim 0.1$) を超えたときのみに凝集反応が起きることは、

その機構にトランジェントバブル (transient bubble: TB) が関連していることを示唆する。TB とは、振幅の大きな音場内で発生する非線形性の高い半径運動をし、膨張・圧壊を繰り返す気泡のことである。ソノケミストリー分野で研究されている超音波による化学反応の促進機構には、この TB の圧壊イベントが重要な役割を果たしている。Fig. 3.9 に示した超音波照射器の出力とサブハーモニックの関係を見ると、出力レベル 0~3 の間では、サブハーモニック強度はほぼゼロである。レベル 4 を超えるとサブハーモニック強度が一旦上昇するが、レベル 7 程度で減少する。その後、レベル 7 に到達すると再びその強度が上昇し、レベル 10 まで上昇し続けた。サブハーモニック成分が 2 つの閾値を持つことは、これまでも報告されており、Neppiras^[101] によると、一つ目の閾値は、溶液中に安定なキャビテーション (Stable bubble: SB) の非線形的な振動に起因する閾値であり、二つ目の閾値は、TB が膨張・圧壊を繰り返すことによりサブハーモニック成分が放射され始める閾値^[106] である。各閾値において、サブハーモニック強度が上昇することは、Eller ら^[107] によって理論的にも確認されている。今回実験を行った出力レベルの範囲は、二つ目の閾値よりも高い範囲に設定しており (Fig. 3.9), サンプル溶液中に TB が発生していると考えられる。サブハーモニック強度が閾値を超えたときに凝集反応が起きることは、その凝集加速機構に TB が深く関連していることを示している。また、TB が発生していると考えられる出力レベル下でも凝集反応が引き起こされる場合とそうでない場合があることは、その TB の最大半径や圧壊時の温度等がその機構に関連していることを示唆している。

第 4 章 $A\beta$ の凝集反応の超音波周波数・音圧依存性

3 章で得られた結果より，超音波による凝集加速現象の機構には溶液中に発生するキャビテーションがその機構に関連していることが示唆された．本章では，キャビテーションの性質が超音波の照射条件に依存することに着目し， $A\beta_{1-40}$ の凝集加速現象の周波数・音圧依存性を調査する．その結果から，核生成反応を加速するために最適な周波数が 30 kHz 付近に存在することを発見した．また，最適周波数において音圧を調整することにより，核生成の反応速度定数を超音波を照射しないときと比べて約 1000 倍上昇させることに成功した．

4.1 超音波キャビテーション

キャビテーション (cavitation) 現象とは，液体の圧力が蒸気圧を下回ることによる発泡現象である．液体の発泡現象には沸騰 (boiling) もあるが，これは，液体の温度上昇に伴い，蒸気圧が上昇し，液体の圧力が飽和蒸気圧を下回るためにおきる現象である．

超音波は疎密波であるため，超音波が伝播する媒質中に正負の圧力変動をもたらす．超音波を照射された液体の圧力が超音波の負圧により飽和蒸気圧を下回った時に液体が気化し，気泡が発生する．この現象を超音波キャビテーションと呼ぶ．脱気処理を施していない液体に関しては，溶液中に溶存気体が存在するため，その気体を核として，飽和蒸気圧よりも高い圧力において発泡現象が確認される．発生した気泡は，超音波の圧力変動に伴い，膨張・収縮を繰り返す．超音波の圧力が負圧の時は，気泡は膨張していくが，正圧に転じると成長した気泡は一気にその中心に向かって収縮する．TB のように音圧振幅が大きい場合，数 10 ns の時間スケールで体積が 100 万分の 1 程度に収縮するために，気泡内部では衝撃波が発生する [89]．また，この短時間の気泡の圧壊は外部と熱の交換を行う間もなく，断熱的な過程を経て起きるので，気泡内気体の温度 $\sim 15,000$ K [90]，圧力 1,000 気圧 [108] という超高温高圧の場が作り出され，そのルミネッセンスと呼ばれる発光現象や，水の熱分解等によりラジカルの放出などを引き起こす．衝撃波の発生やラジカルの放出等により，有機物質等の分解効果が促進される [109]．また，キャビテーションの半径運動は，高い非線形性を示し，キャビテーション自身が音源となることで高調波成分 ($2f, 3f, \dots$) や分調波成分 ($1/2f, 3/2f, \dots$) を放出する [101]．このような周波数成分の音波を計測することからキャビテーションの存在や運動の様子を知ることができる．

4.2 超音波の照射条件と化学反応

ソノケミストリーの分野において，超音波の照射条件と化学反応の促進度合の間には深い関係があることが知られている．Koda ら [109] は，ポルフィリンという有機化合物の超音波音場下での分解反応を照射する超音波の音圧と周波数 (19.5 kHz \sim 1.2 MHz) を変化させながら調査した．その結果，分解反応は強い音圧・周波数依存性を示し，分解反応を加速するために最

適な周波数が 200 kHz 付近に存在することを示唆した。この最適周波数は、その機構の根幹を担うキャビテーションの圧壊時の温度上昇やキャビテーション発生の閾値となる音圧、キャビテーションの濃度などの多くのパラメータが周波数に強く依存し、それらのパラメータのバランスを最適化する周波数である。

前章の結果から、超音波照射によるアミロイド線維の凝集加速機構には、TB の半径運動が関連していることが示唆された。このことから、超音波によるアミロイド線維の凝集加速反応も周波数・音圧依存性を持つ可能性がある。凝集反応の周波数・音圧依存性を調査することは、凝集加速のために最適な超音波の照射条件を明らかにし、アルツハイマー病の診断法への応用の一助になりうる。また、その反応そのものの機構を詳細に知るためにも、凝集加速機構の解明は不可欠と考えられる。そこでこの章では、アルツハイマー病の原因タンパク質であり、他残基数のものと比べてその存在量が多い $A\beta_{1-40}$ に対して超音波照射実験を行い、その反応の周波数・音圧依存性に関して調査する。

4.3 実験手法

$A\beta_{1-40}$ サンプルに対して行った実験の手順を示す。ここで、特に明記していない実験手法に関しては、前章でインスリンに対して行った実験手順により行った。

4.3.1 $A\beta$ サンプル

凍結乾燥された粉末状の $A\beta_{1-40}$ (Peptide Institute: 4307-v) に DMSO に加え、10 min 200 rpm で攪拌し、溶解した。その後、100 mM の PBS (100 mM: NaCl) で $A\beta$ の濃度が 10 μ M になるように調整した。その後、500 μ L ずつサンプルチューブに分注し、-40 $^{\circ}$ C の冷凍庫内で実験の直前まで保管し、凝集することを防いだ。なお、DMSO と PBS の体積分率は 1:4 とした。

4.3.2 周波数・音圧可変装置

$A\beta$ の凝集反応の周波数・音圧依存性を調査するために、周波数と音圧を独立に設定し、サンプルに超音波を照射可能な実験系を構築した。その実験系の俯瞰図を Fig. 4.1(a) に、断面図を Fig. 4.1(b) に、写真を Fig. 4.2 に示す。この実験系では、サンプルを含むチューブを水面に置いたステンレス製反応容器の底面に設置したランジュバン型超音波振動子より超音波を照射する。超音波振動子は、クランプにより固定しているため取り外し可能であり、基本周波数が 28 kHz (TAMURA Corp.: TBL4535D-28HB) と 40 kHz (TBL4535D-40HN) のものを実験に用いる周波数に応じて使い分けた。実験には、7 種類の周波数を用いたが、19, 29, 50, 71, 143 kHz には、基本周波数 28 kHz のものを、208, 239 kHz の実験には基本周波数 40 kHz のものを用いた。超音波振動子には、ファンクションジェネレータ (NF Instruments Corp.: WF1974) で発生した交流電圧波形をバイポーラアンプ (NF Instruments Corp.: BA4825) で増幅し、電圧を印加した。この時、印加する交流電圧波形の振幅と周波数を調節することにより、サン

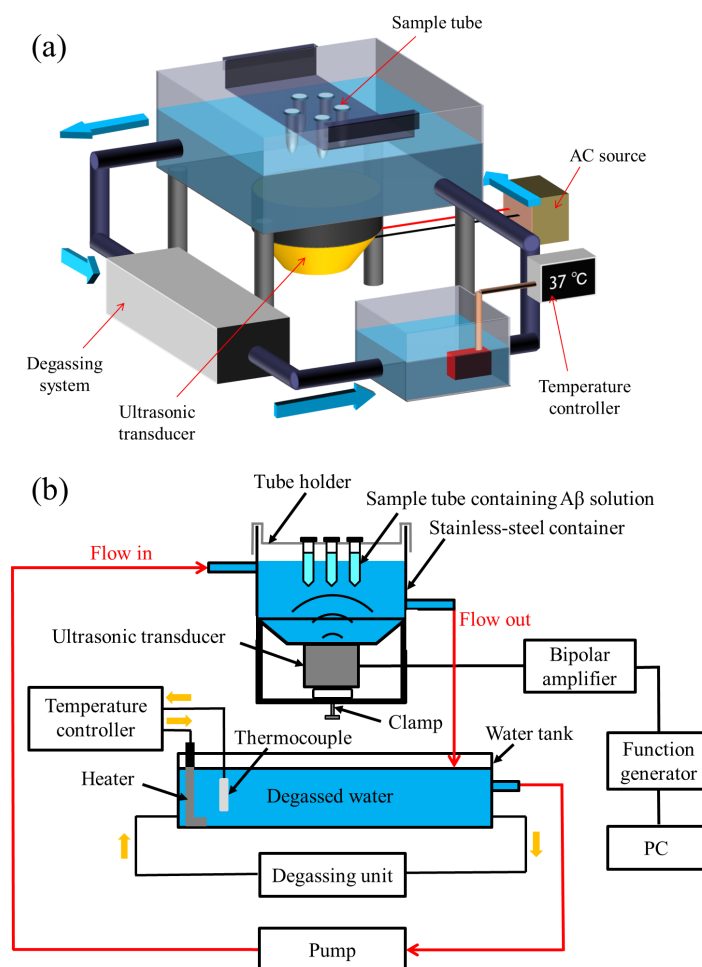


Fig. 4.1 Schematic illustration of (a)overhead and (b)sectional view of the experimental system which can control the irradiation condition.

プルに照射する超音波の周波数と音圧を変化させることができる。反応容器内の水は、水槽中で十分に脱気システム (KAIJO: 40006A) により脱気し、マイクロポンプ (Enomoto Micro Pump Mfg. Co., Ltd.: MW-901EEA) により反応容器へと流入した。水槽内の水温は、温度コントローラ (TOHO Electronics Inc.: DT-03-1) に接続したヒータ (Hakko Electronics Co., Ltd.: SWA1505) により 37 °C に調整した。サンプルチューブは円形に 5 本設置できるようにし、類似した音場下で複数のサンプルに対して超音波照射実験を行えるようにした。

4.3.3 超音波照射実験

超音波照射実験においては、上記の実験系を用いてファンクションジェネレータの出力を PC により制御することにより、1 min 超音波を照射し、9 min 静置するという 10 min のサイクルを実験終了 (~10 h) まで行った。30 min に一度、チューブからサンプルを抜き取り ThT アッセイ (3.3.2 章参照) を行った。

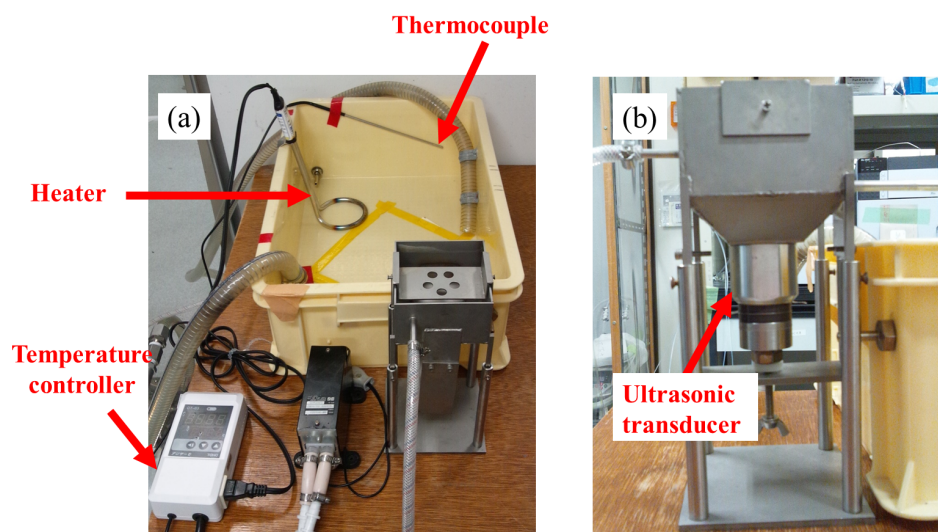


Fig. 4.2 (a) Appearance of the experimental system for ultrasonic irradiation experiments. (b) Side view of reaction container and the ultrasonic transducer with fundamental frequency of 28 kHz.

4.3.4 プローブの感度校正

本章で行う実験では、照射する超音波の周波数が凝集反応に及ぼす影響を調査するために周波数の異なる超音波の音圧値を一定に保つ必要がある。音圧プローブの感度 $[V/Pa]$ は、周波数に依存するので、各周波数における感度を求め、その値を用いて各周波数における音圧値を算出する必要がある。そこで感度が既知のハイドロホン (Toray Engineering Co., Ltd.: NH8193) を用いた感度校正実験を行った。ハイドロホンの感度は、1-5 MHz の範囲で 10% 以内ではば変化しないので、使用する周波数範囲 (19-239 kHz) でも 130 nV/Pa で一定とみなした。校正実験は、Fig. 4.3 に示す実験系を用いて行った。ファンクションジェネレータからの圧電体に印加する入力波形の周波数を目的の周波数に設定し、振幅を変化させたときの PZT プローブとハイドロホンの出力を記録し、それらの傾きを比較することにより、その周波数におけるプローブの感度を算出した。本章においては、音圧の評価指標として二次高調波音圧を採用したので、実験に用いた周波数の 2 倍の周波数におけるプローブの感度を求めた。それらを Table 4.1 に示す。これらの値を用いて、PZT プローブにより受信した電圧波形に FFT 処理を施し、ピークの高さから音圧値を算出した。二次高調波音圧を評価の指標として用いた理由は、以下のとおりである。(i) $A\beta$ はインスリンなどと比較して凝集しやすいタンパク質であり、サブハーモニックモードが観察されるような振幅の大きな音場中であると即座に凝集してしまい、音圧や周波数の変化に伴う凝集反応の応答を評価することが困難である。(ii) その凝集能の高さから、バルク溶液の温度が上昇することは、超音波の周波数・音圧変化に伴うキャビテーションの運動の変化が凝集反応にもたらす寄与の評価を困難にする。(iii) 基本波成分の

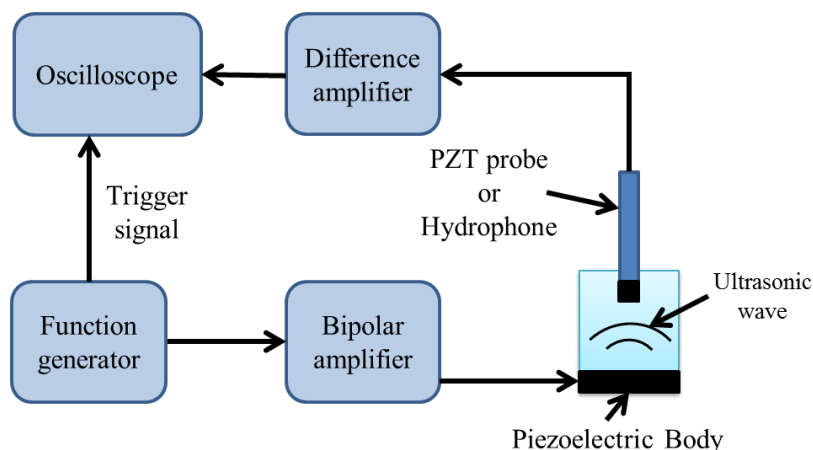


Fig. 4.3 Schematic illustration of experimental system for calibration experiment of PZT-probe sensitivity. The voltage waveform generated in the function generator is amplified by the bipolar amplifier and applied to the piezoelectric body. The piezoelectric body emits ultrasonic wave, and the ultrasonic wave is received by the PZT probe or the needle-type hydrophone whose sensitivity is known. Received waveform is monitored in the oscilloscope after amplification in the difference amplifier.

Table 4.1 Sensitivities of the handmade PZT probe at each frequency calibrated with a needle-type hydrophone.

second-harmonic frequency [kHz]	sensitivity [$\mu\text{V}/\text{Pa}$]
38	1.52
58	5.94
100	15.5
142	21.6
286	11.9
416	9.82
478	13.1

音圧は、振動子の発振振幅が上昇し、溶液中にキャビテーションが発生すると上昇しなくなり、逆に減少し始める。発生したキャビテーションは、その非線形性の高い半径運動から高調波成分を発生させ、これらの高調波成分は、発振振幅が上昇するにつれ音圧が上昇^[101,111,112]し、音場の強さを再現するために適している。実際に、周波数 29 kHz で振幅の異なる電圧波形を印加したときの基本波の音圧と核生成の反応速度定数を Fig. 4.4 にプロットしたが、明確な相関は見られないので評価指標として適していないと考えられる。

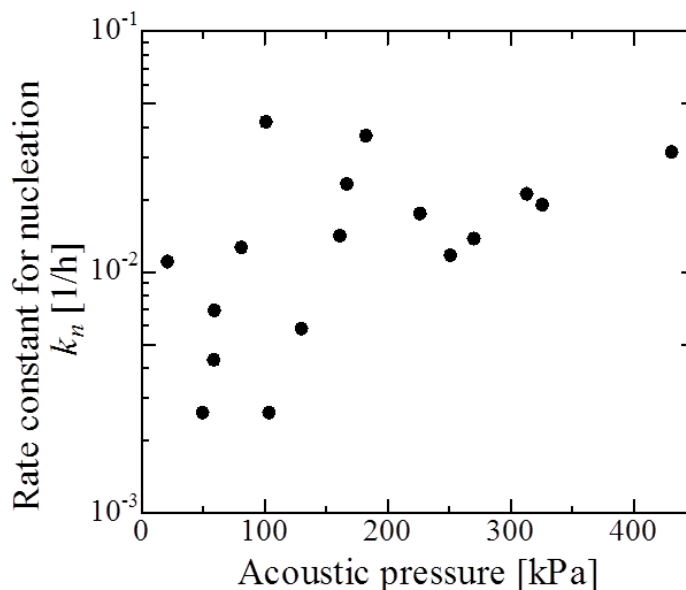


Fig. 4.4 Relationship between the acoustic pressure of fundamental mode and the rate constant for nucleation k_n . There is no relationship, obviously.

