

中空カラムを備えた高速液体クロマトグラフィーによるタンパク質凝集体の分離分析

日大生産工(院) ○光永パウロ まさゆき

日大生産工 齊藤 和憲, 南澤 宏明, 中釜 達朗, 朝本 紘充

1. 緒言

神経変性疾患の一種であるアルツハイマー病(AD)は、脳内のアミロイド β (A β)タンパク質の凝集体が神経細胞に蓄積することで発症する¹⁾。当該疾患の詳細な病理機構を解明するためには病状の進行に伴い発現量が変化する、会合度が異なる凝集体の種類と量を網羅的かつ高精度に解析出来る分析法が必要である。これまで本研究室では、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用してアミロイド線維の分離・検出について検討を重ねた結果、分離場をポリテトラフルオロエチレン(PTFE)チューブ、検出試薬としては蛍光色素のチオフラビンT(ThT)を用いることでアミロイド線維をほぼ損壊することなく分離・検出することに成功している^{2,3)}。

一般に、断面積が一定の円管内における低レイノルズ数領域では回転放物面の流速分布を持つ層流となる。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法に向かって移動する。層流条件下では

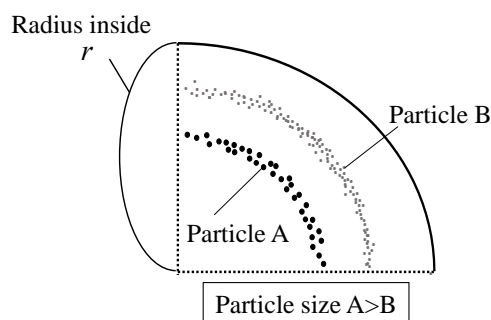


図1. Tubular pinch 効果による粒径の異なる粒子の分布

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(図1)。この現象は Tubular pinch 効果と呼ばれ、半径の増加に伴いその分布が管の中心方向へ移行する⁴⁾。すなわち、粒子の半径に応じて溶出時間が変化する可能性がある。

本研究では、樹脂チューブの内径や流速、さらには素材の違いが再現性並びに分離プロファイルに与える影響について検討した。さらに、得られたクロマトグラムのピーク画分について、フラクションコレクター(図2)を用いて精密に分取し、検出されたそれぞれのA β 凝集体の実際の会合度や分子量を明らかにすることで、本法の精度を詳細に検証する。

2. 実験

図3にHPLCシステムの流路図を示す(図3)。フラクションコレクターは、液体を一定体積あるいは一定時間ごとに分けて採取する自動装置である。



図2. フラクションコレクターCHF122SC (アドバンテック東洋株式会社)

Separation and Analysis of Protein Aggregates by High-performance
Liquid Chromatography with the Open Tubular Column.

Massayuki Paulo MITSUNAGA, Kazunori SAITOH, Hiroaki MINAMISAWA,
Tatsuro NAKAGAMA and Hiromichi ASAMOTO

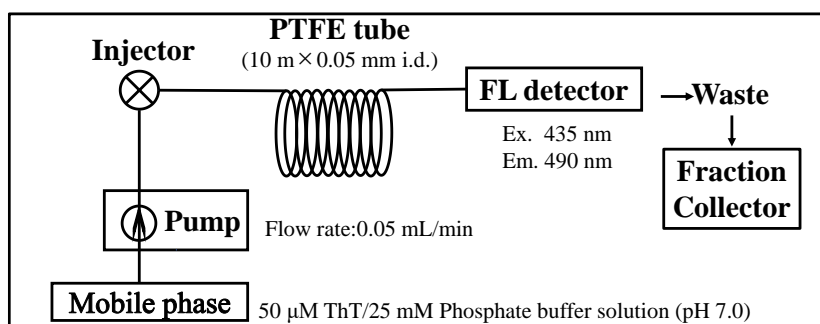


図 3. 本分析で用いた HPLC システムの流路図

アミロイド線維の分離場として各樹脂のチューブのサイズは長さ 10 m に統一した。今回は PTFE チューブとテトラフルオロエチレンエチレン共重合体 (ETFE) チューブを用いた。また PTFE の内径は 0.25, 0.33, 0.5 mm, ETFE の内径は 0.25 mm とした。試料は Amyloid β protein fragment 1-42 をリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、37°C で 20 時間インキュベートしたものをアミロイド線維の試料溶液として使用した。移動相には 0.1 M リン酸緩衝液溶液 (pH 7.0) で調製した 50 mM ThT を用い、0.01 mL/min から 0.05 mL/min で送液した。検出器には蛍光分光光度計を用い、励起波長は 435 nm、蛍光波長は 490 nm と設定した。フラクションコレクターにはアドバンテック東洋株式会社の CHF122SC を用いた。

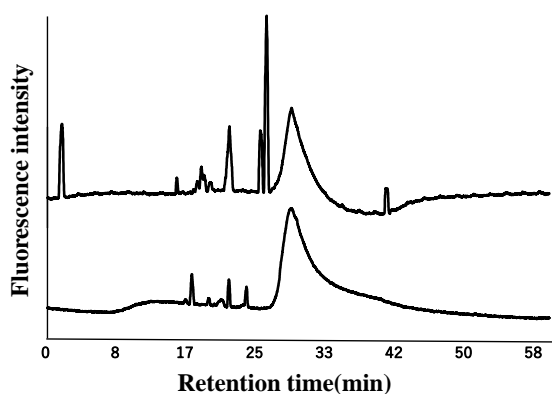


図 4. PTFE チューブを分離場として得られた A β 凝集体のクロマトグラム: 上部と下部は異なる測定日に得られたクロマトグラムを示す。

3. 結果と考察

先行研究で用いた PTFE チューブの内径を 0.50 mm から 0.33 mm に変更して測定した。その結果、良好な分離は達成したものの、再現性は向上しなかった。そこで、内径 0.25 mm の PTFE チューブに変更したところ、日内再現性と日間再現性が高くなった(図 4)。また同条件下でチューブの素材のみを ETFE に変更して検討したところ、シグナル強度が PTFE チューブより数十倍以上のピークが得られた。しかし、一部でピークの重複がみられた。これより、同条件下では PTFE チューブのほうが ETFE チューブより高い分離効率を示すことがわかった⁵⁾。そこで図 4 で得られたクロマトグラムの測定条件 (PTFE チューブ) においてフラクションコレクターを用いて各ピーク画分の自動分取を試みた。本講演では自動分取のために各種条件設定と合わせて分子量測定の方法についても報告する。

参考文献

- 1) 服部尚樹, 北川香織, 中山靖久, 稲垣千代子, 日薬理誌 (*Folia Pharmacol.jpn*) **131**, (2008) 326.
- 2) 朝本紘充, 長嶋恭介, 中釜達朗 他, 分析化学 (*BUNSEKI KAGAKU*), **66**, (2017) 89.
- 3) 朝本, 中釜, 齊藤, 南澤, 日本分析化学会第 68 年会 (2019) .
- 4) 大垣一成, 小林宏司, 片山俊, 化学工学論文集, **16**, (1990) 6.
- 5) 光永, 齊藤, 南澤, 中釜, 朝本, 日本分析化学会第 72 年会 (2023) .