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B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い,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 m×0.5 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



Fig. 2 Flow diagram of the HPLC system

結果および考察の 3 **Fig. 3** に AB 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0.1~0.2 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.



incubated for 20 hours at 37 °C

4 参考文献

- 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 waterexcluded 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 flowinjection 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