4.3.5 円偏光二色性スペクトル測定

凝集体の二次構造を調査するために円偏光二色性 (Circular dichroism: CD) スペクトル測定を行った。CD スペクトル測定は、タンパク質凝集体を形成するモノマーの二次構造を調査するために広く用いられる手法であり、アミロイド線維を形成する β -シート構造では、220 nm 付近に負のピークがみられることが知られている^[110]。本研究で用いる溶液に含まれる DMSO は 220 nm 付近に大きな吸光ピークを持ち、大きなバックグラウンドを発生するため CD スペクトルを取得できない。そこで、CD 計測に際しては $A\beta$ を 0.05% アンモニア水で溶解し、その後、PBS により 10 μ M に希釈し、このサンプルを用いた。計測には JASCO J-820 蛍光分光器を用い、水晶セルの光路長は 1 mm のものを使用した。スペクトルは、5 回取得し、それらを平均化した。

4.3.6 ビーズを用いた凝集加速実験

超音波照射実験の比較実験として、マイクロビーズを溶液中に添加することによる凝集実験を行った。マイクロビーズは直径 1 μ m のシリカ製、ポリスチレン製、表面を修飾したポリスチレン製の三種類を Micromod 社から購入した (01-00-103(シリカ), 43-00-103(ポリスチレン), 01-05-103(表面修飾))。シリカ製のものとポリスチレン製ビーズは負の表面電荷を、表面修飾したポリスチレン製ビーズは正の表面電荷を有している。これらのビーズを 10 μ M の $A\beta$ 溶液に体積分率 0.01% 添加し、37 $^{\circ}$ C で放置し、その凝集反応への影響を調査した。

4.4 実験結果

4.4.1 冷凍処理の影響

本研究では、様々な条件下で多くの実験を行う必要があるため、溶液の初期条件を一定に保つ目的で一度に大量のサンプル溶液を作製し、冷凍して保管した。しかし、作製した溶液を一度冷凍・解凍することは、 $A\beta$ 分子に刺激を与え、核生成などを誘発してしまう可能性がある。そこでまず、サンプルを一度冷凍することが $A\beta$ サンプルにどのような影響を及ぼすかを調査するために、一度冷凍したサンプルとしていないサンプル各 3 本ずつに超音波照射実験と攪拌実験を行った。その結果を Fig. 4.5 に示す。これらの結果を比較すると、2 つのサンプルの凝集反応の間にほぼ差異はない。この結果を踏まえ、本研究では、すべての実験に一度冷凍したサンプルを用いる。

4.4.2 $A\beta_{1-40}$ の凝集反応の活性化エネルギー

$A\beta_{1-40}$ の凝集反応の活性化エネルギーを算出するために、異なる 4 種類の温度下 (25, 37, 45, 50 °C) で静置実験を行った。Fig. 4.6(a) に各温度条件化における ThT 蛍光強度の経時変化曲線を示す。なお、図中の誤差棒は独立な 3 つのサンプルに対する計測結果の標準偏差である。図中のフィッティング曲線は、核生成-線維伸長の二段階理論モデルを実験結果にフィッティングしたものであり、この曲線から、各温度における核生成 (k_n) と線維伸長 (k_g) の反応速度定数を算出し、両反応に関してアレニウスプロット (式 (3.3) 参照) を作成した。その結果を Fig. 4.6(b), (c) に示す。アレニウスプロットから、 $A\beta_{1-40}$ の核生成と線維伸長への活性化エネルギーはそれぞれ 61.91, 7.79 kJ·mol⁻¹ であった。この値は、前章でインスリンに対して求めた値と比較して小さく、 $A\beta_{1-40}$ が比較的凝集能が高いタンパク質であることを示している。

4.4.3 超音波照射により形成される線維の構造

$A\beta$ モノマーに超音波を照射した際に形成される凝集体の形態・構造を調査した。Fig. 4.7 にその結果を示す。37 °C で静置していたサンプルでは、10 h まで ThT 蛍光強度が上昇せず、凝集反応は観察されなかったが、インスリンに対して超音波照射実験を行ったときに用いた実験系 (Fig. 3.4 参照) の出力を 5 に設定し、超音波を照射すると、5 h のラグタイムを経たのち ThT 蛍光強度は急峻に上昇し、~6.5 h までに凝集反応は完了した。この ThT 蛍光強度変化曲線は、核生成・線維伸長過程を明確に示すものであり、アミロイド線維が形成されるときに典型的なものである。形成された凝集体の CD スペクトルを見ると、そのスペクトルは ~220 nm に負のピークを有し、アミロイド線維を形成する β -シート構造特有のものであった。一方、静置していたサンプルの CD スペクトルはモノマーのそれと変わらず、ランダムコイル構造のままであり、凝集体は形成されていない。超音波により形成した凝集体の形態を TEM により観察すると、Fig. 4.7 に示すような線維状の凝集体が観察され、これは超音波照射を用い

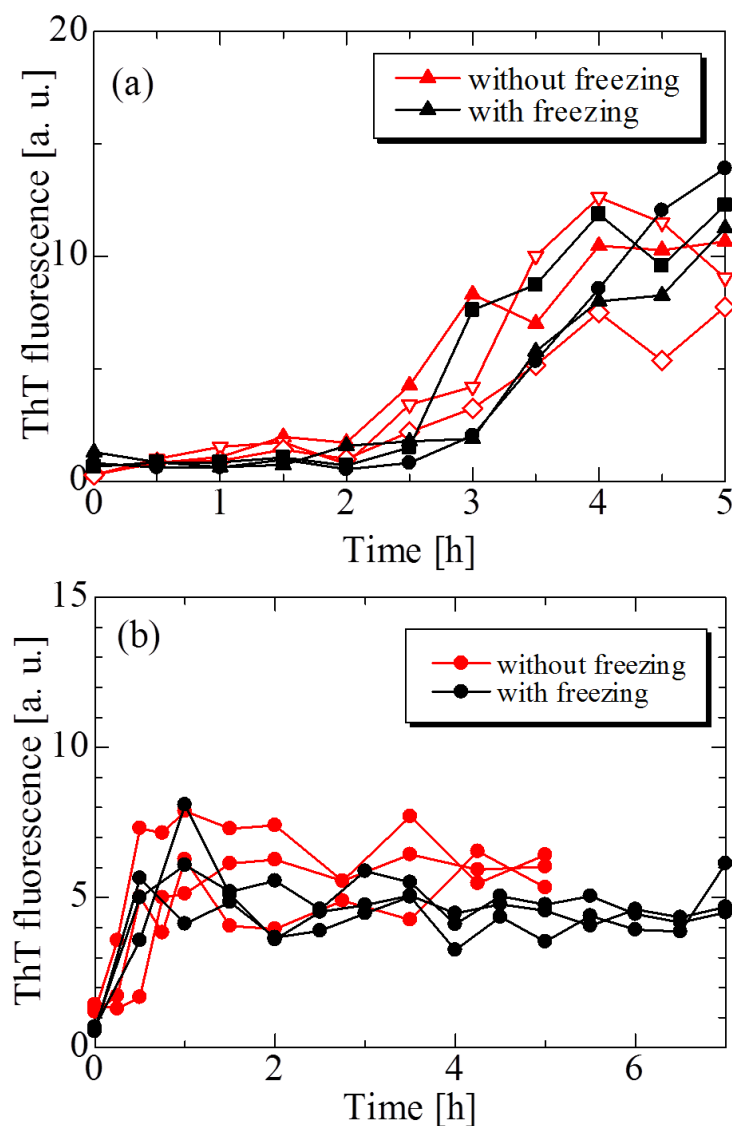


Fig. 4.5 Results of the comparison experiments between sample with and without freezing step under (a)29-kHz ultrasonic irradiation and (b)1,200-rpm stirring agitation.

ず形成した線維と類似した形態である。例えば, Lu らは, アルツハイマー病患者の脳内組織から抽出した $A\beta$ 凝集体をシードとして線維を形成し, その構造を解析したところ, 線維の直径は ~ 7 nm であり, ~ 80 nm の周期的なねじれによるくびれが観察された^[11]。また, 直径とねじれの周期に関しては, Nybo らが, 7-10 nm と 180-220 nm^[113], Goldsbury らが, 5-25 nm と 80-130 nm^[114] と報告している。これに対し, 今回超音波で形成した線維の直径とねじれ周期は, 6-10 nm と ~ 150 nm であり, これまでの報告値と一致する。

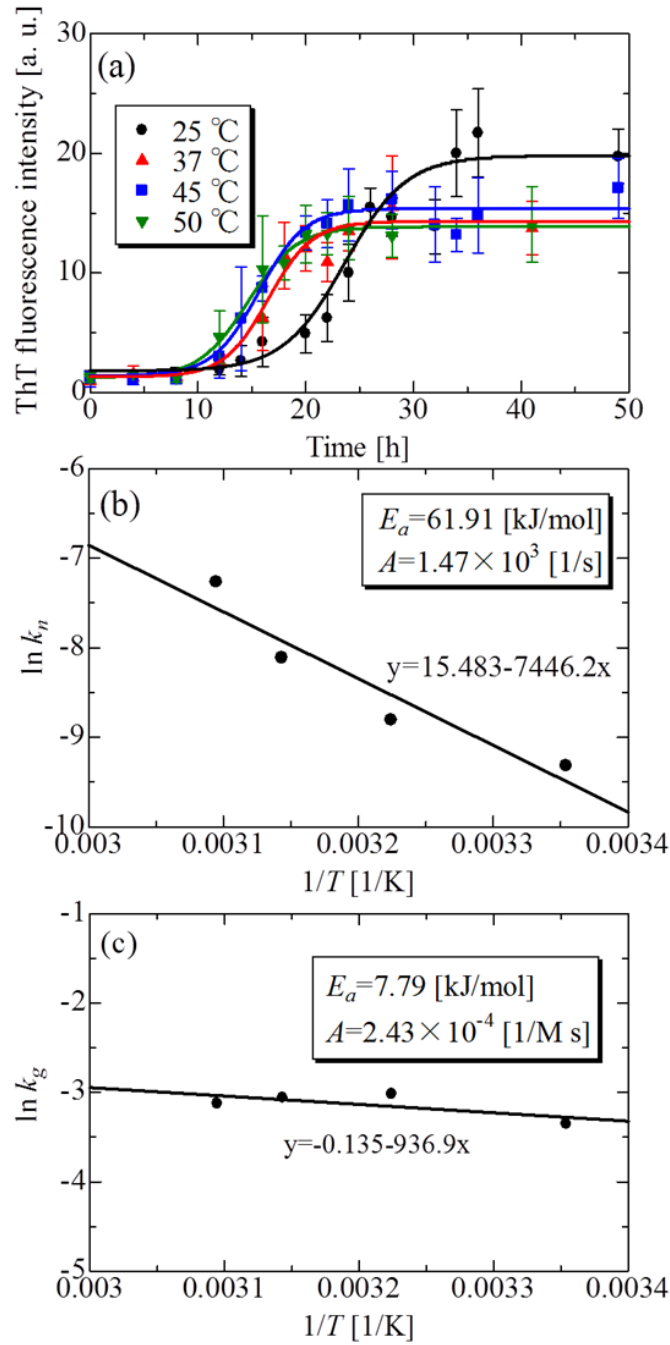


Fig. 4.6 Result of incubation experiments under various ambient temperatures (25, 37, 45, and 50 °C) and determination of activation energies for nucleation and growth. (a) Time course of ThT fluorescence intensity at each temperature. The solid lines denote fitted curves based on the nucleation-growth model. The Arrhenius plots for determining activation energies k_n and k_g for (b)nucleation and (c)growth of $A\beta_{1-40}$ fibril, respectively.

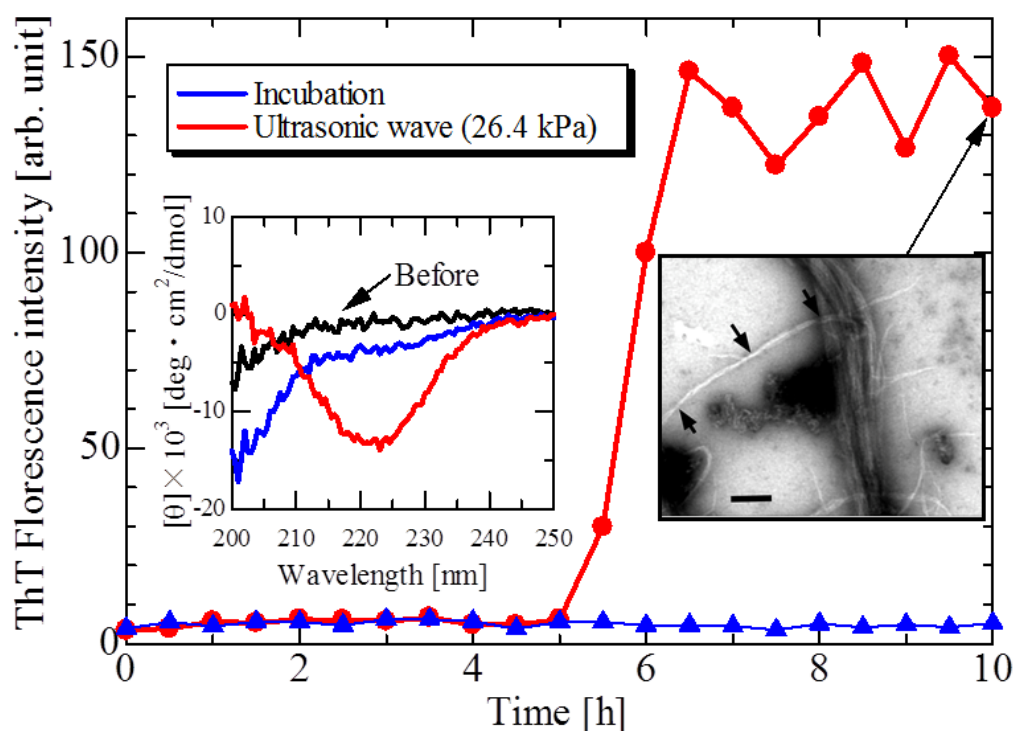


Fig. 4.7 Time courses of ThT fluorescence intensity caused by ultrasonic wave with output level of 5 in the experimental system shown in Fig. 3.4 at fundamental frequency of 26 kHz and by incubation without ultrasonic wave. Insets show the CD spectra of initial monomer solution (black), incubated solution for 10 h (blue), and solution under ultrasonic irradiation (red); and a TEM image of aggregates formed by ultrasonic-wave irradiation for 10 h. The scale bar denotes 100 nm. The arrows in the TEM image indicate the minimum diameters of the twisted fibrils. Concentration of samples is 10 μ M.

4.4.4 凝集反応の周波数依存性

$A\beta_{1-40}$ の凝集反応の周波数依存性を調査するために、19-239 kHz の範囲の 7 つの周波数を用いて超音波照射実験を行った。実験に際し、周波数依存性を独立に評価するためには、各周波数における超音波の音圧を一定に保つ必要がある。超音波照射実験を行う前にチューブ内の音場の波形を自作の針状 PZT プローブで計測し、あらかじめ行った校正実験より求めた各周波数における感度より取得した電圧値を音圧値に変換した。

Fig. 4.8 に各周波数における二次高調波の値を示す。すべての周波数においてその値が ~ 15 kPa 程度になるように印加電圧の振幅を調整した。Fig. 4.9, 4.10 に各周波数における音圧波形とこれらの FFT スペクトルを示す。FFT の図の縦軸は、基本波のピーク高さで正

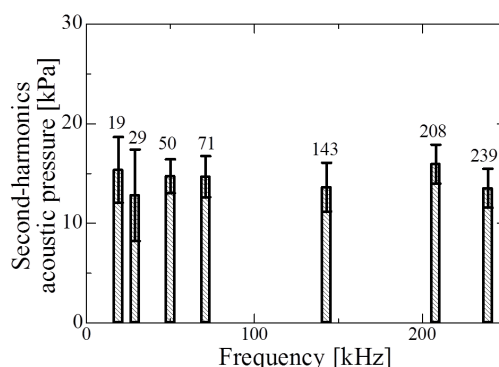


Fig. 4.8 Averaged acoustic pressure of the second-harmonics mode at each frequency. Error bar denotes standard deviation in five sample tubes. Numbers are measured fundamental frequencies.

規化している．各周波数の超音波を照射したときの $A\beta$ の ThT 蛍光強度の経時変化を Fig. 4.11(a) に示す．図中に示したフィッティング曲線は，核生成-伸長の二段階理論モデル (式 (3.1)) により描いた曲線であり，この曲線から各周波数における核生成 k_n と線維伸長 k_g の反応速度定数を算出した．その結果を Fig. 4.11(b) に示す．核生成への反応速度定数は，29 kHz において最大となり，最小の 143 kHz と比較するとおよそ 35 倍であった．一方，線維伸長反応は，周波数にはほぼ依存しない．つまり，超音波による線維化加速現象の本質は，核生成反応の加速であることがわかった．

実験結果より， $A\beta$ の核生成反応を加速するために最適な周波数は，29 kHz ということが明らかになった．超音波の周波数は，溶液中に発生するキャビテーションの半径運動に多大な影響を及ぼす．高周波数域においては，キャビテーションが十分に成長する時間がなく最大半径は小さくなり，圧壊時の気泡内気体の温度上昇も少ない．また，キャビテーション発生への音圧の閾値も高くなる．しかし，単位時間当たりのキャビテーション圧壊現象の回数やキャビテーションの体積分率は上昇する．本研究において実験に用いた周波数の中では，これらのパラメータが凝集反応を促進するために最適化される周波数が 29 kHz であったと考えられる．

4.4.5 超音波照射条件の最適化

最適周波数 29 kHz において，音圧を変化させたときの $A\beta$ の凝集反応を調査することにより最適な照射条件を探索した．超音波照射条件には，5 種類の音圧の異なる超音波を用いた．それらの代表的な音圧波形と FFT スペクトルを Fig.4.12 に示す．Fig.4.12 の波形の上に示した音圧値は 3 本のサンプル間での平均二次高調波音圧である．各音圧におけるサンプルと超音波を照射せず静置したサンプルの ThT 蛍光強度の経時変化曲線を Fig.4.13(a) に示す．図中のフィッティング曲線は，核生成-線維伸長の二段階理論モデルによるフィッティング曲線である．この曲線から各音圧における核生成 (k_n) と線維伸長 (k_g) の反応速度定数を算出した結

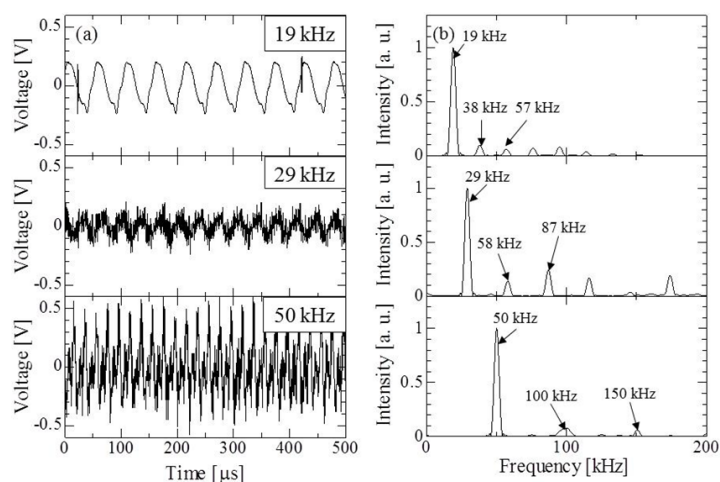


Fig. 4.9 (a) Representative acoustic waveforms observed in sample tube under ultrasonic irradiation with fundamental frequencies of 19, 29 and 50 kHz, and (b) their corresponding FFT spectra.

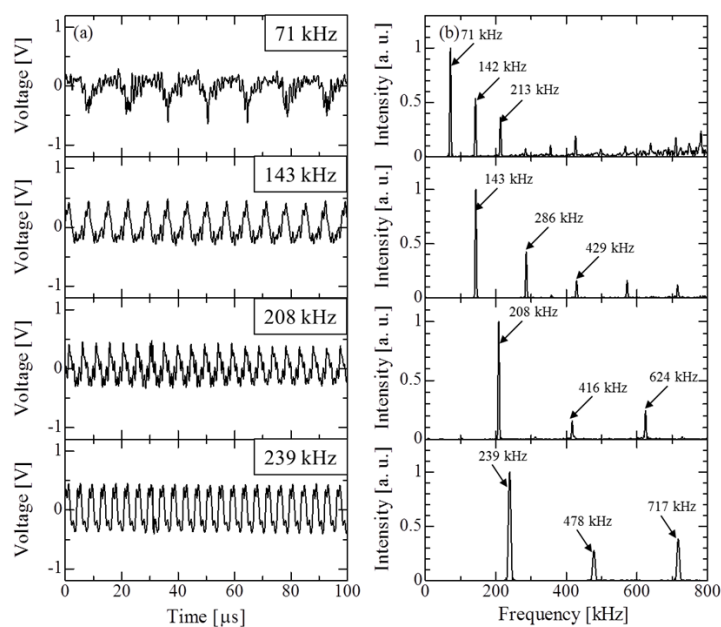


Fig. 4.10 (a) Representative acoustic waveforms observed in sample tube under ultrasonic irradiation with fundamental frequencies of 71, 143, 208, and 239 kHz, and (b) their corresponding FFT spectra.

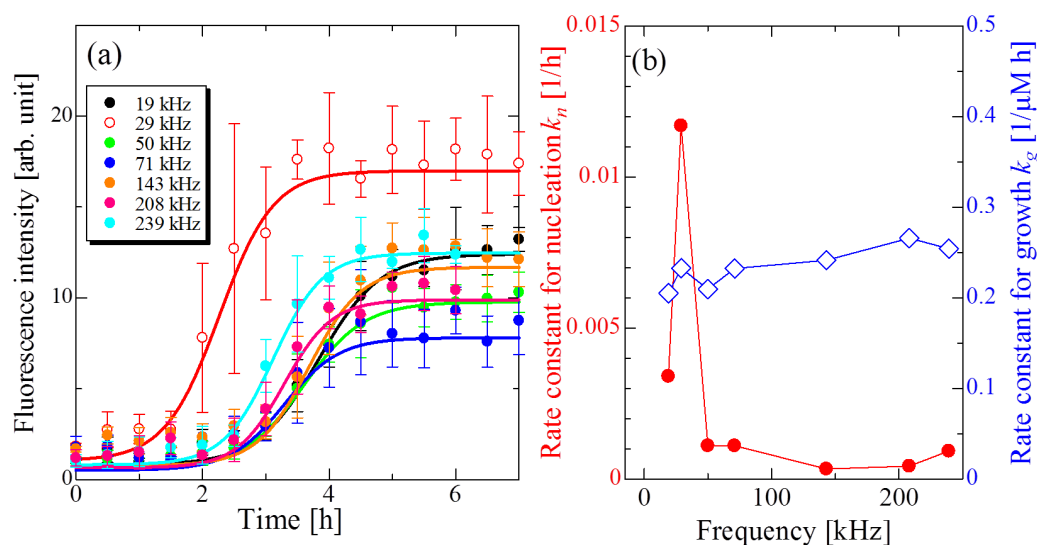


Fig. 4.11 (a) Time courses of the ThT fluorescence intensity caused by ultrasonic irradiation with seven various frequencies (19, 29, 50, 71, 143, 208, and 239 kHz). Plots are averaged fluorescence intensity of the five samples. Solid lines denote the fitted curves by the two-step model. (b) Frequency dependence of the rate constants for nucleation, k_n [1/h] and fibril elongation, k_g [1/ μ M·h].

