

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新規検出法の確立

日大生産工(院) ○須々木 尚子 日大生産工 朝本 紘充 南澤 宏明
高橋 大輔 和泉 剛

【緒言】

アルツハイマー病に代表されるアミロイドーシスは、生体内において特定のタンパク質により形成されたアミロイド線維と呼ばれる規則的な線維状構造体が、神経細胞などに沈着することで発症する疾患群である。このアミロイド線維の形成には、疎水的相互作用や水素結合、温度、塩濃度、pHなどの環境因子や、脂質などの生体内因子が深く関わっている¹⁾。現在、アルツハイマー病の診断は画像診断の他、髄液中に流出したアミロイド線維の検出および定量により行われている。近年これに代わる方法として、血液中に含まれる微量のアミロイド線維について抗原抗体反応を利用した検出法が研究されている²⁾。しかし、抗体には優れた特性がある反面、医薬として応用するにあたり生産コストの増加や操作の煩雑さなど、課題も多く存在する。そこで本研究ではこうしたアミロイド線維を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分離・検出するためのメソッド開発を行う。本実験では、アミロイド線維が β -シート構造を多く含む重合体であることから、nativeタンパク質との区別が出来ると考え、これを用いたアミロイド線維の新規検出法を検討した。

【実験】

試薬

試料タンパク質として鶏卵白由来の lysozyme (lyz)，金属塩として塩化カリウム (LiCl) および塩化カルシウム (CaCl₂) を用いた。溶媒として希塩酸 (pH 2.0) を用いた。また、アミロイド線維の検出試薬として Thioflavine T (Th T) を用いた。

アミロイド線維の形成³⁾⁴⁾

金属塩水溶液を加えた 90 % (v/v) メタノール溶液、希塩酸にそれぞれ lysozyme 水溶液を添加し、1 mM lysozyme 溶液を調製した。これを試料として、調製直後より 60 °C でインキュベートした。

アミロイド線維の検出

1) バッチ法による検出

10 mM 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 2) に Th T を溶解させ、50 μ M Th T 溶液を調製した。これを一定時間インキュベートした試料と混合し攪拌した後、蛍光分光光度計を用いて蛍光強度の測定を行った。なお、励起波長は 450 nm、検出波長は 485 nm とした。

2) HPLC による検出

蛍光検出器およびタンパク質分析用カラム (INTACT WXR (250 x 4.6 mm i.d.)) を用いて、生成したアミロイド線維の検出を行った。移

Development of a Novel Detection Method of Amyloid Fibrils using High Performance Liquid Chromatography

Naoko SUSUKI, Hiromichi ASAMOTO, Hiroaki MINAMISAWA,
Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

動相としてA液に純水/トリフルオロ酢酸 (TFA)(100/0.1, v/v), B液にアセトニトリル /TFA(100/0.1, v/v)を用いて, グラジエント溶離(0 min:B液30%, 50 min:B液65%)により目的物を溶出させた. 励起および測定波長は, バッチ法と同じ条件とした. 試料は任意の濃度に希釈した後, バッチ法で用いた50 μ M Th T 溶液に添加した. 注入試料体積は10 μ lとした.

【結果および考察】

Fig. 1-2に, バッチ法で測定した蛍光強度の変化を示す. CaCl_2 を添加したメタノール溶媒の試料について, 実験開始より5日で蛍光強度が一定になることが確認された (Fig. 1). 一方, 塩酸を溶媒とした試料では, インキュベート開始より6日以降, 蛍光強度が急速に増加したことが示された(Fig. 2). アミロイド線維の形成は, 核形成反応および伸長反応の二段階からなるとされている⁵⁾. これよりFig. 2で確認された蛍光強度の変化は, 6日の時点でアミロイド線維の核が形成されたためであると考えられる. また, メタノール溶媒および塩酸溶媒中では, それぞれ形成するアミロイド線維の形状が異なることが報告されている.

HPLC測定においては, Th Tとlyzのピークがそれぞれ単独で検出され, 結合による蛍光強度の増加を確認できなかった. Th TはpHによって蛍光強度および会合の状態が異なる. 今回の測定では, 移動相にTFAを添加したことによる溶液pHの低下が影響していると考えられる. 本講演では, 塩基性の移動相を用いたHPLC測定並びにゲルろ過クロマトグラフィーカラムを用いたアミロイド線維の分離・検出法の開発状況についても併せて報告する.

【参考文献】

- 1) 李映昊ら, 生化学 (2009) 81, p8.
- 2) Fukumoto H, et al., *Neuroreport*, (1999) 10, p.2965.

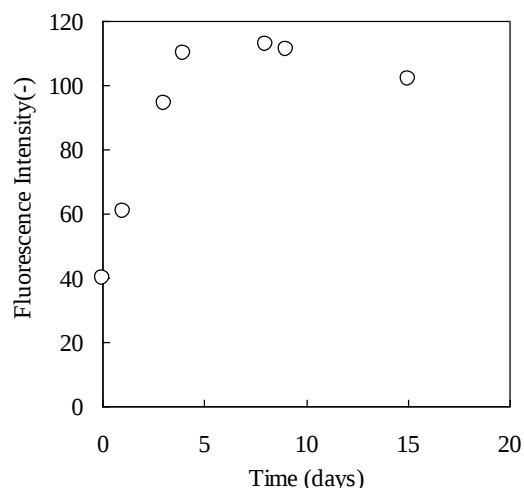


Fig. 1. Fluorescence emission of Th T in the presence of lyz in methanol solution containing CaCl_2 .

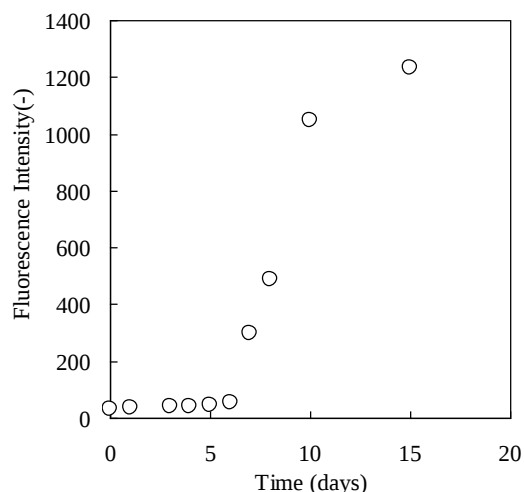


Fig. 2. Fluorescence emission of Th T in the presence of lyz in HCl solution.

- 3) 朝本紘充, 平成17年度修士論文 (2005) p. 48-63.
- 4) Krabs M.R.H, et al., *J. Mol. Biol.* (2000) 300, p. 541-549.
- 5) Dobson C.M., *Nature* (2003) 426, p. 884-890.