高速液体クロマトグラフィーを用いたアミロイドβ凝集体の分別測定

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

アルツハイマー病を引き起こす原因物質 とされるアミロイドβタンパク質(AB)は、 繊維状構造のアミロイド線維をはじめとし た様々なサイズ, 形態の凝集体を形成する. また、ある種の凝集体は通説とは異なるメ カニズムにより認知機能の低下をもたらす ことが明らかになっておりり、病態把握お よび早期の治療のためにも、 簡便にサイズ 別かつ形態別に分離検出可能な手法の確立 が必要とされている. 通常、タンパク質を 分離定量するためにはサイズ排除カラムを 備えた HPLC などが汎用されているが、高 圧条件下で解離するアミロイド線維の場合 2), カラム内で分解する可能性がある. そ こで我々は、タンパク質凝集体の分離を可 能にする新規分離場として中空のポリテト ラフルオロエチレン (PTFE) チューブを用 いた手法を構築した3).

一般に、断面積が一定の円管内における ニュートン流体の定常流れの場合、低レイ ノルズ数領域では回転放物面の流速分布を

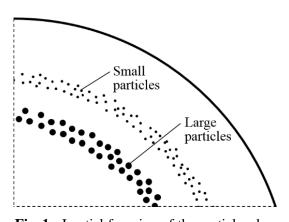


Fig. 1 Inertial focusing of the particles due to tubular pinch effect

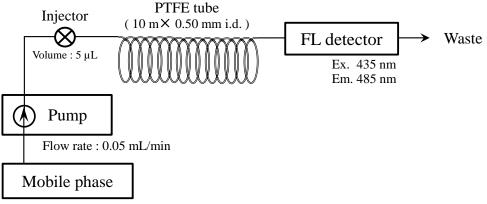
持つ層流となる. このような管内の流体中 におかれた粒子は Magnus 効果により管の 中心方向に向かって移動するが、 層流条件 下では Magnus 効果と逆向きの力が働くた め、粒子はその粒径に応じた釣り合いの位 置に停滞し、流れの中で年輪状の高濃度環 を形成する (Fig. 1). この現象は Tubular Pinch 効果 4)と呼ばれ、粒径の増加に伴い その分布が管の中心方向へ移行することか ら, 粒径に応じて溶出時間が変化すること が予想される. 一方で PTFE の表面は疎水 性であることが知られており, 疎水性有機 化合物の吸着が問題となることがある 5. そのため、Tubular Pinch 効果が働かない低 分子化合物には、管の内壁を固定相とした 分配作用が働くことが期待される. 我々は, Tubular Pinch による分級作用と内壁との分 配作用の両方を兼ね備えた中空カラムとし て PTFE チューブを用い、タンパク質凝集 体の分離分析への利用を試みた.

2 実験方法

Fig. 2 に HPLC システムの流路図を示す. アミロイド線維の分離場として PTFE チューブ ($10 \text{ m} \times 0.5 \text{ mm i.d.}$), および検出試薬としてチオフラビン T (Th T) を用いた. 移動相は 25 mM リン酸水素二ナトリウム溶液を用いて調製した 50 μ M Th T 溶液とし、 0.05 mL min^{-1} で送液した. 検出は励起, 蛍光波長をそれぞれ 435 nm および 485 nm に設定した蛍光検出器を用いた. 試料はAmyloid β protein fragment 1-42 をリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、37 °C で 20 時間インキュベートすることで凝集体を形成させたものを用いた.

Separation Analysis of Amyloid β Aggregates Utilizing High Performance Liquid Chromatography

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



 $50 \mu M$ Th T /25 mM Disodium phosphate solution

Fig. 2 Flow diagram of the HPLC system

3 結果および考察の

Fig. 3 に $A\beta$ 凝集体のクロマトグラムを示す. 溶出時間が 22-26 および 41 min 付近にそれぞれアミロイド線維由来と思われるピーグが確認された. 前者はカラムのボイド体積以下の領域で検出されている. これは粒子レベルにまで凝集が進行したアミロイド線維が Tubular Pinch 効果により平均流速よりも速い位置に集中して溶出した結果と推察できる. 一方,後者はボイド体積から十分に離れて溶出している. これは比較的小さな凝集体が内壁との疎水性相互作用により保持されたためである. また,本手法におけるカラム背圧は $0.1 \sim 0.2$ MPa であり,ほぼ常圧という条件下での分離分析が可能であった.

講演では詳細な測定条件と併せ、本法で 検証した Aβ の凝集に及ぼす金属イオンの 影響や、試料成分の粒径と溶出時間との相 関などについても報告する.

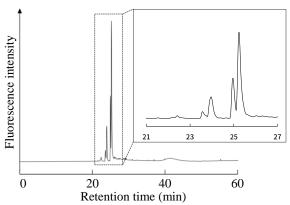


Fig. 3 Chromatogram of amyloid β solutions incubated for 20 hours at 37 °C

4 参考文献

- [1] M. Hoshi, et al., "Na, K-ATPase α3 is a death target of Alzheimer patient amyloid-β assembly", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. **112**, Issue 32, (2015), pp. E4465-E4474
- [2] 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**, No. 17, (2003), pp. 9831-9836
- [3] 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
- [4] G. Segré and A. Silberberg, "Radial particle displacements in poiseuille flow of suspensions", *Nature*, Vol. **189**, No. 4760, (1961), pp. 209-210
- [5] Z. Fang, et al., "Determination of cadmium in biological materials by flame atomic absorption spectrometry with flow-injection on-line sorption preconcentration", *Talanta*, Vol. **41**, Issue 12, (1994), pp. 2165-2172
- [6] 新井平伊 監修, 朝本紘充 他 84 名著, アルツハイマー病 - 発症メカニズム と新規診断法・創薬・治療開発-, NTS 出版, (2018), 65-72 頁