高速液体クロマトグラフィーを用いたアミロイド線維の分離分析法の確立

日大生産工(院) 〇長嶋 恭介 日大生産工 朝本 紘充 中釜 達朗 齊藤 和憲 南澤 宏明

1 まえがき

超高齢化社会を迎えた我が国において,アルツ ハイマー病をはじめとした認知症患者の増加は 深刻な社会問題であり,早期の治療を実現するた めにも簡易的かつ正確な診断法の確立が急務で ある. アルツハイマー病は、アミロイドBタンパ ク質 (Amyloid β protein, Aβ) が形成する繊維状の 凝集体(アミロイド線維)が老人斑を形成し、こ れが神経細胞死を引き起こすことで発症すると 考えられている.また,最近ではADDL¹⁾やアミ ロスフェロイド²⁾などの球状凝集体, Annulus³⁾ と呼ばれるpore状凝集体をはじめとした低分子 量オリゴマーが強いシナプス障害作用を示し,発 症に至ることが報告されている. そこで、ABの 凝集機構の解明および病態把握のために,上述の サイズの異なるAβ凝集体を網羅的に定量出来る 分析法が必要とされている.

現在, *in vitro*の実験系では, アミロイド線維の 特徴的な分子構造である積層した β シート(クロ ス β)構造部分と特異的に結合するチオフラビン T (Thioflavin T, Th T (Fig. 1))を蛍光プローブ として用い, 蛍光分光光度計によって分析する方 法が汎用されている⁴⁾.しかし,分離場を設けた 例はほとんどなく, 会合体の総量を測定するにと どまっている.サイズ別分離を可能にするために は, 最適な分離場を組み合わせた新たな方法を確 立する必要がある.

高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)は簡便 かつ高精度にタンパク質を分析できる代表的な 方法であり,通常,サイズ排除や逆相クロマトグ ラフィーのカラムと併用される.しかし,疎水性 相互作用や水素結合などの分子間力が構造体を



Fig. 1 Structure of Thioflavin T

維持しているアミロイド線維を分析する場合,高 E条件下となるHPLCにおいてはカラム内で会合 体の圧力解離が引き起こされる可能性がある⁵. そこで我々は,ポリテトラフルオロエチレン (Poly Tetra Fluoro Ethylene, PTFE)チューブを中 空カラムとして用いることで圧力を最小限に抑 えた蛍光HPLCシステムを構築し,アミロイド線 維分析への適用可能性について検証を行った.

2 実験方法

Fig. 2にPTFEチューブを中空カラムとして利 用したHPLCシステムを示した.移動相Aには0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0)を用い,分離のための 最適な流速について検討した.また,アミロイド 線維の標識化試薬として50 µM Th Tを含む25 mMリン酸水素二ナトリウム溶液を移動相Bとし て用いた.この際,注入した試料がPTFEチュー ブでの分離後に移動相Bと合流し,励起,検出波 長をそれぞれ435 nm,485 nmに設定した蛍光検出 器で検出されるように流路を構築した.アミロイ ド線維は,ニワトリ卵白由来リゾチーム(Hen Egg White Lysozyme, HEWL)を希塩酸 (pH 2.0)で調 製した1.0 mM HEWL溶液を55 ℃で6日間インキ ュベートすることで作製した.

3 実験結果および考察

Fig. 3にポンプAの流速を1.0 mL min⁻¹から0.5, 0.10, 0.05および0.025 mL min⁻¹と段階的に引き下 げた場合のクロマトグラム変化を示す. その結果, 0.05 mL min⁻¹において良好に分離した5本以上の ピークを示すクロマトグラムが得られた. なお, 流速0.025 mL min⁻¹ではポンプAの脈流がノイズ として現れ, ピークの消失が確認された. これよ り,分離におけるポンプAの最適な流速は0.05 mL min⁻¹に決定した. 本法による分離は,凝集体の PTFE表面への親和性, すなわち疎水性の差異に 基づく分離が行われたと考えられる⁶⁰. また,凝 集体の疎水性の度合いは細胞毒性の高さに相関 がある⁷⁰ ことから,本法は伸長段階の異なるアミ ロイド線維の細胞毒性の評価および創薬分子の スクリーニング探索にも有効である.

Development of an Analytical Method for Separation of Amyloid Fibrils Utilizing High Performance Liquid Chromatography

Kyosuke NAGASHIMA, Hiromichi ASAMOTO, Tatsuro NAKAGAMA, Kazunori SAITOH and Hiroaki MINAMISAWA



0.1 M Phosphate Buffer Solution (pH 7.0) 50μ M ThT / 25 mM Disodium phosphate solution

Fig. 2 Flow diagram of the HPLC system with post-column fluorescence labeling

また、アミロイド線維の形態や伸長度の変化の 定量的なモニタリングを行うために、上記の最適 流速(0.05 mL min⁻¹)でアミロイド線維形成のイ ンキュベート時間ごとのHEWL溶液のクロマト グラムを測定した(Fig. 4).その結果、インキ ュベート8日目から10日目にかけてピーク数の減 少とともに強度の増大が確認された、異なる形態 のアミロイド線維が競争的に成長する条件では、







Fig. 4 Chromatograms of 1 mM HEWL solutions incubated for various times at $55 \ ^{\circ}C$

最終的にその環境に適した形態が伝播されて伸 長し続けることが明らかとなっている⁸⁾.今回確 認されたクロマトグラム変化はこの成熟の過程 を反映している可能性があり、本法がアミロイド 線維形成の定量的なモニタリングに応用できる 可能性を示している.講演時には、実際にアルツ ハイマー病の原因となるAβの形成するアミロイ ド線維の分析結果についても併せて報告する.

4 参考文献

[1] Klein WL., et al., "Synaptic targeting by $A\beta$ oligomers(ADDLs) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease", *J. Alzheimer's association*, Vol. 2, issue 1,(2006), pp. 43-55

[2] M. Hoshi, et al., "Na, K-ATPase α 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 112, Issue 32, (2015), pp. E4465-E4474

[3] D. Hartley, et al., "Neurodegenerative disease: Amyloid pores from pathogenic mutations", *Nature*, Vol. 418, Issue 6895, (2002), p. 291

[4] R, Khurana, et al., "Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils", *J. Struct. Biol.*, Vol. 151, Issue 3, (2005), pp. 229-238

[5] L. S. Jerson, et al., "Dissociation of amyloid fibrils of α -synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 100, Issue 17, (2003), pp. 9831-9836

[6] 朝本 紘充 他, "PTFEチューブを分離場とす るアミロイド線維の分離分析", 分析化学, 66 巻, 2 号, (2017), 88-94 頁

[7] Y. Oma, et al., "Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids", *Biochimica et Biophysica Acta.*, Vol. 1748, Issue 2, (2005), pp. 174-179

[8] K. Yamaguchi, et al., "Seeding-dependent propagation and maturation of amyloid fibril conformation", *J. Mol. Biol.*, Vol. 352, Issue 4, (2005), pp. 952-960