果を Fig.4.13(b) に示す。

溶液の温度は凝集反応に大きな影響を与えるので、キャビテーションの影響を独立に調査するためには、溶液の温度が変わらない範囲の音圧で超音波照射実験を行う必要がある。他のグループが用いている超音波照射は、溶液の温度を 50 °C 以上上昇させるようなものであり、キャビテーションの貢献を独立に評価するのは困難である^[80]。本実験で用いた音圧域で最大 (75 kPa)・最小 (6 kPa) の超音波を照射されたサンプルチューブ内における超音波照射直後の溶液温度変化の計測結果を Fig. 4.13(c) に示す。最大音圧の超音波照射を行った際でも溶液の温度上昇は、0.2 °C 以下であり、凝集反応に劇的に影響を及ぼすような温度上昇ではないため、キャビテーションの影響を独立に調査することが可能である。

Fig. 4.13(b) より、二次高調波音圧が上昇に伴い核生成の反応速度定数が数桁上昇し、凝集反応がより加速されていることがわかる。一方、線維伸長の反応速度定数は、2 倍程度変化はしたものの、核生成の反応速度定数の変化に比べると微小な変化であった。核生成の反応速度定数が最大となる 53 kPa では、静置したサンプルの反応速度定数より ~1,000 倍も大きく、照射条件を最適化することにより、その核生成反応を劇的に加速することに成功した。53-75 kPa の範囲で核生成の反応速度定数が減少しているのは、音圧の上昇に伴い、超音波の分解効果が顕著になり、凝集加速よりも分解効果が強くなったからと考えられる。

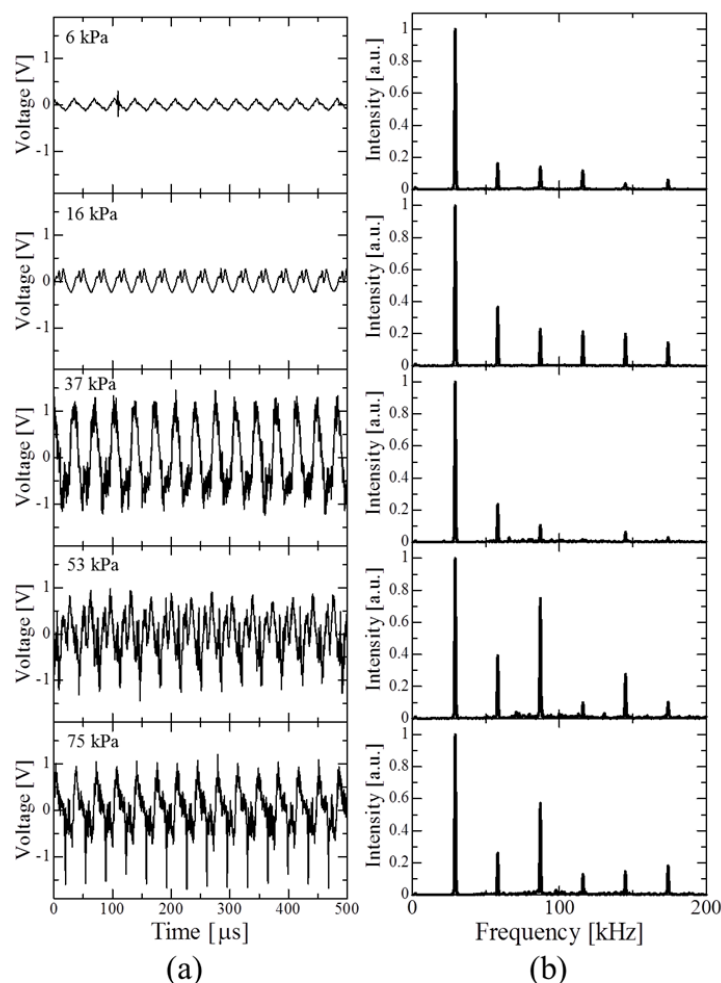


Fig. 4.12 (a) Representing waveforms and (b) their corresponding FFT spectra observed in experiments related to the acoustic-pressure dependence of $A\beta$ aggregation reaction with fundamental frequency of 29 kHz. The averaged second-harmonics pressure values are shown in (a).

4.4.6 界面が凝集反応に及ぼす影響

3.2 節で言及した界面の導入による表面変性 (因子 4) に関して, 凝集能の高い $A\beta$ を用いて検討する. Burdin らは, 20 kHz の超音波を蒸留水に照射し, レーザー計測により気泡の体積分率が $\sim 0.01\%$ であると報告した^[115]. この報告値に基づきキャビテーションの代わりに溶液中に占める気泡の体積分率と同じ体積分率の疎水性界面を $A\beta$ 溶液中に導入し, その凝集加速効果を超音波を照射した際と比較する. 疎水性界面として 3 種類のビーズを用いた. それらの直径は $1\ \mu\text{m}$ であり, 材質はシリカ製のものとポリスチレンで表面電荷が正のものと負のものの計 3 種類である. Fig.4.14(a) に凝集実験の結果を示す. 各サンプルに対するフィッティ

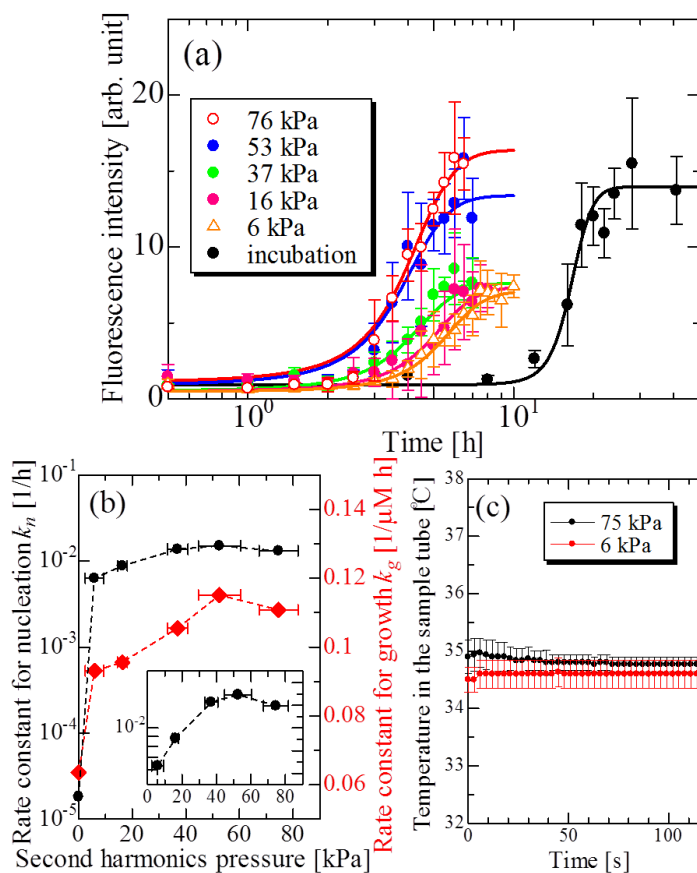


Fig. 4.13 (a) Time courses of the ThT fluorescence caused with the ultrasonic irradiation with five various pressures and the incubation procedure. Solid lines denote fitted curves by the two-step model. The concentration of $A\beta$ monomer solution was $10 \mu\text{M}$. (b) Relationship between the second-harmonics pressure of ultrasonic wave and the rate constants for nucleation (solid circles), k_n , and for growth (solid diamonds), k_g . (c) Temperature change in the sample tube measured just after 1-min ultrasonic irradiation with 75 and 6 kPa.

ング曲線より、核生成 (k_n) と線維伸長 (k_g) の反応速度定数を算出したものを Fig. 4.14(b) に示す。固液界面の導入により、ビーズの種類にかかわらず静置したサンプルと比較して核生成の反応速度定数は上昇したが、超音波照射条件下と比較するとその反応速度定数は一桁程度小さいものであった。ビーズの表面電荷に凝集反応が依存的でないことは、 $A\beta$ モノマーが静電的な相互作用ではなく、疎水性相互作用により界面に吸着され、局所的な濃度が上昇し凝集反応が加速されていることを示唆している。しかし、超音波照射ほどの凝集加速効果が得られなかったことは、キャビテーションの圧壊現象が凝集加速機構の根幹にあることを強く示唆している。

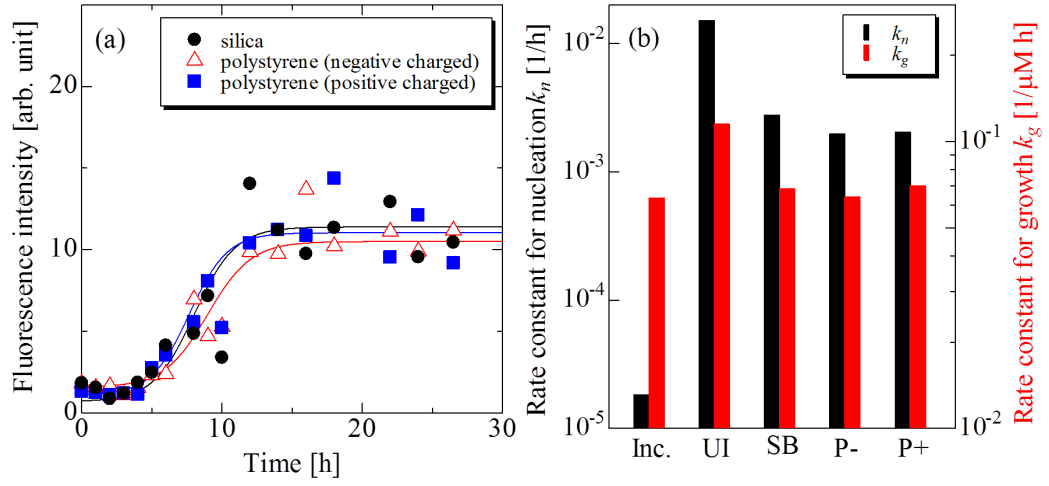


Fig. 4.14 (a) Evolution of ThT fluorescence intensity during incubation of $A\beta_{1-40}$ solutions involving silica beads, positively charged polystyrene beads, and negatively charged polystyrene beads. (b) Comparison of the reaction-rate constants among incubation (Inc.), optimized ultrasonic irradiation (UI), silica beads (SB), positively charged polystyrene beads (P+), and negatively charged polystyrene beads (P-).

第5章 凝集加速モデルの構築と理論計算

前章までで得られた知見をもとに、超音波照射によるアミロイド線維の凝集加速機構を説明する理論モデルを構築する。構築するモデルでは、キャビテーションの圧壊現象により引き起こされるタンパク質分子の”局所濃縮”と”局所加熱”の二重の効果に着目する。また、そのモデルに基づき核生成の反応速度定数の周波数・音圧依存性を理論的に計算し、実験結果を再現することを目指す。

5.1 キャビテーションに着目した凝集加速モデル

実験結果よりキャビテーションの圧壊現象がアミロイド線維形成加速機構に深く関連していることが示唆された。そこで、Fig. 5.1 のような凝集加速モデルを提案する。 $A\beta$ モノマーを含む溶液に超音波を照射すると超音波の負圧により溶液中に気泡が発生し、膨張する。気泡表面は気液界面であるために、疎水性の高い $A\beta$ モノマーを表面に吸着する^[116]。超音波の圧力が正圧に転じると、気泡は圧壊し、それに伴い、表面に吸着されたモノマーが圧壊の中心に濃縮され、局所的な濃度が上昇する。また、それと同時に気泡内気体（空気）の温度上昇が上昇し、濃縮されたモノマーが加熱される。つまりこの局所濃縮と局所加熱の二重の効果により核生成反応が促進されるというモデルである。後に議論するが、気泡圧壊に伴う気泡内気体の温度上昇は、溶液全体の温度にほとんど影響を及ぼさない。しかし、濃縮されたモノマーを局所的に加熱することにより、効果的に核生成反応を誘起し、巨視的な反応速度定数を上昇させる。

次節からは、Fig.5.1 のモデルに従い反応速度定数の周波数・音圧依存性を理論的に計算する。このモデルの根幹を担うのは、気泡の圧壊現象である。気泡の圧壊現象は、非常に短い時間スケールで起こるため、気泡半径運動の計算には断熱過程が用いられることが多い^[117]。しかし、ここで提案するモデルでは、気泡内から外部に熱が流出することによる溶液の局所的な温度上昇が $A\beta$ を加熱し、それにより核生成反応が加速されるので、気泡から外部への熱の流出を考慮する必要がある。つまり、圧壊後から熱伝導・熱伝達の効果を考慮する。本章で行う理論計算では、まず断熱過程を用いて気泡圧壊までの半径運動とそれに伴う気泡内気体の温度上昇を計算する。気泡周囲に生み出される温度場は、気泡が圧壊した瞬間を初期条件として熱が流出していくモデルにより計算した。これまでに、気泡外縁に温度境界層を導入して気泡と周囲溶液の熱交換を考慮した気泡運動の計算モデル^[118,119]も提案されている。気泡圧壊時に熱が周囲に散逸していくことにより圧壊イベント後の半径挙動や温度変化は断熱過程に基づき計算した結果とは異なるものの、気泡圧壊時のパラメータに大きな差異はない (Fig.5.2)。また、これらのモデルは境界層厚さ、熱伝達率、熱伝導率等の多くの不確定パラメータを含む。特に、気泡内部温度が 10000 K から室温付近まで急激に変化するが、ここまで広範囲の温度依存性をこれらのパラメータに対して予測することは極めて困難である。一方、本研究では、気泡圧壊時の気泡内気体の熱が同じ領域の水にすべて移行したと仮定する。この過程において不

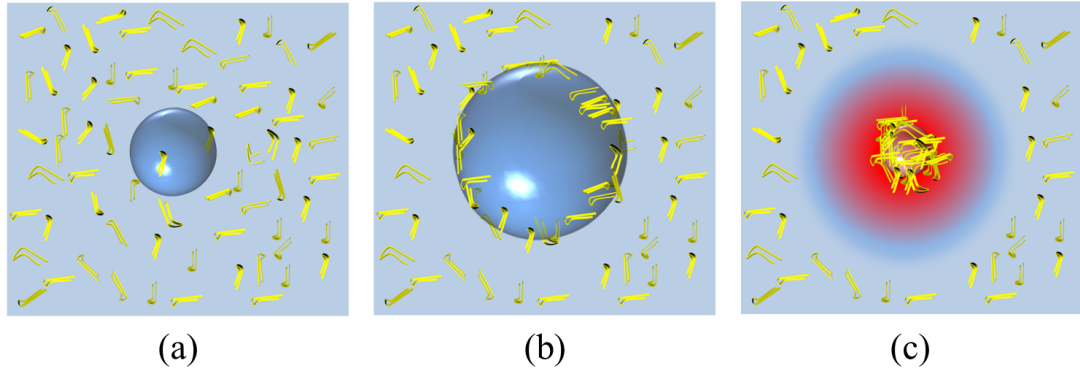


Fig. 5.1 Aggregation acceleration model of the ultrasonically induced nucleation reaction focused on the transient bubble. (a) Bubble is generated in the solution by the negative pressure of ultrasound. (b) Bubble grows in the negative-pressure phase, during which A β monomers (yellow hairpin-shaped bars) are absorbed on bubble surface by hydrophobic interaction. (c) Bubble collapses at the positive-pressure phase, leading to local condensation of A β monomers and temperature increase in and near the bubble.

確定パラメータは少なく、同時に、気泡半径とその周囲温度場のエッセンスを失わず、周波数や音圧依存性の傾向を評価するには十分有効であると判断し、その手法により計算を行った。具体的な計算のフローチャートを Fig.5.3 に示す。

5.2 気泡の半径運動

前節で提案した凝集加速モデルの根幹部分を担うのが、気泡の半径運動である。はじめに、超音波の周波数・駆動音圧を変化させたときに気泡の呼吸的振動のふるまいがどのように変化するのかを計算する。気泡の半径運動の基礎方程式は、圧縮性流体に関する Navier-Stokes 方程式から導かれる Rayleigh-Plesset 方程式^[120,121]であり、以下の形で書かれる。

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \left(p_g(t) - P_0 - P(t) - 4\eta\frac{\dot{R}}{R} - \frac{2\sigma}{R} \right) \quad (5.1)$$

ここで、 R , \dot{R} , \ddot{R} は、それぞれ、気泡の半径、気泡壁の速度、加速度であり、 ρ , η , σ は、溶液の密度、粘性係数、表面張力係数である。 P_0 は気泡から十分離れたところでの溶液の圧力である。 $P(t)$, $p_g(t)$ は、気泡の運動を駆動する超音波圧力と気泡内気体の圧力であり、気泡内気体が断熱過程により状態変化を起こすと仮定すると、それらは以下の式により書くことができる^[120]。

$$P(t) = P_a \sin \left[\omega \left(t + \frac{R(t)}{c_\infty} \right) \right] \quad (5.2)$$

$$p_g(t) = \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} \right) \left(\frac{R_0}{R(t)} \right)^{3\gamma} \quad (5.3)$$

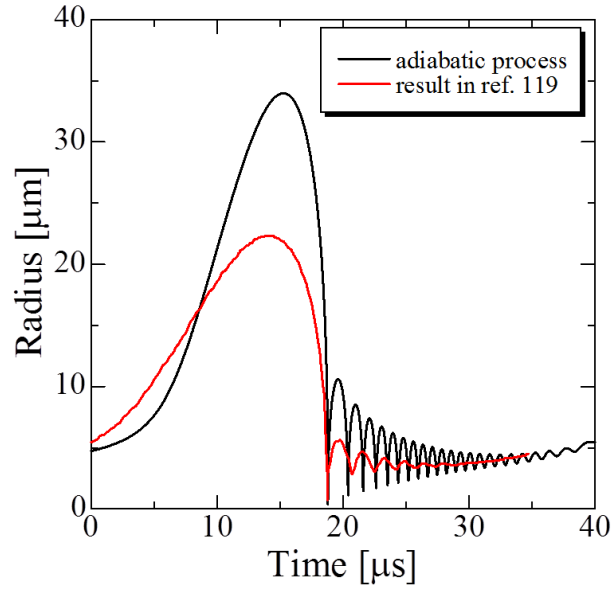


Fig. 5.2 Bubble-radius motions calculated under the adiabatic process(black) and theoretical model in reference 119(red).

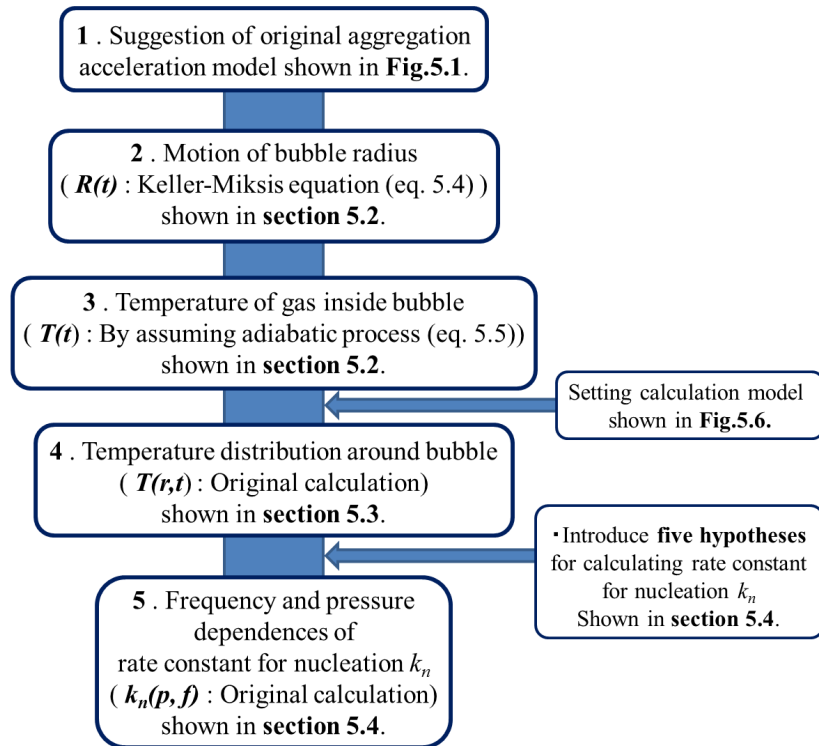


Fig. 5.3 Flowchart of the theoretical calculation of frequency and pressure dependences of rate constant for nucleation.

ここで、 P_a , ω は超音波の駆動音圧と角振動数、 c_∞ は、溶液中の音速、 R_0 は気泡の平衡半径である。

本研究では、気泡の半径運動を計算する際に、式 (5.2) の Rayleigh-Plesset 方程式を拡張した、Keller-Miksis 方程式を用いる。Rayleigh-Plesset 方程式は、液体中に存在する平衡半径 R_0 の空孔が超音波による周期的な圧力変動により一方的に駆動された条件下での運動方程式である。これを拡張した Keller-Miksis 方程式^[117]は、超音波の圧力変動より駆動された空孔の呼吸的振動が音源となり液中に音波を発生し、気泡の半径振動が減衰する効果を含んでいる。Keller-Miksis 方程式は、以下の形で書くことができる。

$$\left(1 - \frac{\dot{R}}{c_\infty}\right) \rho R \ddot{R} + \frac{3}{2} \left(1 - \frac{\dot{R}}{3c_\infty}\right) \rho \dot{R}^2 = \left(1 + \frac{\dot{R}}{c_\infty}\right) (p_g(t) - P_0 - P(t)) + \frac{R}{c} \dot{p}_g - 4\eta \frac{\dot{R}}{R} - \frac{2\sigma}{R} \quad (5.4)$$

この方程式を用いて、平衡半径を初期値とし、気泡圧壊までの気泡半径の変化を計算する。そして、気泡半径が最大に達した時点から圧壊するまでを断熱変化とみなして気泡内の温度変化を算出する。本研究における圧壊とは、 $dR/dt = 0$ となる最小半径とした。Fig. 5.1 に示す凝集加速モデルでは、気泡圧壊時の気泡内気体の温度が重要となる。気泡の圧壊の際の気泡壁の速度は非常に速く、気泡内部の気体は周囲の液体と熱交換をする間もなく急激に圧縮されると考え、気泡内気体の状態変化は断熱過程を仮定し気泡内気体の温度を計算した。気泡内気体の温度 $T(t)$ は、以下のように書くことができる。

$$T(t) = T_0 \cdot \left(\frac{R_0}{R(t)}\right)^{3(\gamma-1)} \quad (5.5)$$

ここで、 T_0 は平衡状態の時の気泡内気体の温度である。Fig. 5.4 には、これらの式を用いて周波数 30 kHz の超音波で駆動音圧を 1, 1.25, 1.5 atm と変化させた際の気泡の半径運動 (Fig. 5.4(a)) とそれに伴う気泡内気体の温度変化 (Fig. 5.4(b)) の計算結果を示す。Fig. 5.5 には、超音波の駆動音圧を 1.25 atm とし、周波数を 20, 50, 200 kHz と変化させたときの気泡の半径運動 (Fig. 5.5(a)) と気泡内気体の温度変化 (Fig. 5.5(b)) を示す。そして、Fig. 5.6 には気泡の最大半径と気泡内気体の最大到達温度の周波数・音圧依存性を示す。

低周波数の超音波音場は、周期が長く、気泡が成長するための時間が十分ある。大きく成長した気泡は、その後一気に圧壊し、その半径は最小に、気泡内気体の温度は最大に到達する。周波数の高い音場下では、気泡が成長する時間が短く、最大半径も小さいため、圧壊時の最大温度は、低周波の場合と比較して低くなる。駆動音圧が高い音場下では、気泡の半径運動を駆動する圧力が高いために、気泡がより膨張し、そこから急激な圧壊過程を経て、圧壊時の気泡内気体の温度はより高くなる。

5.3 気泡圧壊時の周囲温度場

本研究のモデルでは、気泡が圧壊した後、気泡内の高温場が周囲の溶液に伝達するとし、気泡圧壊時に圧壊中心周囲に生み出される温度場を計算する。気泡の圧壊現象は、超高温場を作

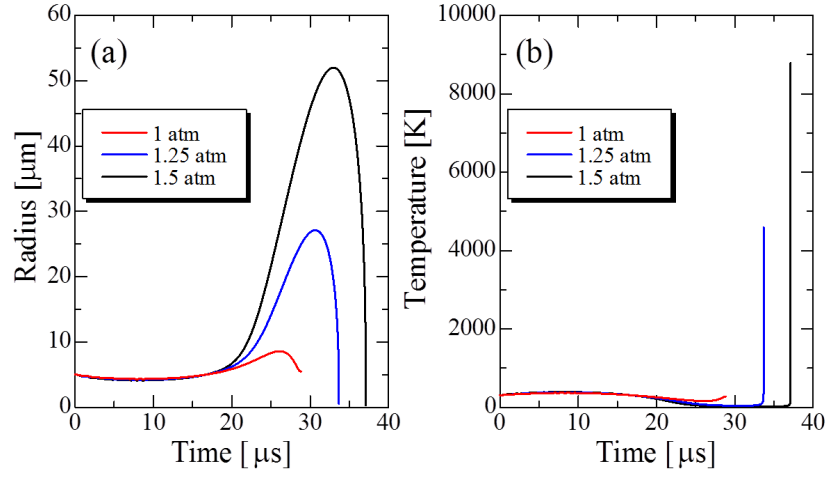


Fig. 5.4 Change of (a) bubble radius and (b) temperature of gas inside bubble under ultrasonic wave with acoustic pressure of 1.25 atm under various frequencies (20, 50, and 200 kHz).

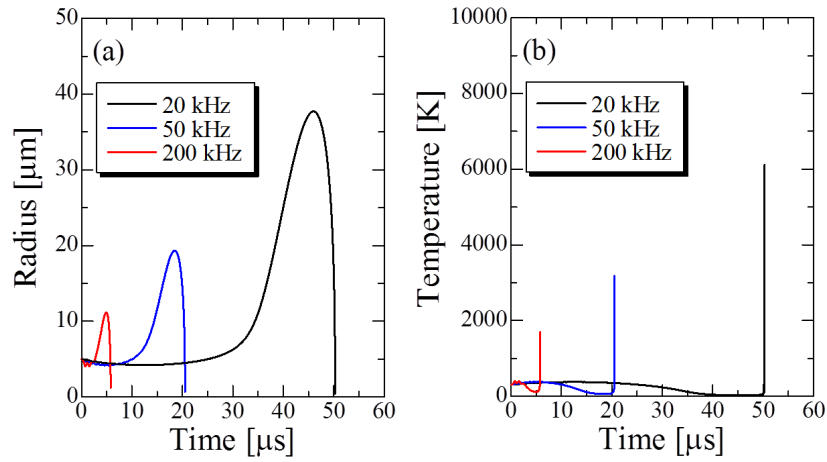


Fig. 5.5 Change of (a) bubble radius and (b) temperature of gas inside bubble under ultrasonic wave with frequency of 30 kHz under various pressures (1, 1.25, and 1.5 atm).

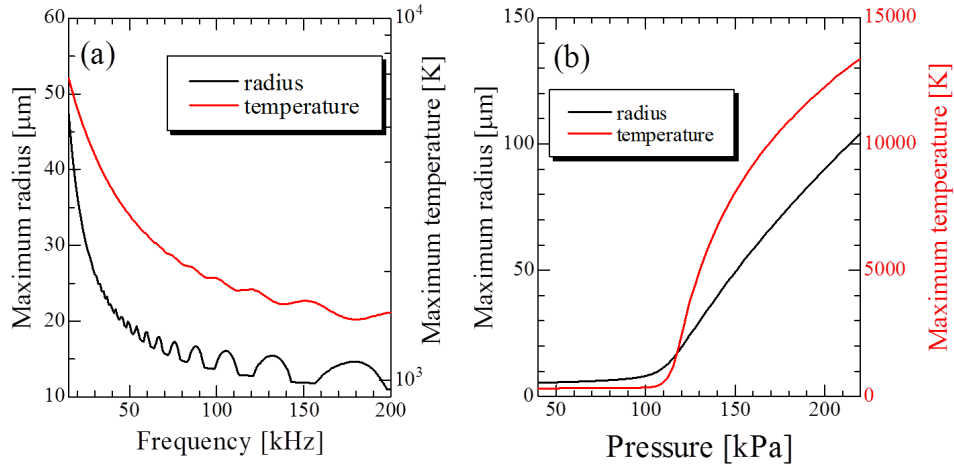


Fig. 5.6 (a)Frequency and (b)pressure dependences of maximum radius and temperature in the bubble movement.

り出す．Fig. 5.7(a) は，気泡が膨張した状態から圧壊し，気泡内気体が最高温度に達する付近の気泡半径と気泡内温度の変化である．気泡圧壊時に生成される超高温状態は， ~ 50 ns 程度であり，極短時間の加熱である．気泡圧壊に伴う局所的な加熱が周囲に形成する温度場を計算するために，Fig. 5.7(b) のようなモデルを考える．気泡圧壊時に気泡の半径は最小 (R_{min})，温度は最大 (T_{max}) となるので半径 R_B の球状領域の中心に存在する半径 R_{min} の熱源から周囲に熱が拡散する過程を球対称熱伝導方程式を解くことにより計算した．実現現象において熱源は気体であるが，気泡内から液体中に熱が拡散する際には熱の散逸を伴い，その量を評価するのは困難であるため，熱源は周囲液体と同じ水とし，ガスの熱量が散逸することなく同じ体積の水に移動したと考え，その温度上昇 (ΔT_w) は以下の式により決定した．

$$\Delta T_w = \frac{m_g C_g}{m_w C_w} \cdot \Delta T_g \quad (5.6)$$

ここで，添え字 g, w はそれぞれ水と空気 (気泡内気体) を意味し， m, C は，それらの質量と比熱である．熱源以外の領域の初期温度は， T_∞ とし，領域の境界の温度は常に一定 ($T(R_B, t) = T_\infty$) とした．これらの条件のもとに時刻 t ，半径位置 r における温度 $T(r, t)$ を求める．実際には，気液境界の熱境界層を介する熱伝達および熱伝導を考慮する必要があるが，熱伝達率等の不確定パラメータおよびそれらの温度依存性を決めることが極めて困難であるため，本研究においては，不確定パラメータを含まないモデルを採用した．このモデル化により定量性は確保することができないが，定性的に周波数および音圧依存性を再現することは可能であると考えられる．

この系における支配方程式は，球対称の熱拡散方程式であり，水の熱拡散率 α を用いて以

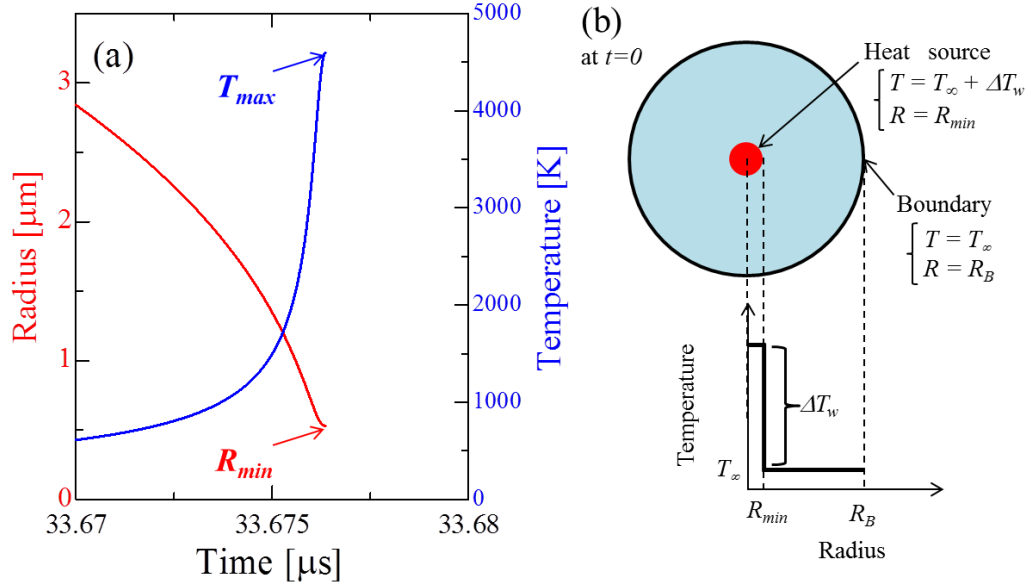


Fig. 5.7 (a)Temperature and radius change near the collapse event. (b)Calculation model of temperature distribution around the bubble. This figure denotes initial temperature distribution at $t=0$.

下のように記述される．

$$\frac{\partial T(r, t)}{\partial t} - \alpha \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial T(r, t)}{\partial r} \right) = 0 \quad (5.7)$$

また，初期条件と境界条件を書き下すと以下ようになる．

$$T(r, 0) = T_{\infty} + \Delta T_w \quad (r \leq R_{min}) \quad (5.8)$$

$$T(r, 0) = T_{\infty} \quad (R_{min} < r < R_B) \quad (5.9)$$

$$T(0, t) \neq \infty \quad (5.10)$$

$$T(R_B, t) = T_{\infty} \quad (5.11)$$

$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial T}{\partial r} \right) = \frac{1}{r} \frac{\partial^2 (rT)}{\partial r^2}$ と変形できるので，式 (5.7) は， $\frac{\partial (rT)}{\partial t} - \alpha \frac{\partial^2 (rT)}{\partial r^2} = 0$ と変形することができる．条件式の簡単化のために， $T'(r, t) = T(r, t) - T_{\infty}$ とし， $w = rT'$ と変数変換すると，式 (5.7) の熱伝導方程式と式 (5.8)～(5.11) の条件式は，

$$\frac{\partial w}{\partial t} - \alpha \frac{\partial^2 w}{\partial r^2} = 0 \quad (5.12)$$

$$T'(r, 0) = \Delta T_w \quad (r \leq R_{min}) \quad (5.13)$$

$$T'(r, 0) = 0 \quad (R_{min} < r < R_B) \quad (5.14)$$

$$T'(0, t) \neq \infty \quad (5.15)$$

$$T'(R_B, t) = 0 \quad (5.16)$$

と、書き直すことができる．式 (5.12) の一般解は、変数分離法を用いて求める事ができ、その一般解は、定数 A, B, λ を用いると、

$$w(r, t) = (A \sin \lambda r + B \cos \lambda r) \cdot e^{-\alpha \lambda^2 t} \quad (5.17)$$

と書くことが出来る．よって、 T' は、

$$T'(r, t) = \left(A \frac{\sin \lambda r}{r} + B \frac{\cos \lambda r}{r} \right) \cdot e^{-\alpha \lambda^2 t} \quad (5.18)$$

と書くことができる．条件式 (5.15) より、 $B = 0$ である ($\frac{\cos \lambda r}{r} \rightarrow \infty$ ($r \rightarrow 0$)). これより、 $T'(r, t) = A \frac{\sin \lambda r}{r} \cdot \exp(-\alpha \lambda^2 t)$ という形の関数が導かれる．この解では条件式を満たす A, λ は存在しないので、この形の解を重ね合わせて条件を満たす解を求める．つまり、

$$T'(r, t) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \frac{\sin \lambda_n r}{r} \cdot e^{-\alpha \lambda_n^2 t} \quad (5.19)$$

の形で条件式を満たすような A_n を求める．条件式 (5.16) より、 $\sin \lambda_n R_B = 0$ である．これより、 $\lambda_n = \frac{n\pi}{R_B}$ ($n = 1, 2, 3, \dots$) である．これにより、式 (5.19) を書き換えると、

$$T'(r, t) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \frac{\sin \left(n\pi \frac{r}{R_B} \right)}{r} \cdot e^{-\alpha \left(\frac{n\pi}{R_B} \right)^2 t} \quad (5.20)$$

と書くことが出来る．ここで、条件式 (5.13) と (5.14) を同時に満たすような関数 $p(r)$ を導入する．

$$p(r) = \begin{cases} \Delta T_w & (0 \leq r \leq R_{min}) \\ 0 & (R_{min} < r \leq R_B) \end{cases} \quad (5.21)$$

この関数を用いて、式 (5.20) に $t = 0$ を代入した後に両辺に $\sin \left(m\pi \frac{r}{R_B} \right)$ をかけて $r : 0 \rightarrow R$ で積分する．

$$\sum_{n=1}^{\infty} A_n \int_0^R \sin \left(n\pi \frac{r}{R_B} \right) \sin \left(m\pi \frac{r}{R_B} \right) dr = \int_0^R r p(r) \sin \left(m\pi \frac{r}{R_B} \right) dr \quad (5.22)$$

この式の両辺を計算し、整理すると、

$$A_n = \frac{2\Delta T_w}{n\pi} \left[\frac{R_B}{n\pi} \sin \left(n\pi \frac{R_{min}}{R_B} \right) - R_{min} \cos \left(n\pi \frac{R_{min}}{R_B} \right) \right] \quad (5.23)$$

という式が導かれる．よってこの熱拡散モデルの温度分布 $T(r, t)$ は、

$$T(r, t) = T_{\infty} + \frac{2\Delta T_w}{r} \sum_{n=1}^{\infty} F_n \sin \left(n\pi \frac{r}{R_B} \right) e^{-\alpha \left(\frac{n\pi}{R_B} \right)^2 t} \quad (5.24)$$

$$F_n = \frac{1}{n\pi} \left[\frac{R_B}{n\pi} \sin \left(n\pi \frac{R_{min}}{R_B} \right) - R_{min} \cos \left(n\pi \frac{R_{min}}{R_B} \right) \right] \quad (5.25)$$

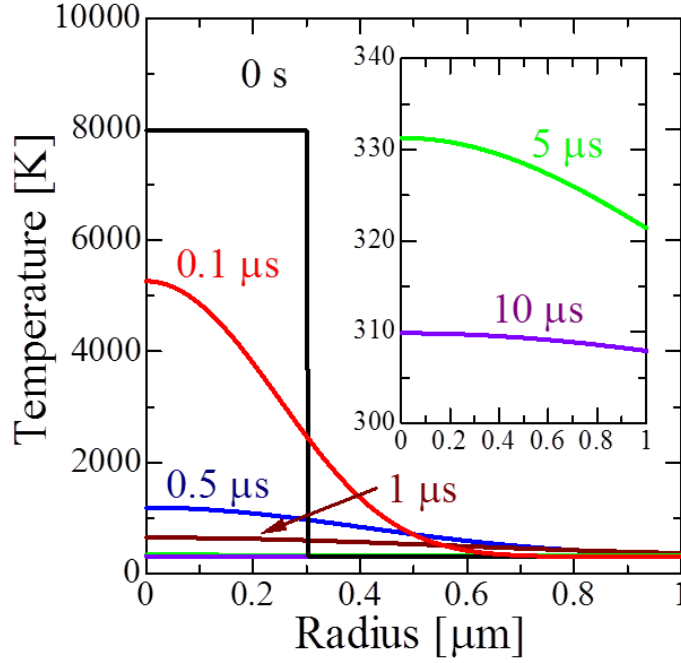


Fig. 5.8 Evolution of temperature distribution around the bubble collapse. Used parameters are shown as following: $P_a=150$ kPa, $f=30$ kHz, $T_\infty=310.15$ K, $R_B=1$ mm, and $\alpha=1.4\times 10^{-7}$ m²/s. Horizontal axis means the distance from the center.

と求まった．例えば超音波の駆動音圧 $P_A=1.5$ atm, 周波数 30 kHz の時の熱拡散の様子を計算すると, Fig.5.8 のような計算結果が得られた．計算条件は, $T_{max}=4673.6$ K, $T_\infty=298$ K, $R_B=1$ mm, $\alpha=1.4\times 10^{-7}$ m²/s であり, n は 1~200000 次まで重ね合わせた．この計算結果から, 気泡の温度上昇が影響を及ぼす領域は高々 ~ 1 μ m 程度であり, この温度場は気泡の表面に引き寄せられたモノマーのみに影響を及ぼすことがわかる．

気泡の圧壊に伴うバルク溶液の平均温度上昇 ΔT_{ave} を以下の式により計算する．

$$\Delta T_{ave} = \frac{\int_0^{R_{cav}} \int_0^{t_{cav}} T(r, t) dt dr}{R_{cav} \times t_{cav}} \quad (5.26)$$

ここで, R_{cav} は, 気泡が溶液中に均一に分散しているときの気泡間の距離の半分, つまり, 気泡が一つ存在する球状領域の半径である． t_{cav} は, 気泡 (駆動超音波) の周期である．気泡の体積分率が 10^{-4} ^[115] とすると, 500 μ L ($=5\times 10^{-7}$ m³) の溶液中に占める気泡の体積は, 5×10^{-11} m³ である．例えば, 音圧 150 kPa, 周波数 30 kHz の超音波により駆動される平衡半径 $R_0=5$ μ m の気泡の最大半径は, $R_{max}=53.29$ μ m であり, 最大半径時の気泡の体積 $V_{cav1} = \frac{4\pi R_{max}^3}{3} = 6.34 \times 10^{-13}$ m³ である．したがって, 溶液中に存在する気泡の数 n_{cav} は, $n_{cav} = \frac{V_{cav}}{V_{cav1}} \sim 79$ となる．これより, 気泡が一つ存在する領域の半径 $R_{cav} = 1.1$ mm が求められる．これらの値を用いて式 (5.26) に基づき ΔT_{ave} を数値的に計算すると, その値は,

0.001 K 以下となり，気泡の圧壊現象は，溶液全体の温度には影響を与えない，極めて局所的な加熱効果を示すことがわかる．実際，Fig.4.13(c) に示すように，超音波照射による温度上昇は無視できる程度である．

5.4 核生成反応の周波数・音圧依存性

前節で算出した温度場とアレニウスの式を用いて，核生成の反応速度定数の周波数・音圧依存性を計算する．計算に際して，以下のような仮定を導入する．

- 気泡の表面に引き付けられるモノマーの数は，気泡が最大に膨張した領域に存在していたモノマー数と等しい．
- 気泡が最大に膨張した瞬間の気泡の体積分率 ϕ は，文献値より $\phi = 10^{-4}$ ^[115] とし，この値は，周波数や音圧に依存しないこととする．
- 一度気泡表面に吸着されたモノマーは，必ず気泡圧壊時の気泡壁の運動に追従して気泡の最小半径 R_{min} の位置で加熱されることとする．つまり，慣性力により，気泡表面からモノマーが引きはがされることはないとする．
- 気泡の圧壊に伴いモノマーが熱分解される可能性があるような超高温場にさらされるが，気泡の圧壊に伴う温度上昇は ~ 50 ns 程度と非常に短い時間であるので熱分解は起きないものとする．
- タンパク質の凝集反応では，高温条件化において温度変化に伴いタンパク質分子自体の構造や安定性が変化することにより，その反応が Arrhenius 式に従わない (non-Boltzmann 的なふるまいをする^[122]) 場合があるが，そのようなことは起きず，核生成の反応速度定数は Arrhenius の式に従うものとする．

Arrhenius 式の指数関数部分 $\exp\left(-\frac{E_a}{k_B T}\right)$ は，Boltzmann 因子と呼ばれ，全分子数 N_{total} 中に占める核生成を起こした分子数 N_{nuc} の割合に等しい．

$$\frac{N_{nuc}}{N_{total}} = \exp\left(-\frac{E_a}{k_B T}\right) \quad (5.27)$$

つまり，ある温度 T の条件化において核生成が起きる確率を意味している．Fig. 5.1 で提案する凝集加速モデルにおいて，モノマーには，気泡から影響を受けるものとそうでないものが存在し，それらの置かれる温度環境も大きく異なる．そこですべてのモノマーを気泡による影響の有無により二種類に分割し，それぞれの核生成の反応速度定数を平均化したものをその周波数・音圧における核生成の反応速度定数とする．ここで，超音波により影響を受ける分子の全体に占める割合は，仮定より 10^{-4} ($=0.01\%$) とする．このような考え方のもとに Arrhenius 式を拡張し，ある周波数 f ，音圧 p の超音波音場下における核生成の反応速度定数 $k_n(f, p)$ を

以下のように定義する．

$$k_n(p) \equiv A \left(\phi \times \frac{\int_0^{t_{cav}} \exp\left(-\frac{E_a}{k_B T(R_{min}, t)}\right) dt}{t_{cav}} + (1 - \phi) \times \exp\left(-\frac{E_a}{k_B T_\infty}\right) \right) \quad (5.28)$$

ここで第一項・第二項は、それぞれ、気泡により影響を受けるモノマーの核生成の確率と気泡の影響を受けずに自発的に核生成を起こすモノマーの核生成の確率を示している．この式で、超音波の照射条件 (f, p) の影響を受けるのは、第一項の指数関数中の温度分布 $T(R_{min}, t)$ である．なお、計算を行うときに核生成の活性化エネルギー E_a と前因子 A は、4.4.2 節でのアレニウスプロットより求めた値 ($E_a=61.91 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $A=1.47\times 10^3 \text{ s}^{-1}$) を用いた．この式により算出した $A\beta$ の核生成の反応速度定数の周波数・音圧依存性の計算結果を実験から求めた値と合わせて Fig. 5.9 に示す．なお、周波数依存性の計算においては、単位時間を設定し、その時間内で起きる圧壊イベントの数が周波数が高くなるにつれ増加する効果を取り入れた．

理論計算により得られた核生成の反応速度定数は、30 kHz 付近に存在する最適周波数や音圧の上昇に伴い、反応速度定数が数桁上昇するといった4章で得られた実験結果と同じ傾向を示した．このことは、Fig. 5.1 で提案した凝集加速モデルがこの現象の機構を説明するために妥当であることを示唆している．しかし、Fig. 5.9 の縦軸を比較するとわかるように、今回行った理論計算は定量性に欠ける．これは、この計算を行うにあたっていくつかの不確定パラメータを仮定によって決定したからである．この不確定パラメータとは、気泡の平衡半径や気泡の体積分率などである．また、気泡周囲に生み出される温度場の計算においては、熱源の気泡から周囲の溶液に熱が拡散する際の熱の損失がどの程度なのか知ることが困難なため、熱源も周囲と同じ水としている．また、音圧依存性の結果を比較する際の横軸は、計算結果においては超音波の駆動音圧であるが、実験で計測可能な音場は、発振された超音波が伝播する間に波形が歪むことなどの非線形効果による高調波成分や気泡自身の振動により発生したモードを含んでいるために、比較することは非常に困難である．しかし、これらの不確定パラメータを変化させたとしても核生成の反応速度定数の計算結果は絶対値が変化するのみで、そのエッセンスを失うことはないと考えられる．

本研究で提唱するモデルは、Goto らの提唱する過飽和モデル^[30]とも矛盾しない．タンパク質の溶解度は温度上昇に伴い減少する．気泡は局所的な濃度上昇と温度上昇を引き起こすが、これは局所的な過飽和度を上昇させると理解することもできる．したがって溶液全体としては溶解度以下のタンパク質溶液であっても、局所的に過飽和状態となり (Fig.2.5 の領域3)、核の析出を誘起していると考えられる．溶液の局所的な過飽和度は、気泡の最大半径 (濃縮時の濃度) と気泡圧壊時の温度と相関があると考えられる．

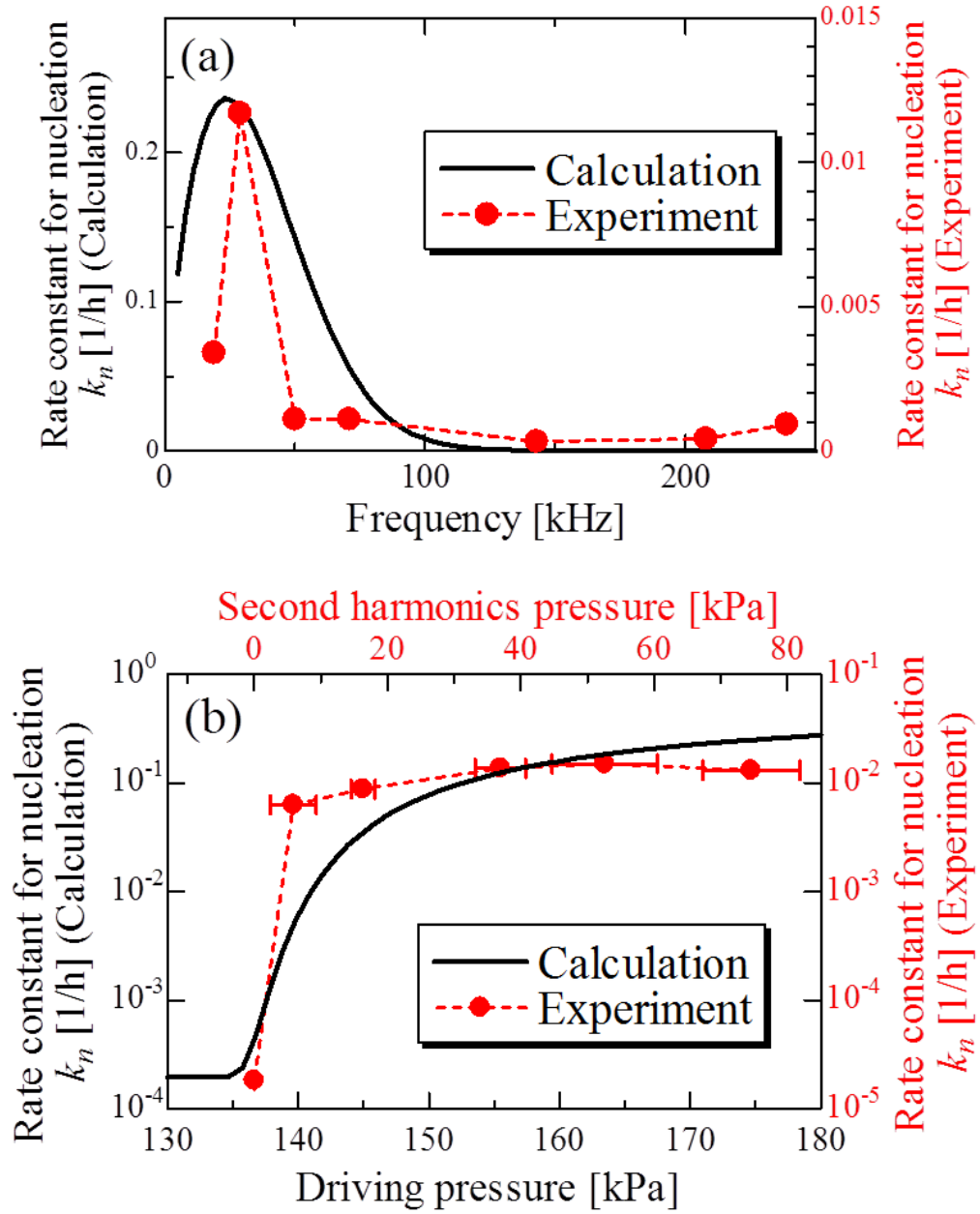


Fig. 5.9 Calculation results of frequency and pressure dependence of k_n . Comparisons between measured (red circles) and calculated (solid lines) (a) frequency and (b) pressure dependences of k_n . For the calculation of the frequency dependence of k_n , the driving pressure and equilibrium radius were set to $P_a = 170$ kPa and $R_0 = 2.0$ μm , respectively. For the calculation of the pressure dependence of k_n , the frequency of ultrasonic wave and equilibrium radius were set to be $f = 30$ kHz and $R_0 = 2.0$ μm , respectively.

第 6 章 超音波を用いた 2 種類の A β オリゴマーの研究

これまで論じてきた通り，超音波照射は，キャビテーションを生成することにより，アミロイド線維の凝集核生成反応を劇的に加速し，その過程において中間体を生成することはなく，モノマーをすべて線維化させる能力を有する．本章では，この能力に着目し，これまで議論することが困難であった A β オリゴマーの凝集反応における位置づけを調査する．

6.1 オリゴマー研究の現状

A β が形成する凝集体は多様性を示すことが知られている^[123]．これまで A β のアミロイド線維がアルツハイマー病の毒性物質であると考えられていたが，近年，不定形凝集体であるオリゴマーこそが真に有毒な凝集体であるという研究報告^[73,74] も多く存在し，議論のさなかである．これまでオリゴマーは，線維形成反応の中間体の状態であるタンパク質分子が数個～数十個集合した小さな凝集体を指す言葉であった．しかし，オリゴマーがアルツハイマー病の毒性物質候補として注目されるようになって以来，様々な性質を持つオリゴマーが存在することが報告されている^[124]．A β の形成する多様なオリゴマーの性質を把握し，凝集反応における役割や生化学的性質を理解することはアルツハイマー病の解決のために重要な知見になりうるだけでなく，タンパク質凝集の研究分野においても興味深い事柄である．

注目すべきことに β シート構造を有するオリゴマーが毒性を示すという報告がなされた^[78,125]．このオリゴマーは一部アミロイド線維と類似した性質を示すため，線維様オリゴマー (fibrillar oligomer : FO) と名付けられた^[125]．FO は， β シート構造を有し，ThT 蛍光も発するが，線維様の形態を示さず，線維の大きな特徴であるシーディング反応を起こさない^[126]．そして，このオリゴマーはオリゴマー特異的抗体 A11 ではなく，線維特異的抗体 OC により認識されることが報告されている^[127]．これに対し，これまで俗にオリゴマーと呼ばれてきたものは線維中間体オリゴマー (prefibrillar oligomer : PFO) と呼ばれ，区別されている^[127]．PFO は不定形であり構造も有さないため，ThT 蛍光を発さない．また，それらはオリゴマー特異的抗体 A11 によって認識される^[128]．しかし，これらのオリゴマーの凝集反応における役割は詳細に調査されたことはなく，明らかにされていない．一部のグループは，中間体でなく線維とは独立なデッドエンドとして存在するオリゴマーもあることを報告しており^[79,80]，これらは慎重に議論されるべき事柄である．そこで，本章では，A β_{1-40} が形成する β シート構造を有するオリゴマーとそうでないオリゴマーの凝集反応における位置づけを 4 章で発見した最適超音波照射 (optimized ultrasonic irradiation: OUI) により調査した．OUI はその強力な線維化能力によりモノマー溶液を中間体を経ることなく線維化させる^[129]．本章では，この特異な線維化能力により，これまで議論することが困難であったオリゴマーが中間体か線維とは独立なデッドエンドであるのかを調査する．

6.2 攪拌処理により作成されるA β 凝集体

本研究においては、高速攪拌 (high speed stirring: HSS) アジテーションにより β シート構造を有するオリゴマーを作製する。Fig.6.1(a)に、10 μ MのA β_{1-40} 溶液に対し800 rpmのHSSアジテーション、OUIアジテーション、室温放置をした時のThT蛍光強度の経時変化曲線を示す。放置したサンプルでは、10時間程度のラグタイムを経たのちに線維形成反応が起きている。超音波を照射したサンプルでは、キャビテーションの核生成促進効果によりラグタイムが3時間程度に短縮され、線維形成が起きている。これらのThT蛍光強度曲線はシグモイド曲線であり、アミロイド線維が形成されるとき典型的なものである^[20]。一方、攪拌処理を加えた時のThT蛍光強度は、ラグタイムがなく、実験開始と同時にその蛍光強度が上昇し始め、飽和した値は超音波や放置によってできた凝集体のそれよりも低いものとなっている。これは、攪拌により形成される凝集体が核生成反応を伴わずに形成されていることを意味している。

そこで、どのような凝集体が形成されているのかをTEM観察により比較した。その結果をFig.6.1(b), (c)に示す。Fig.6.1(b)は超音波により作製した凝集体で、アミロイド線維である。Fig.6.1(c)に示すのは、攪拌処理により作製した凝集体である。この凝集体はThT蛍光を発するにもかかわらず、線維のような組織は観察されなかった。次に、これらの二次構造を調査するために円偏光二色性 (circular dichroism: CD) スペクトル測定^[110]を行った。その結果をFig. 6.2(a)に示す。A β のモノマーは本来、規則性を持たないランダムコイル構造を有している。Fig. 6.2(a)中の破線は、実験前のモノマーのスペクトルでランダムコイル構造のスペクトルである。2章で述べた通り、線維を形成するモノマーの二次構造は β ストランド構造である。実際に超音波照射により作製したアミロイド線維のCDスペクトルは、220 nm付近に負のピークを有する典型的な β シート構造のスペクトルであった^[110]。

一方、攪拌により作製した凝集体のスペクトルは、225 nm付近に負のピークを有しており、アミロイド線維と比較すると少し長波長側にシフトしている。これは、攪拌により形成される凝集体が歪んだ β シート構造を有していることを示唆している。

これらの結果から、HSSアジテーションにより作製された凝集体は、FOと似た性質を示すことがわかる。FOはそのThT蛍光強度がアミロイド線維のそれよりも低いことが示唆されており^[126]、ここで作製した凝集体も同様の傾向を示している。この結果から、HSSアジテーションにより作製されるA β 凝集体は、FOと類似していることがわかるが、報告されているFOと全く同じものである根拠は乏しいために、以下、HSSアジテーションで作製したオリゴマーを β オリゴマーと呼ぶ。

一方、構造を持たないオリゴマーに関しても作製し、その構造と形態を観察した。アミロイド生成性タンパク質は高塩濃度下で構造を持たない凝集体を形成する傾向が高い^[30]ことから、50 μ MのA β_{1-40} モノマー溶液に500 mMのNaClを添加した溶液を放置することによりFig.6.2(b)に示すような直径30 nm程度の小さな凝集体を得た。そして、その凝集体の構

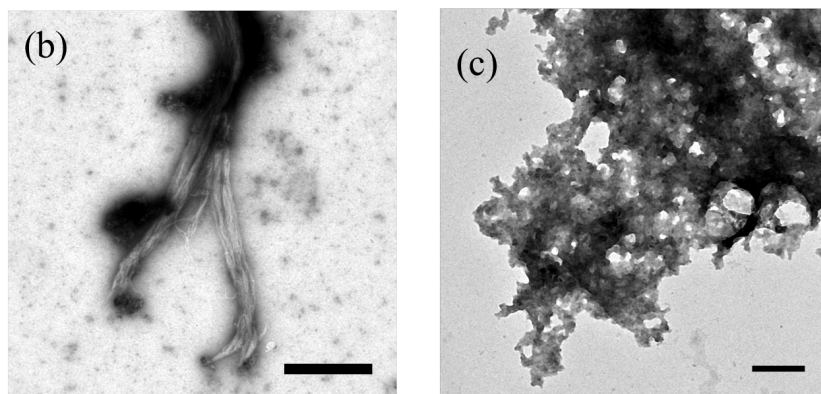
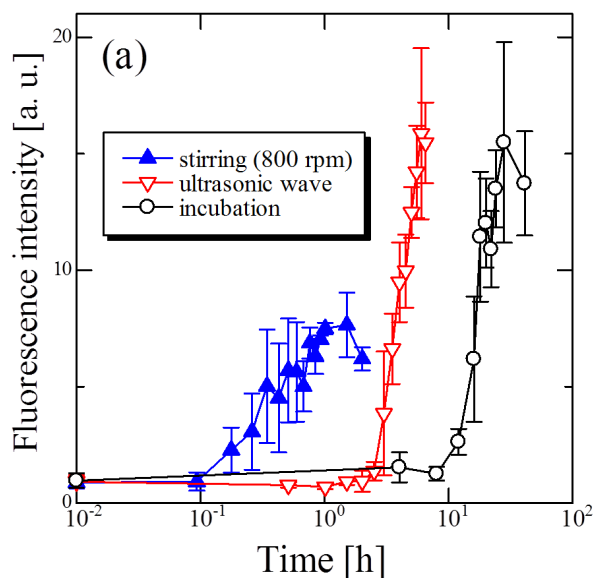


Fig. 6.1 (a) Time courses of the ThT fluorescence intensity caused by OUI, HSS agitations, and incubated condition. TEM images of the aggregates formed by (b) OUI and (c) HSS agitations.

造は, Fig.6.2(a) の CD スペクトルから読み取られるように, ランダムコイル構造であった. これも報告されている PFO と類似した性質を示すものの, 同一の凝集体かどうかはわからないため, 以下この条件で作製したオリゴマーを non- β オリゴマーと呼ぶ. 以下の章ではこれら 2 つのオリゴマーの抗体特異性, シーディング能力, 神経細胞毒性がこれまでの報告と一致するかどうかを調査し, 最後に最適超音波照射を用いて, それらの凝集反応における位置づけを調査する.

6.3 抗体実験

アミロイド線維特異的抗体の OC 抗体^[128] とオリゴマー特異的抗体の A11 抗体^[128] を用いて上記の 2 種類のオリゴマーの性質の抗体への反応性を調査する. FO は, OC 抗体に, PFO

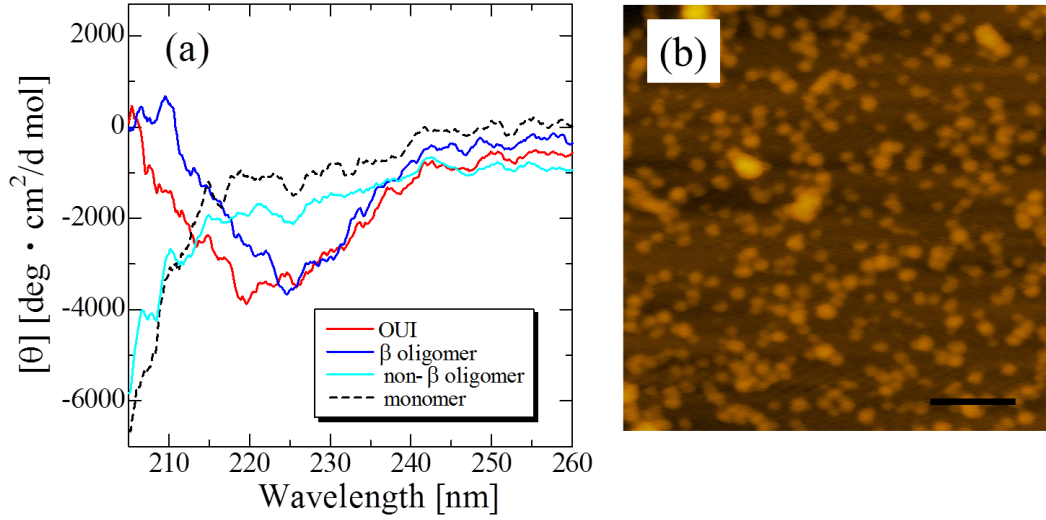


Fig. 6.2 (a)Time courses of the ThT fluorescence intensity caused by ultrasonic irradiation, stirring agitation, and incubated condition. TEM images of the aggregates formed by (b)ultrasonic irradiation and (c)stirring agitation.

は A11 抗体により認識されると報告されている^[127,128]。ここでは、 β オリゴマーと non- β オリゴマーがこれらの抗体に対してどのように反応するかを無線無電極水晶微小天秤 (wireless electrodeless quartz crystal microbalance : WE-QCM) センサ^[130,131]を用いて評価した。

6.3.1 無線無電極水晶微小天秤センサ

水晶微小天秤 (quartz crystal microbalance : QCM) センサでは圧電体である水晶の共振周波数変化より振動子表面での生体分子間相互作用を検出するセンサである。圧電体である水晶は、電位差を加えると弾性変形し、逆に、弾性変形すると電位差を生む。この性質を利用し、外部から水晶が板厚せん断振動モードで共振するような振動電場を印可し、その共振により生じた振動電場を受信し、その共振周波数を測定する。基本共振周波数 f 、質量 M の水晶振動子上に微小質量 Δm が付加された時の周波数変化 Δf は、以下の Sauerbrey の式^[132]により表される。

$$\Delta f = -f \left(1 - \sqrt{\frac{1}{1 + \frac{2\Delta m}{M}}} \right) \sim -\frac{\Delta m}{M} \cdot f \quad (M \gg \Delta m) \quad (6.1)$$

従来用いられる水晶振動子は、振動電場を印可するための金電極を有する。この金電極や配線が妨げとなり、他のバイオセンサと比較すると QCM センサは、感度の低いセンサであった。しかし、本研究で用いる、水晶振動子の振動の励起・検出を銅板アンテナを用いて行う WE-QCM センサでは、振動子表面に金電極を蒸着する必要がなく、そのため高周波化が容易であり、高感度で振動子表面で起きる生体分子間相互作用を検出することが可能である。本研究において水晶振動子には、厚さ $\sim 28 \mu\text{m}$ 、共振周波数 $\sim 60 \text{ MHz}$ の AT-cut 水晶を採用し

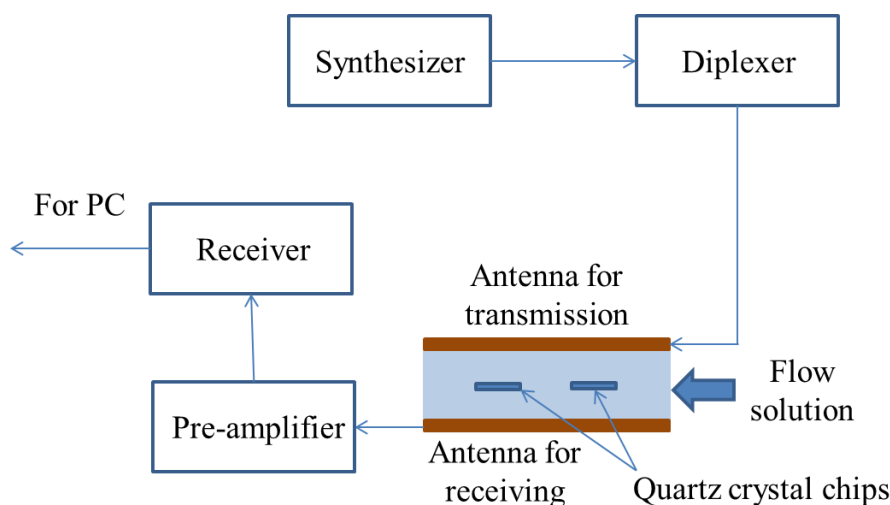


Fig. 6.3 Experimental setup for wireless-electrodeless quartz-crystal-microbalance measurement with two channels.

た．水晶振動子の共振周波数は，温度変化に伴い変化する．しかし，AT-cut 水晶の共振周波数の温度依存性は室温付近で 10^{-6} K^{-1} 程度と非常に小さく^[133](質量変化に伴う水晶の共振周波数変化は $10^{-4} \sim 10^{-5}$ のオーダー^[134])，温度条件に影響を受けにくい計測を行うことが可能である．

6.3.2 実験装置

抗体実験に用いた WE-QCM 計測システムの概略図を Fig.6.3 に示す．本実験においては周波数の異なる2枚の水晶振動子を用いる2チャンネル同時計測^[131]を行った．2枚の銅板アンテナの間は流路になっており，そこに溶液をピエゾポンプを用いて流す．シンセサイザより出力された特定周波数のバースト交流電圧をダイプレキサを通して送信用アンテナに印加する．ダイプレキサはアンテナで反射した入力電圧波形がシンセサイザに逆流することを防止するために用いた．振動子が共振することにより発生した電場を受信用アンテナにより受信し，プリアンプにより 20 dB 増幅する．増幅した信号はレシーバによりさらに増幅され，PC へ取り込み，シンセサイザより発信した周波数成分の信号の振幅と位相を抽出する．この計測を2枚の振動子の共振周波数付近で周波数を変化させながら行うことにより振動子の共振周波数変化を計測した．なお，信号の送信と受信には，RITEC 社製 RAM-5000 システムを用いた．

6.3.3 実験方法

準備した共振周波数の異なる2枚の AT-cut 水晶振動子の両表面に Cr を 5 nm，Au を 18 nm 程度スパッタリング法により製膜する．これらの薄膜は，電極として用いるものではなく，自己組織化単分子膜 (self assembly monolayer : SAM) で振動子表面を修飾するためのものである．以下の手順でチップを準備した．

- (1) ピラニア溶液 ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 7:3$) 中で 5 min, UV 洗浄を 15 min 行う.
- (2) 無水エタノールで濃度 10 mM に調整した SAM 溶液にチップを浸し, 半日程度, 冷蔵庫 (4 °C) 内で放置.
- (3) 100 mM の 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) と 100 mM の N-hydroxysuccinimide (NHS) を含む溶液にチップを浸し, 1 h 放置する.
- (4) 標的物質 (β オリゴマー, non- β オリゴマー) を 1h 固定化する.
- (5) 10 mg/ml のウシ血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA) 溶液中で 1 h 放置する.
- (6) 一方のチップに 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の OC 抗体を, もう一方のチップに 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の A11 抗体をたらし, 標的物質と反応させる.

ここまで準備したチップを, 計測用フローセルにセットし, 共振周波数を計測しながら PBS を 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で流し込む. 共振周波数が安定したことを確認し, フロー溶液を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の黄色ブドウ球菌タンパク質 (Staphylococcus-aureus protein A : SPA) に切り替える. SPA は IgG 系抗体に結合するため, 標的物質に OC \cdot A11 抗体が結合していると, 共振周波数変化が起きる. このような方法により β オリゴマー \cdot non- β オリゴマーの OC \cdot A11 抗体に対する特異性を調査した. このアッセイにおける水晶振動子表面での反応を表した模式図を Fig. 6.4(a) に示す.

6.3.4 実験結果

以上の方法で行った抗体実験の結果を Fig. 6.4 に示す. Fig. 6.4(b), (c), (d) はそれぞれ, β オリゴマー, non- β オリゴマー, BSA を水晶振動子表面に固定化し, OC \cdot A11 抗体と反応させたチップの共振周波数変化曲線である. BSA と SPA は結合しないことがあらかじめわかっているため, ネガティブコントロールとして用いた. なお, これらの反応曲線の時刻 0 s の点は, SPA 溶液がチップに到達し, 反応が始まった時刻である. そして, Fig. 6.4(e) には, 同様の実験を 3 回行い, 反応開始から 30 min 後の周波数変化量をまとめたものである. これらの実験結果より, β オリゴマーは, 線維特異的 OC 抗体により, non- β オリゴマーはオリゴマー特異的 A11 抗体により認識されることが明らかになった.

6.4 シーディング実験

アミロイド線維の形成過程は大きく分けて核生成反応と線維伸長反応の二段階に分かれている. このうち核生成反応は, 高いエネルギー障壁を越えなければ完了しない反応であり, 長い時間を要する. 一方, 線維伸長反応は, 核生成反応が完了すると, 即座に進行する反応である. この性質から, A β のモノマー溶液に前もって作製した線維を添加することで線維形成が即座に完了する. これをシーディング反応^[24]と呼び, 作製した線維のシーディング能力を調査するためにしばしば用いられる.

この反応を用いて, 攪拌により作製した β オリゴマーのシードとしての能力を調査した. その実験結果を Fig. 6.5 に示す. なお, モノマー溶液に対して 5% vol. のシード溶液を添加し,

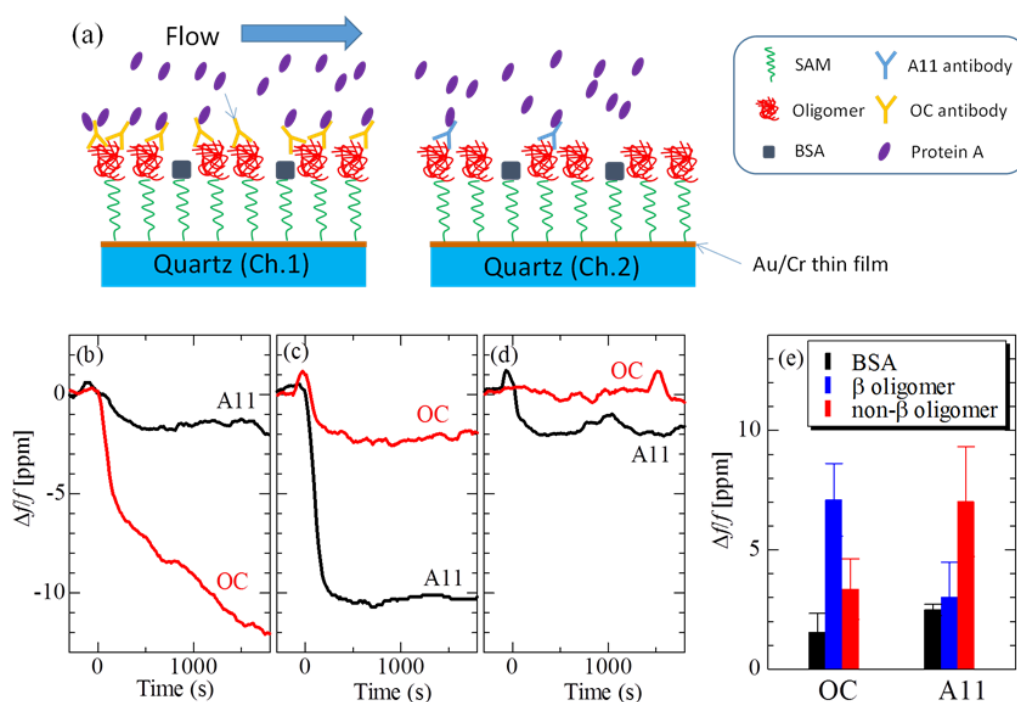


Fig. 6.4 (a)Schematic illustration of the antibody experiment with two-channel WE-QCM measurement system. The reaction curves between OC/A11 antibodies and (b) β oligomer, (c)non- β oligomer, and (d)BSA. (e)The amounts of frequency changes after 30 min from start of the reaction.

37 °C で放置した。モノマーの溶液のみを放置した場合は、およそ 10 h のラグタイムののち ThT レベルが上昇し、20 h 程度で反応が完了した。モノマー溶液に超音波を用いて作製した線維を添加した際には、シーディング効果により実験開始直後から ThT レベルの上昇が始まり、3 h 程度で線維化は完了した。しかし、攪拌により作製した β オリゴマーを添加した際は、モノマーだけの場合とほとんど変化は見られず、シーディング反応は見られなかった。このことは、 β オリゴマーの有する β シート構造が線維を形成するものとは本質的に異なることを意味している。

6.5 毒性試験

これら 2 つのオリゴマーの神経細胞に対する毒性評価試験を行った。これまでも A β のオリゴマーの毒性を調査した研究は多く存在し、HeLa 細胞 [78], PC-12 細胞 [135,136], 神経芽細胞腫 [137,138] などを用いてそれらの細胞毒性を評価している。一方で、マウス神経細胞を用いた試験 [139–141] も行われており、この系は上記の細胞と比較して人間の神経環境に近いと、毒性を評価するために適していると考えられる。そこで本研究では、マウスの ES 細胞から分化させた神経系を毒性試験の対象として用いた。この神経系は、ニューロンだけでなく、アス

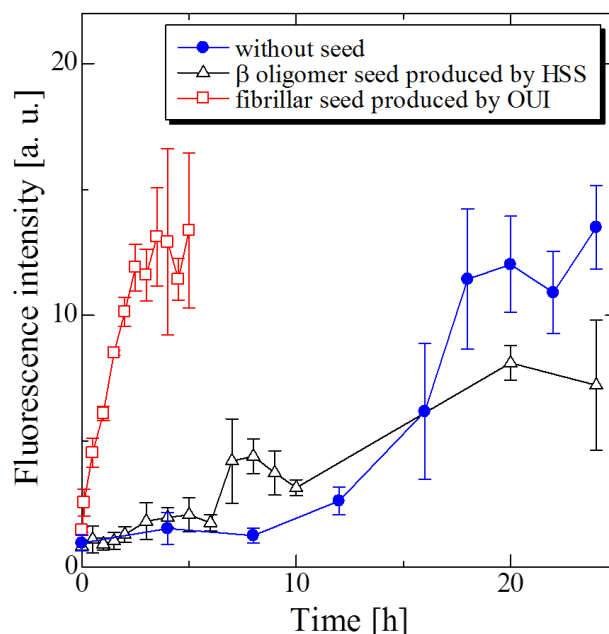


Fig. 6.5 Time courses of the ThT fluorescence intensity with OUI-fibril and HSS- β -oligomer seeds with three different concentrations.

トロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞も含む系である．実験に用いた神経系の蛍光顕微鏡画像を Fig. 6.6 に示す．この画像において赤，緑で染色された部分は，それぞれニューロンとアストロサイトである．

培養した神経系に 500 nM の濃度の β オリゴマーと non- β オリゴマーを 1 日，もしくは 3 日間添加し，その後，1 週間培養を続けた後，ニューロンを免疫染色し，観察した．取得した画像の一例を Fig.6.7 に示す．これらは同じ領域を蛍光顕微鏡 (Fig.6.7(a)) と光学顕微鏡 (Fig.6.7 (b)) で観察したものである．Fig.6.7(a) で赤く染色された細い組織は神経細胞の軸索であり，この軸索は，細胞が高密度に集まったコロニーより伸長し，組織を形成する．なお，コロニーとは光学顕微鏡画像の右上にある塊である．すべての軸索は細胞体に属しており，細胞体が損傷を受けると，軸索は細く，短くなる．このことに着目し，オリゴマーを添加した際の軸索の密度を蛍光顕微鏡画像から数値化し，比較することでそれらの毒性を評価した．各サンプルにおけるコロニー周辺の軸索組織を切り出した画像を Fig.6.8(a)-(d) に示す．図中の (a) はバッファーのみを添加したサンプル，(b) はモノマーのみを添加したサンプルの画像である．バッファーのみを添加したサンプルでは，高密度の軸索がネットワークを形成している様子が観察された (Fig. 6.7(a))．モノマーを添加したサンプルの軸索の密度は，少し低いように見えるもののネットワーク組織を形成している (Fig. 6.7(b))．しかし，2 種類のオリゴマーを添加したサンプルでは，ネットワーク上の組織は観察されず，軸索も細く短いものが多く見受けられた (Fig. 6.7(c), (d))．このような画像を各サンプルに対し 20~25 枚取得し，軸索の密度を

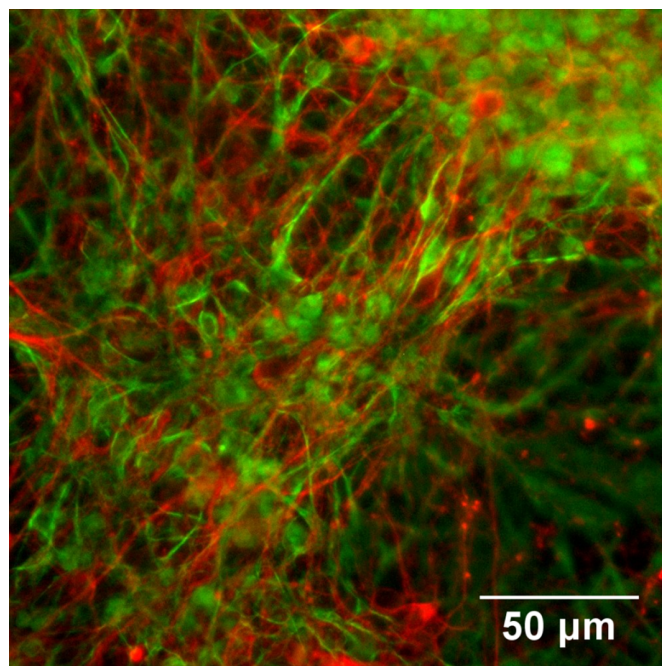


Fig. 6.6 Fluorescence image of the neural system differentiated from mouse ES cells. Red and green regions indicate neuron and astrocyte structures, respectively.

数値化した。その結果を Fig. 6.7(e) に示す。ネガティブコントロールとオリゴマーを添加したサンプルの間には有意な差があり、これらのオリゴマーは神経細胞に対して毒性を示すことが明らかになった。

6.6 2種類のオリゴマーへの超音波照射実験

2種類のオリゴマーの構造が超音波照射によりどのように変化するかを ThT 蛍光強度変化と顕微鏡観察により調査した。その実験結果を Fig.6.9 に示す。Fig.6.9(a) に示すのは、 β オリゴマーに超音波を照射したときの実験結果であり、OUI と HSS の複合実験になっている。 $A\beta$ サンプルに OUI を照射した際には、キャビテーションの凝集加速効果^[129,142]によりその核生成反応が2 h 程度に加速され(図中破線赤三角)、アミロイド線維が形成された。そして、超音波照射により作製したアミロイド線維に HSS アジテーションを加えてもその蛍光強度が変わることはなく(図中紫三角)、超音波照射により作製した線維の構造が安定であることが示唆された。一方、攪拌したサンプルはラグタイムを経ずその ThT 蛍光強度が上昇し、 β オリゴマーが形成される(図中破線青四角)。この攪拌によって形成した β オリゴマーに超音波を照射したときの ThT 蛍光強度の経時変化を示したものが図中橙色四角である。サンプルに超音波を照射したときにもその ThT 蛍光強度が変化することなく、超音波を照射した後のサンプルを TEM で観察しても線維様凝集体はみられなかった。攪拌により即座に形成される β オリゴマーは OUI によってもその構造が変わることがないほど安定な構造を有していること

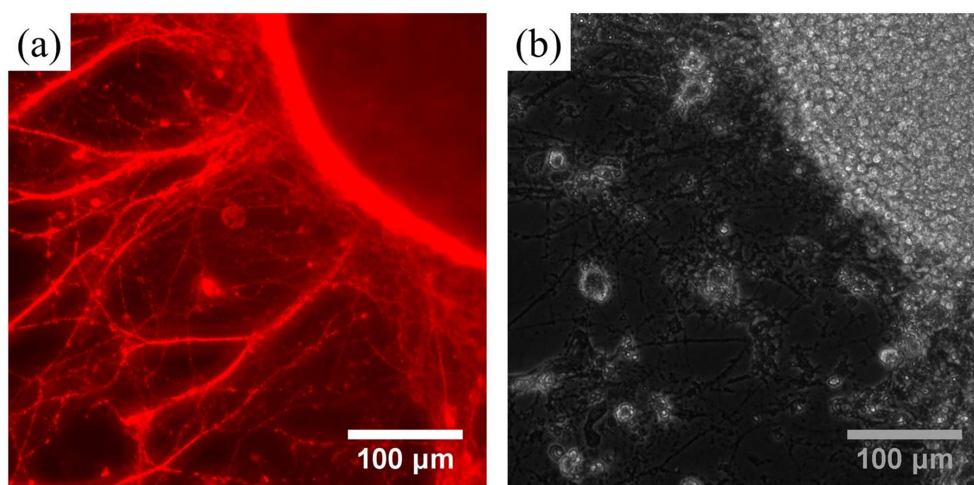


Fig. 6.7 Images of neuronal systems used for the neurotoxicity assay of the β and non- β oligomers acquired by (a) fluorescence and (b) optical microscopes.

が明らかになった。

次に、non- β オリゴマーに超音波を照射する実験を行った。500 mM の NaCl とともに 50 μ M の A β サンプルを静置したときの ThT 蛍光強度変化を Fig.6.9(b) の白抜き丸印で示す。このサンプルでは、16 時間までは ThT 蛍光強度の上昇は見られず、形成された凝集体も線維様の構造を示さなかった。次に、同じ条件のサンプルを 10 h まで放置し、その後、OUI アジテーションを加える実験を行った。すると、10 h まで上昇しなかった ThT 蛍光強度が OUI 開始と同時に上昇し、形成されたサンプルを観察すると、線維が絡み合ったような凝集体が観察された。OUI アジテーションによりその構造が即座に線維へと改変されることは、non- β オリゴマーが線維形成反応の中間体であることを示唆している。

6.7 考察

これまでの実験で得られた実験結果を整理すると、次のようになる。A β 溶液に HSS アジテーションを加えることにより即座に β オリゴマーを形成することが可能である。 β オリゴマーは ThT 蛍光を発するが、その CD スペクトルはアミロイド線維のそれよりも長波長側にシフトしたスペクトルであり、アミロイド線維の β シート構造とは異なる歪んだ β シート構造を有することが示唆された。実際にその凝集体は線維形成反応のシードとしての能力は有しておらず、線維とは本質的に異なる構造を有していることが示唆された。この β オリゴマーはオリゴマー特異的抗体 A11 によっては認識されず、線維特異的抗体 OC によって認識される。超音波照射実験により、この構造は攪拌処理により即座に形成されるが、OUI アジテーションによって改変されないほど安定であることがわかった。一方、高塩濃度下で作成される non- β オリゴマーは、モノマーと同じランダムコイル構造を有し、その形態は、直径 30 nm 程度の

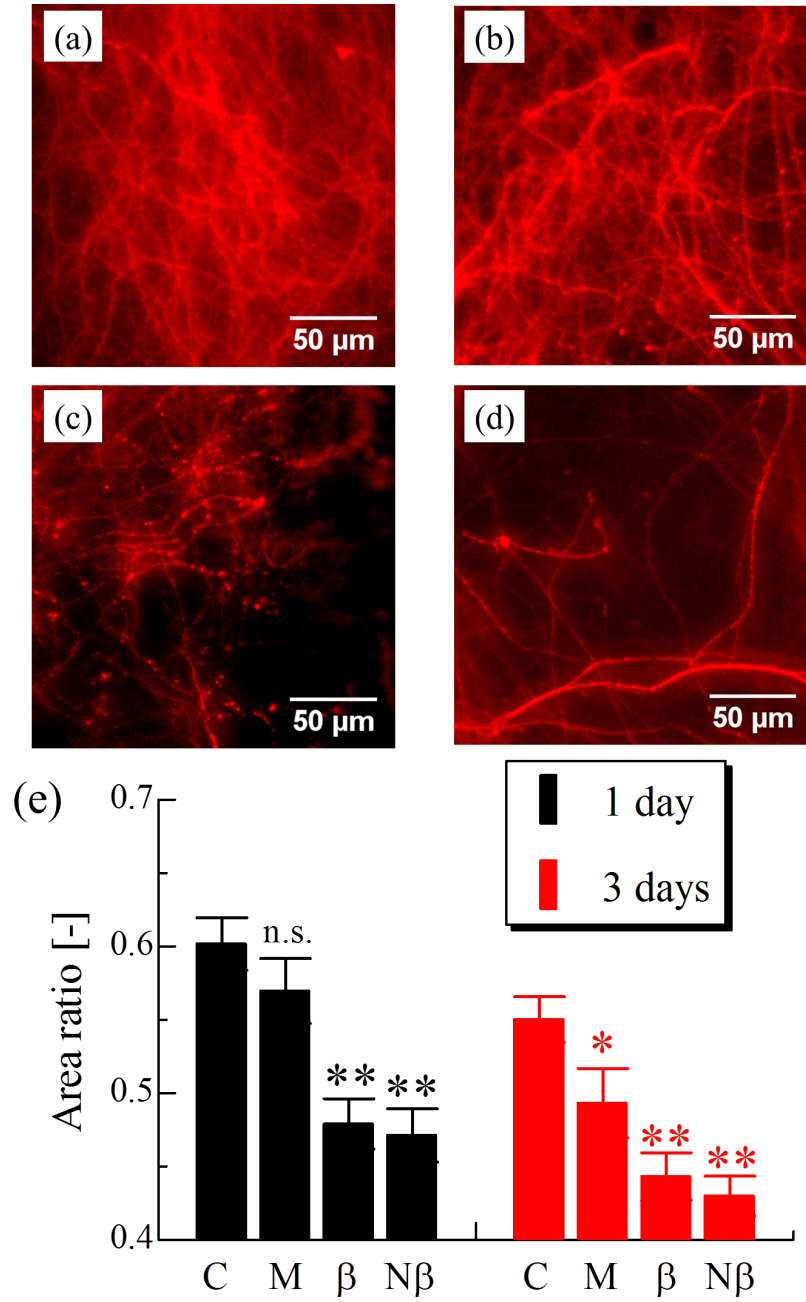


Fig. 6.8 (a)-(d) are fluorescence images on the neurotoxicity assay for (a) negative control, (b) monomer-, (c) β -oligomer-, and (d) non- β -oligomer-added samples. (e) Comparison of the axon density quantified from an area ratio of the fluorescence images between above four samples. C, M, β , and N β denote control, monomer, β oligomer, and non- β oligomer, respectively. Results represent the mean \pm sem ($n=15-25$). n.s.: not significant, * $p < 0.05$, and ** $p < 0.001$ versus leftmost bars in the each group, negative control.

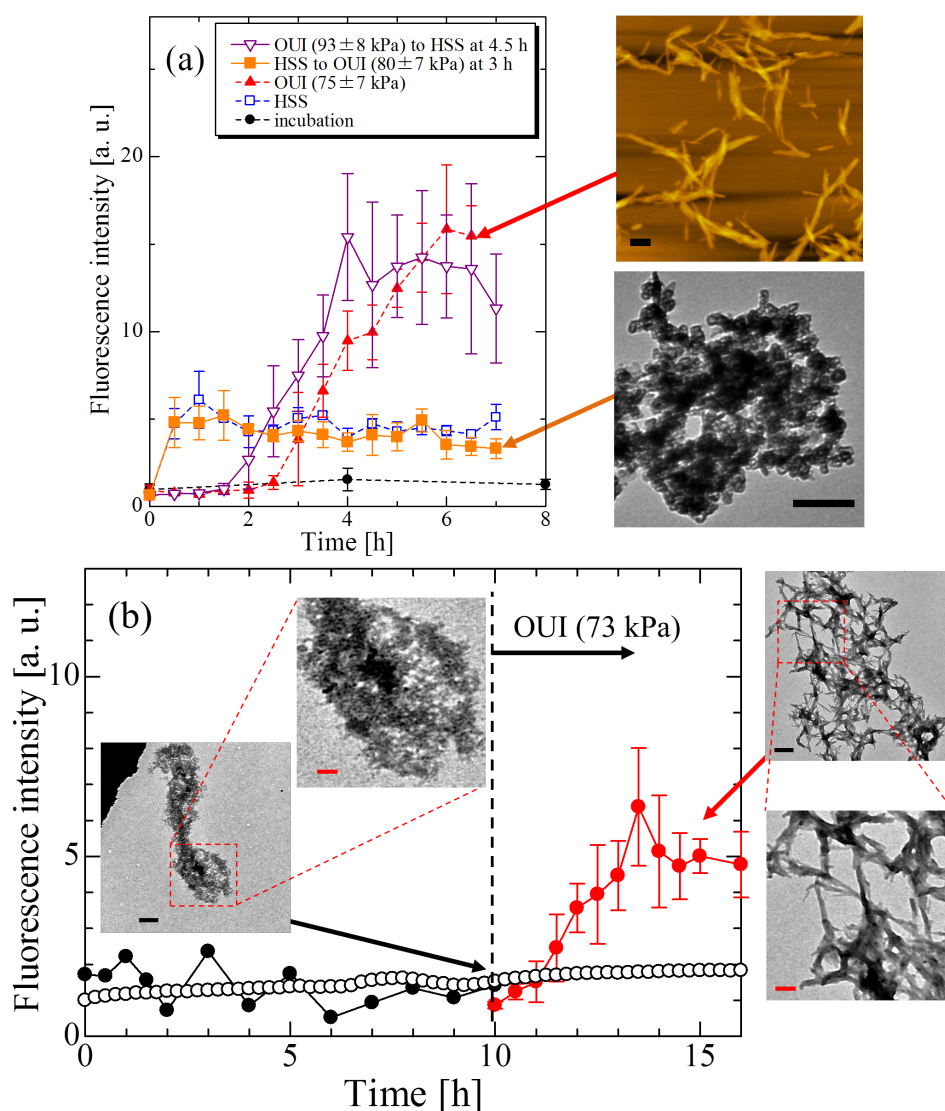


Fig. 6.9 (a)Results of composite experiments with high speed stirring(HSS) and optimized ultrasonic irradiation(OUI) agitations. Scale bars denote 200 nm. (b)Result of ultrasonic irradiation experiment to non- β oligomer. Black and red scale bars denote 300 and 100 nm, respectively.

小さな凝集体である。その構造は、A11 抗体によって認識され、超音波によってその構造は即座に線維へと改変されることから、線維形成過程の中間体であることが示唆された。また、これらは神経細胞に対し、毒性を示した。

以上の実験結果を踏まえて Fig.6.10 のような A β の凝集モデルを作成した。このモデルにおいて、 β オリゴマーは線維とは独立のデッドエンド、non- β オリゴマーは、線維形成過程の中間体として扱っている。攪拌アジテーションを加えたときに、 β -オリゴマーが即座に形成さ

れることから、 β -オリゴマー形成へのエネルギー障壁は低い、超音波を照射してもその構造が改変されないことから、安定な構造を有していると考えられる (Fig.6.10(a)). 一方、超音波照射条件化 (Fig.6.10(b)) では、モノマーは、キャビテーションの効果により、核生成への見かけのエネルギー障壁が低下し、核生成、次いで、線維形成を起こす。この過程の中間体である、non- β オリゴマーに超音波を照射すると線維形成を起こす。この際、non- β オリゴマーが直接、凝集核にその構造を変えているのか、分解され一度モノマーに戻ったのちに核生成を起こしているのかは定かではない。超音波照射条件化で β -オリゴマーが形成されないのは、超音波の有する分散効果のせいであると推測される。超音波照射条件化では、 β -オリゴマーのような一部ゆがんだ構造を有する凝集体は、形成されず、規則的な構造を有する安定な凝集核のようなもののみが形成されると考えられる。

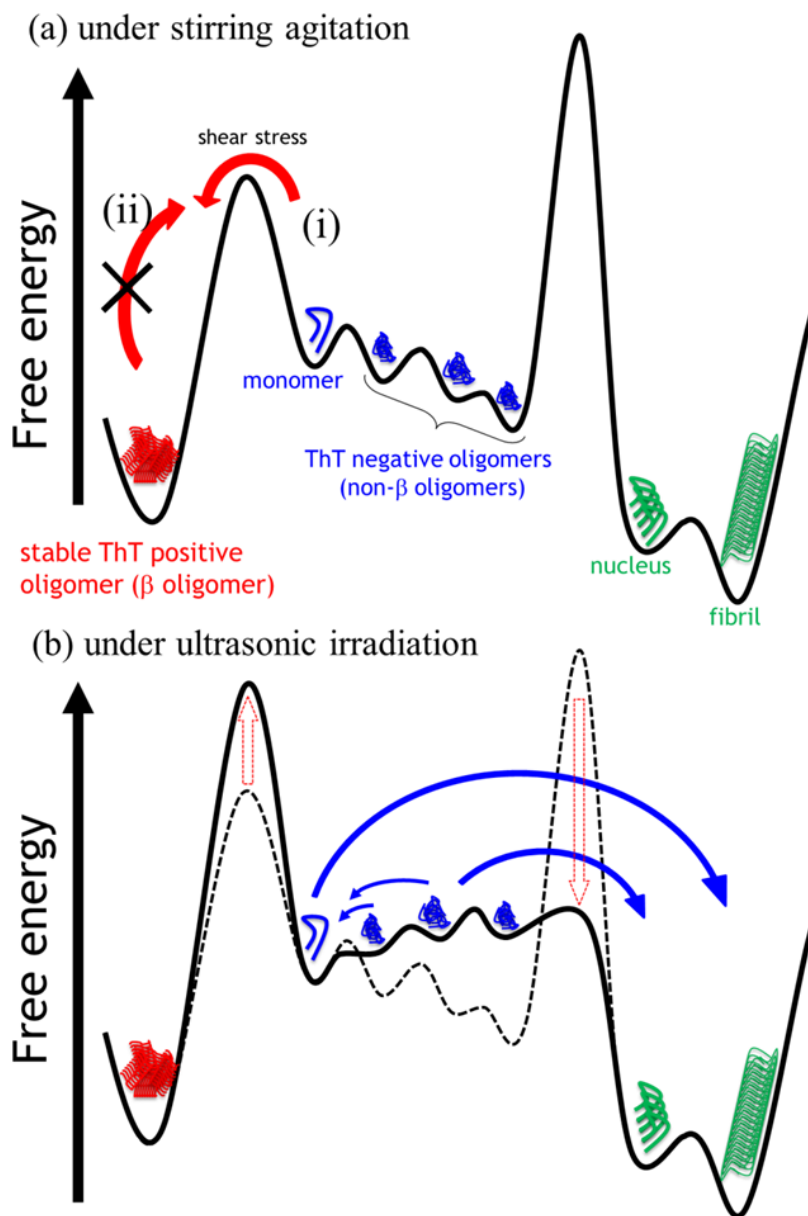


Fig. 6.10 Schematic of aggregation model of A β_{1-40} aggregation reaction under (a) stirring agitation and (b) ultrasonic irradiation. (a) (i) β oligomers are immediately formed with shear stress generated by HSS agitation. (ii) Once β oligomers are formed, their conformations are unchanged even under OUI agitation. (b) Ultrasonic agitation accelerates nucleation of fibril by decrease of apparent energy barrier for nucleation through the catalytic effect of the cavitation bubble. Non- β oligomers are changed their conformation directly, or through its disassociation to monomer state by dispersion effect of ultrasonic wave. On the other hand, energy barrier for formation of β oligomers increases by ultrasonic agitation, because it forces the peptides to be isolated and prevents them from interacting each other.

第7章 結言

本研究では、以下の成果を得た。

- これまでに調査されることがなかった、超音波照射によるアミロイド線維形成加速現象の機構をモデルタンパク質であるインスリンに対する超音波照射実験により調査し、その機構の根幹に超音波照射により溶液中に発生するキャビテーションが深く関連していることを明らかにした。
- アルツハイマー病原因タンパク質の $A\beta_{1-40}$ に対する超音波照射実験を行い、29 kHz にアミロイド線維の核生成反応を加速するために最適な周波数が存在することを発見した。
- 最適周波数において、さらに音圧値を調整することにより、超音波を照射しないときと比較して核生成の反応速度定数を約 1000 倍上昇させることに成功した。
- キャビテーションの半径運動に着目した凝集加速モデルを提案し、それに基づいた理論計算により、核生成の反応速度定数の周波数・音圧依存性の実験結果の傾向を理論的に再現することに成功した。
- 超音波照射の特異な線維形成能力に着目し、 β シート構造を有する $A\beta$ オリゴマーは、線維とは独立なデッドエンドであり、構造を持たないオリゴマーは線維形成過程の中間体であることを明らかにした。

これまで数日間という長い時間をかけて行っていた実験も最適超音波照射を用いることにより短時間で行うことが可能になり、統計的な実験を行う際の効率が飛躍的に上昇すると考えられる。また、6 章でも示したように超音波キャビテーションが有する高い線維化能力は、アミロイド線維の形成過程における議論に終止符を打つ強力な手法になりうる。そして、アルツハイマー病の診断法としても超音波照射は非常に優秀であると考ええる。従来の手法では凝集を引き起こすことが困難な極低濃度検体に対しても、超音波照射を用いれば、キャビテーション気泡の局所濃縮・加熱効果により、少量とは思われるが短時間で核生成を引き起こすことが可能である。この核を増幅することで短時間で検査することが可能だと考えられる。また、診断法に超音波を応用する際にも、多数の検体に超音波を同時に照射することによるハイスループット化や焦点型超音波センサを用いることによる極少量検体での検査など、得られるメリットは多いであろう。

参考文献

- [1] S. B. Prusiner, M. P. McKinley, D. F. Groth, K. A. Bowman, N. I. Mock, S. P. Cochran, and F. R. Masiarz, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6675-6679.
- [2] S. J. DeArmond, M. P. McKinley, R. A. Barry, M. B. Braunfeld, J. R. McColloch, and S. B. Prusiner, (1985) *Cell* 41, 221-235.
- [3] S. B. Prusiner, (1987) *Annu. Rev. Med.* 38, 381-398.
- [4] E. M. Trillo, G. P. Solis, Y. Schrock, L. Luncz, V. Thomanetz, and C. A. Stuermer, (2009) *PLoS Biol.* 7, 576-590.
- [5] R. K. Meyer, M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry, and S. B. Prusiner, (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 2310-2314.
- [6] S. B. Prusiner, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 13363-13383.
- [7] F. Chiti, and C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* (2006) 75, 333-366.
- [8] C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, and K. Beyreuther, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 4245-4249.
- [9] M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert, (1997) *Nature* 388, 839-840.
- [10] M. G. Spillantini, R. A. Growther, R. Jakes, M. Hasegawa, M. Goedert, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 6469-6473.
- [11] J.-X. Lu, W. Qiang, W.-M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, and R. Tycko, (2013) *Cell* 154, 1257-1268.
- [12] F. Gejyo, H. Kimura, S. Suzuki, R. Miyazaki, H. Naiki, and K. Nakakuki, (1997) *Kidney Int. Suppl.* 62, S75-78.
- [13] The Huntington's Disease Collaborative Research Group, (1993) *Cell* 72, 971-983.
- [14] D. Eisenberg, and M. Jacker, (2012) *Cell* 148, 1188-1203.
- [15] R. N. Rambaran, and L. C. Serpell, (2008) *Prion* 2, 112-117.
- [16] L. C. Serpell, (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 16-30.
- [17] F. Oosawa, S. Asakura, N. Imai, and T. Ooi, (1959) *J. Polym. Sci.* 37, 323-336.
- [18] F. Oosawa, and M. Kasai, (1962) *J. Mol. Biol.* 4, 10-21.
- [19] A. M. Morris, M. A. Watzky, and R. G. Finke, (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 375-397.
- [20] M. A. Watzky, and R. G. Finke, (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 10382-10400.
- [21] M. A. Watzky, A. M. Morris, E. D. Ross, and R. G. Finke, (2008) *Biochemistry* 47, 10790-10800.
- [22] R. Sabaté, M. Gallardo, and J. Estelrich, (2005) *Int. J. Biol. Macromol.* 35, 9-13.
- [23] R. Sabaté, V. Castillo, A. Espargaró, S. J. Saupe, and S. Ventura, (2009) *FEBS J.*

276, 5053-5064.

- [24] J. T. Jarrett, and P. T. Lansbury Jr., (1993) *Cell* 73, 1055-1058.
- [25] D. Hall, and H. Edskes, (2004) *J. Mol. Biol.* 336, 775-786.
- [26] T. P. J. Knowles, C. A. Waudby, G. L. Devlin, S. I. A. Cohen, A. Aguzzi, M. Vendruscolo, E. M. Terentjev, M. E. Welland, and C. M. Dobson, (2009) *Science* 326, 1533-1537.
- [27] M. M. Pallitto, and R. M. Murphy, (2001) *Biophys. J.* 81, 1805-1822.
- [28] S. I. A. Cohen, M. Vendruscolo, E. M. Terentjev, M. E. Wellend, and T. P. J. Knowles, (2011) *J. Chem. Phys.* 135, 065105.
- [29] A. Lomakin, D. Chung, G. B. Benedek, D. A. Kirchner, and D. B. Teplow, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 7942-7947.
- [30] Y. Yoshimura, Y. Lin, H. Yagi, Y.-H. Lee, H. Yagi, H. Kitayama, K. Sakurai, M. So, H. Ogi, H. Naiki, and Y. Goto, (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 14446-14451.
- [31] G.-R. J. Manuel, (2003) *J. Struct. Biol.* 142, 22-31.
- [32] N. Cremades, S. I. A. Cohen, E. Deas, A. Y. Abramov, A. Y. Chen, A. Orte, M. Sandal, R. W. Clarke, P. Dunne, F. A. Aprile, C. W. Bertoncini, N. W. Wood, T. P. J. Knowles, C. M. Dobson, and D. Klenerman, (2012) *Cell* 149, 1048-1059.
- [33] K. Almstedt, S. Nyström, K. Peter, R. Nilsson, and P. Hammarström, (2009) *Prion* 3, 224-235.
- [34] C. L. Ladner-Keay, B. J. Griffith, and D. S. Wishart, (2014) *PLoS One* 9, e98753.
- [35] Y. Ohhashi, Y. Kihara, H. Naiki, and Y. Goto, (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 32843-32848.
- [36] M. So, H. Yagi, K. Sakurai, H. Ogi, H. Naiki and Y. Goto, (2011) *J. Mol. Biol.* 412, 568-577.
- [37] K. Yamaguchi, T. Matsumoto, and K. Kuwata, (2012) *Protein Sci.* 21, 38-49.
- [38] K. Uesugi, H. Ogi, M. Fukushima, M. So, H. Yagi, Y. Goto, and M. Hirao, (2013) *Jpn. J. Appl. Phys.* 52, 07HE10.
- [39] A. Umemoto, H. Yagi, M. So, and Y. Goto, (2014) *J. Biol. Chem.* 289, 27290-27299.
- [40] H. J. Kim, E. Chatani, Y. Goto and S. R. Paik, (2007) *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 2027-2032.
- [41] H. Kitayama, Y. Yoshimura, M. So, K. Sakurai, H. Yagi, and Y. Goto, (2013) *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 2640-2646.
- [42] H. Muta, Y. H. Lee, J. Kardos, Y. Lin, H. Yagi, and Y. Goto, (2014) *J. Biol. Chem.* 289, 18228-18238.
- [43] H. Yagi, K. Hasegawa, Y. Yoshimura, and Y. Goto, (2013) *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 2480-2485.
- [44] E. Chatani, Y.-H. Lee, H. Yagi, Y. Yoshimura, H. Naiki, and Y. Goto, (2009) *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA. 106, 11119-11124.
- [45] J. R. Thomas, (1959) J. Phys. Chem. 63, 1725-1729.
 - [46] M. Shestakova, M. Vinatoru, T. J. Mason, and M. Sillanpää, (2014) Ultrason. Sonochem. 23, 135-141.
 - [47] G. G. Glenner, and C. W. Wong, (1984) Biochem. Biophys. Res. Com. 120, 885-890.
 - [48] P. Cras, M. Kawai, D. Lowery, P. G.-DeWhitt, B. Greenberg, and G. Perry, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 7552-7556.
 - [49] C. Bancher, H. Lassmann, H. Budka, I. G.-Iqbal, K. Iqbal, G. Wiche, F. Seitelberger, and H. M. Wisniewski, (1987) Acta Neuropathol. 74, 39-46.
 - [50] J. A. Hardy, and G. A. Higgins, (1992) Science 256, 184-185.
 - [51] E. Karran, M. Mercken, and B. D. Strooper, (2011) Nat. Rev. Drug Discov. 10, 698-712.
 - [52] R. Vassar *et al.*, (1999) Science 286, 735-741.
 - [53] I. Daigle, and C. Li, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 12045-12049.
 - [54] E. Kojro, and F. Fahrenholz, (2005) Subcell Biochem. 38, 105-127.
 - [55] C. Haass, M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. V.-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk, D. B. Teplow, and D. J. Salkoe, (1992) Nature 359, 322-325.
 - [56] P. D. Mehta, T. Pirttilä, S. P. Mehta, E. A. Sersen, P. S. Aisen, and H. M. Wisniewski, (2000) Arch. Neurol. 57, 100-105.
 - [57] J. Pannee, E. Portelius, L. Minthon, J. Gobom, U. Andreasson, H. Zetterberg, O. Hansson, and K. Blennow, (2016) J. Neurochem. doi: 10.1111/jnc.13838.
 - [58] A. E. Conicella, and N. L. Fawzi, (2014) Biochemistry 53, 3095-3105.
 - [59] R. J. Bateman *et al.*, (2012) New Engl. J. Med. 367, 795-804.
 - [60] A. Nordberg, J. O. Rinne, A. Kardir, and B. Långström, (2010) Nat. Rev. Neurol. 2, 78-87.
 - [61] L. I. McGuire *et al.*, (2012) Ann. Neurol. 72, 278-285.
 - [62] G. P. Saborio, B. Permanne, and C. Soto, (2001) Nature 411, 810-813.
 - [63] N. Salvadores, M. Shahnawaz, E. Scarpini, F. Tagliavini, and C. Soto, (2014) Cell Rep. 7, 261-268.
 - [64] M. Kato, H. Kinoshita, M. Enokita, Y. Hori, T. Hashimoto, T. Iwatsubo, and T. Toyo'oka, (2007) Anal. Chem. 79, 4887-4891.
 - [65] S. Nag, B. Sarkar, A. Bandyopadhyay, B. Sahoo, V. K. A. Sreenivasan, M. Kombrabail, C. Muralidharan, and S. Maiti, (2011) J. Biol. Chem. 286, 13827-13833.
 - [66] S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, A. Baumketner, J.-E. Shea, G. Bitan, D. B. Teplow, and M. T. Bowers, (2005) J. Am. Chem. Soc. 127, 2075-2084.
 - [67] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. R.-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert,

- and R. Riek, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 17342-17347.
- [68] T. L. S. Benzinger, D. M. Gregory, T. S. Burkoth, H. M.-Auer, D. G. Lynn, R. E. Botto, and S. C. Meredith, (2000) *Biochemistry* 39, 3491-3499.
- [69] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, and R. Tycko, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 16742-16747.
- [70] S. B. Malinchik, H. Inouye, K. Szumowski, and D. Kirschner, (1998) *Biophys. J.* 74, 537-545.
- [71] L. C. Serpell, (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 16-30.
- [72] J. L. Jiménez, E. J. Nettleton, M. Bouchard, C. V. Robinson, C. M. Dobson, and H. R. Saibil, (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 9196-9201.
- [73] A. Lorenzo, and B. A. Yankner, (1996) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777, 89-95.
- [74] A. Stéphan, S. Laroche, and S. Davis, (2001) *J. Neurosci.* 21, 5703-5714.
- [75] Y. He, M. M. Zheng, Y. Ma, X. J. Han, X. Q. Ma, C. Q. Qu, and Y. F. Du, (2012) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 429, 125-130.
- [76] C. Balducci, M. Beeg, M. Stravalaci, A. Bastone, A. Scip, E. Biasini, L. Tapella, L. Colombo, C. Manzoni, T. Borsello, R. Chiesa, M. Gobbi, M. Salmona and G. Forloni, (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2295-2300.
- [77] C. Haass, and D. J. Selkoe, (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101-112.
- [78] J. C. Stroud, C. Lin, P. K. Teng, and D. Eisenberg, (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 7717-7722.
- [79] T. Miti, M. Mentor, J. D. Schmit, and M. Martin, (2015) *Biomacromol.* 16, 326-335.
- [80] M. Adachi, M. So, K. Sakurai, J. Kardos, and Y. Goto, (2015) *J. Biol. Chem.* 290, 18134-18145.
- [81] J. S. Griffith, (1967) *Nature* 215, 1043-1044.
- [82] J. Hofrichter, P. D. Ross, and W. A. Eaton, (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 3035-3039.
- [83] R. Crespo, P. M. Martins, L. Gales, F. Rocha, and A. N. Damas, (2010) *J. Appl. Cryst.* 43, 1419-1425.
- [84] F. Sanger, and H. Tuppy, (1951) *Biochem. J.* 49, 463-481.
- [85] H. B. Olsen, S. Ludvigsen, and N. C. Kaarsholm, (1996) *Biochemistry* 35, 8836-8845.
- [86] M. Groenning, S. Frokjaer, and B. Vestergaard, (2009) *Cur. Protein Pept. Sci.* 10, 509-528.
- [87] M. Manno, E. F. Craparo, V. Martorana, D. Bulone, P. L. S. Biagio, (2006) *Biophys. J.* 90, 4585-4591.
- [88] E. Chatani, R. Inoue, H. Imamura, M. Sugiyama, M. Kato, M. Yamamoto, K. Nishida, and T. Kanaya, (2015) *Sci. Rep.* 5, 15485.
- [89] V. Minster, and J. Proost, (2008) *Ultrason. Sonochem.* 15, 598-604.

- [90] D. Lohse, (2005) *Nature* 434, 33-34.
- [91] W. Lauterborn, T. Kurz, R. Geisler, D. Schanz, and O. Lindau, (2007) *Ultrason. Sonochem.* 14, 484-491.
- [92] G. G. Yaralioglu, I. O. Wygant, T. C. Marentis, and B. T. Khuri-Yakub, (2004) *Anal. Chem.* 76, 3694-3698.
- [93] R. Vácha, S. Linse, and M. Lund, (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136, 11776-11782.
- [94] S. Damjanovich, B. Somogyi and G. R. Welch, (1983) *J. Theor. Biol.* 105, 25-33.
- [95] N. T. Hunt, G. M. Greetham, M. Towrie, A. W. Parker, and N. P. Tucker, (2011) *Biochem. J.* 433, 459-468.
- [96] M. I. Smith, J. S. Sharp, and C. J. Roberts, (2007) *Biophys. J.* 93, 2143-2151.
- [97] M. Biancalana, and S. Koide, (2010) *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1405-1412.
- [98] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, and T. Takeda, (1989) *Anal. Biochem.* 177, 244-249.
- [99] H. LeVine III, (1993) *Protein Sci.* 2, 404-410.
- [100] M. D'Amico, M. G. Di Carlo, M. Groenning, V. Militello, V. Vetri, and M. Leone, (2012) *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 1596-1601.
- [101] E. A. Neppiras, (1968) *J. Acoust. Soc. Am.* 46, 587-601.
- [102] M. Manno, E. F. Craparo, A. Podestá, D. Bulone, R. Carrotta, V. Martorana, G. Tiana, and P. L. S. Biagio, (2007) *J. Mol. Biol.* 366, 258-274.
- [103] Y. Kusumoto, A. Lomakin, D. B. Teplow, and G. B. Benedek, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12277-12282.
- [104] R. Sabaté, M. Gallardo, and J. Estelrich, (2005) *Int. J. Biol. Macromol.* 35, 9-13.
- [105] V. N. Uversky, J. Li, and A. L. Fink, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 10737-10744.
- [106] P. W. Vaughan, (1968) *J. Sound Vibration* 7, 236-246.
- [107] A. Eller, and H. G. Flynn, (1969) *J. Acoust. Soc. Am.* 46, 722-727.
- [108] K. S. Suslick, D. A. Hammerton, and R. E. Cline, Jr. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5641-5642.
- [109] S. Koda, T. Kimura, T. Kondo, and H. Mitome, (2003) *Ultrason. Sonochem.* 10, 149-156.
- [110] R. W. Woody, (1995) *Methods in Enzymol.* 246, 34-71.
- [111] E. A. Nappiras, (1980) *Phys. Rep.* 61, 159-251.
- [112] J. Frohly, S. Labouret, C. Bruneel, I. I. Looten-Baquet, and R. Torquet, (2000) *J. Acoust. Soc. Am.* 108, 2012-2020.
- [113] M. Nybo, S.-E. Svehag, and E. H. Nielsen, (1999) *Scand. J. Immunol.* 49, 219-223.
- [114] C. Goldsbury, P. Frey, V. Olivieri, U. Aebi, and S. A. Müller, (2005) *J. Mol. Biol.* 352, 282-298.
- [115] F. Burdin, N. A. Tsochatzidis, P. Guiraud, A. M. Wilhelm, and H. Delmas, (1999)

Ultrason. Sonochem. 6, 43-51.

- [116] L. Jean, C. F. Lee, and D. J. Vaux, (2012) *Biophys. J.* 102, 1154-1162.
- [117] J. B. Keller, and M. Miksis, (1980) *J. Acoust. Soc. Am.* 68, 628-633.
- [118] K. Yasui, (1997) *Phys. Rev. E* 56, 6750-6760.
- [119] H.-Y. Kwak, and J. H. Na, (1996) *Phys. Rev. Lett.* 77, 4454-4457.
- [120] L. Rayleigh, (1917) *Phil. Mag.* 34, 94-98.
- [121] M. S. Plesset, (1949) *ASME J. Appl. Mech.* 16, 228-231.
- [122] W. Wang, and C. J. Roberts, (2003) *AAPS J.* 15, 840-851.
- [123] N. Norlin, M. Hellberg, A. Fillippov, A. A. Sousa, G. Gröbner, R. D. Leapman, N. Almqvist, and O. N. Antzutkin, (2012) *J. Struct. Biol.* 180, 174-89.
- [124] C. Barucker, H. J. Bittner, P. K.-Y. Chang, S. Cameron, M. A. Hancock, F. Liebsch, S. Hossain, A. Harmeier, H. Shaw, F. M. Charron, M. Gensler, P. Dembny, W. Zhuang, D. Schmitz, J. P. Rabe, Y. Rao, R. Lurz, P. W. Hildebrand, R. A. McKinney, and G. Multhaup, (2015) *Sci. Rep.* 5, 15410.
- [125] E. S.-H. Chang, T.-Y. Liao, T.-S. Lim, W. Fann, W, and R. P.-Y. Chen, (2009) *J. Mol. Biol.* 385, 1257-1265.
- [126] J. W. Wu, L. Breydo, J. M. Isas, J. Lee, Y. G. Kuznetsov, R. Langen, and C. G. Glabe, (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 6071-6079.
- [127] R. Kayed, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, and C. G. Glabe, (2003) *Science* 300, 486-489.
- [128] R. Kayed, E. Head, F. Sarsoza, T. Saing, C. W. Cotman, M. Necula, L. Margol, J. Wu, L. Breydo, J. L. Thompson, S. Rasool, T. Gurlo, P. Butler, and C. G. Glabe, (2007) *Mol. Neurodegeneration* 2, 18.
- [129] K. Nakajima, H. Ogi, K. Adachi, K. Noi, M. Hirao, H. Yagi, and Y. Goto, (2016) *Sci. Rep.* 6, 22015.
- [130] H. Ogi, K. Motohisa, K. Hatanaka, T. Ohmori, M. Hirao, and M. Nishiyama, (2007) *Biosens. Bioelectron.* 22, 3238-3242.
- [131] H. Ogi, H. Nagai, Y. Fukunishi, T. Yanagida, M. Hirao, and M. Nishiyama, (2010) *Anal. Chem.* 82, 3957-3962.
- [132] G. Sauerbrey, (1959) *Z. Phys.* 155, 206-222.
- [133] R. Bechmann, A. D. Ballato, and T. J. Lukaszek, (1962) *Proceedings of the IRE* 79, 1812.
- [134] H. Muramatsu, J. M. Dicks, E. Tamiya, and I. Karube, (1987) *Anal. Chem.* 59, 2760-2763.
- [135] T. Vaisid, S. Barnoy, and N. S. Kosower, (2008) *Neurosci.* 156, 921-931.
- [136] J. C. Diaz, O. Simakova, K. A. Jacobson, N. Arispe, and H. B. Pollard, (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 3348-3353.

- [137] P. Picone, R. Carrotta, G. Montana, M. R. Nobile, P. L. S. Biagio, and M. D. Carlo, (2009) *Biophys. J.* 96, 4200-4211.
- [138] A. Zammer, S. Kasturirangan, S. Emadi, S. V. Nimmagadda, and M. R. Sierks, (2008) *J. Mol. Biol.* 384, 917-928.
- [139] M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, T. Sato, S. Ahuja, S. Aimoto, J. I. Elliott, W. E. V. Nostrand, and O. S. Smith, (2010) *Nat. Struct. and Mol. Biol.* 17, 561-567.
- [140] R. R. Romito-DiGiacomo, H. Menegay, S. A. Cicero, and K. Herrup, (2007) *J. Neurosci.* 27, 8496-8504.
- [141] J. S. Cheng, D. B. Dubal, D. H. Kim, J. Legleiter, I. H. Cheng, G. Q. Yu, I. Teseur, T. Wyss-Coray, P. Bonaldo, and L. Mucke, (2009) *Nat. Neurosci.* 12, 119-121.
- [142] K. Nakajima, D. Nishioka, M. Hirao, M. So, Y. Goto, and H. Ogi, (2017) *Ultrason. Sonochem.* 36, 206-211.

謝辞

この研究は，様々な方の手厚い協力のもと成り立っており，ご協力いただいた方に心から感謝しております．本研究室の平尾雅彦教授をはじめ，荻博次准教授，中村暢伴助教，長久保白特任助教，事務補佐員の戸田牧子さんに感謝いたします．

また，本研究を進めるにあたり，多くのご指摘や手助けをしていただきました大阪大学蛋白質研究所の後藤祐児教授，ならびに宗正智助教，鳥取大学工学部附属 GSC センター八木寿梓助教に感謝いたします．

本研究に置きまして凝集体の細胞毒性試験に協力していただきました，東京工業大学の田川陽一准教授およびに修士 2 年高橋和雅さんに感謝します．

本論文の副査を担当していただき，この論文を慎重に査読してくださった大阪大学基礎工学研究科の和田成生教授，ならびに，出口真次教授に感謝いたします．

そして，本研究室でこの研究に携わってくれました，野井健太郎さん，上杉研太郎さん，足立寛太君，西岡大介君に感謝します．

最後に，今日まで僕の学業を温かく見守ってくれました両親と両祖父母に感謝いたします．

発表論文目録

学術論文・解説記事

- (1) K. Nakajima, H. Ogi, K. Adachi, K. Noi, M. Hirao, H. Yagi, and Y. Goto, (2016) "Nucleus factory on cavitation bubble for amyloid β fibril" Sci. Rep. 6, 22015.
- (2) K. Nakajima, D. Nishioka, M. Hirao, M. So, Y. Goto, and H. Ogi, (2017) "Drastic acceleration of fibrillation of insulin by transient cavitation bubble" Ultrason. Sonochem. 36, 206-211.
- (3) 中島吉太郎, 足立寛太, 荻博次, 平尾雅彦, 後藤祐児, (2015) "超音波による A β ペプチドの凝集加速" 超音波テクノ 2015 年 5-6 月号

学会論文

- (1) K. Nakajima, K. Noi, H. Ogi, H. Yagi, Y. Goto, and M. Hirao "Systematic study on ultrasonically accelerated aggregation phenomenon of amyloid β peptides" 2014 IEEE international ultrasonic symposium (平成 26 年 9 月 3 日, Chicago)
- (2) K. Nakajima, H. Ogi, M. Hirao, and Y. Goto "The nucleus factory on bubble for amyloid β peptide" Protein structure and function (平成 27 年 11 月 4 日, Joint symposium between IPR and RSC at Canberra)
- (3) 中島吉太郎, 荻博次, 平尾雅彦, 後藤祐児"超音波キャビテーションにより誘発されるアミロイド β ペプチドの凝集核生成に関する研究" 日本機械学会 第 28 回バイオエンジニアリング講演会 (平成 28 年 1 月 9 日, 東京)