

## 高速液体クロマトグラフィーによるアミロイド線維の分離分析

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 $\beta$ タンパク質(A $\beta$ )の凝集体が神経細胞に蓄積することで発症する<sup>1)</sup>。ADの進行状況を判断するためには発現量を網羅的に分析する方法が必要である。本研究室は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、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た<sup>2,3)</sup>。

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ことから、半径に応じて溶出時間が変化することが予想される<sup>4)</sup>。

キモトリプシンは酵素であり、特定のアミノ酸のC末端を加水分解するため、ペプチド結合を切断する。具体的には、トリプトファン、チロシン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニンなどのカルボキシル末端側でペプチド結合を選択的に切断する。

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を精密に分取し、検出されたそれぞれのA $\beta$ 凝集体の実際の会合度や分子量を明らかにすることで、本法の精度を検証する。

### 2. 実験

フラクションコレクター(図2)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3にHPLCシステムの流路図を示す。

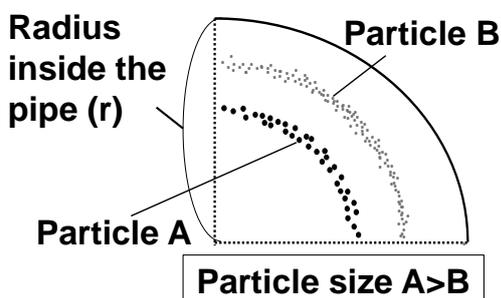


図1. Tubular pinch効果による円管内での粒径の異なる粒子の分布



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 Amyloid Fibrils by High-Performance Liquid Chromatography

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

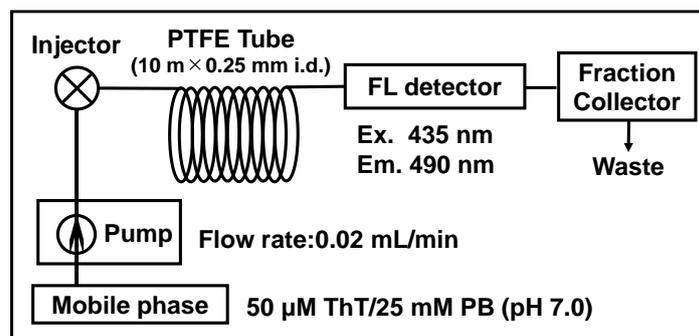


図 3. HPLC システムの流路図

試料は Aβ(1-42 残基)をリン酸緩衝液 (PB) (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 PB (pH 7.0)で調製した 50 mM ThT を用い, 流速は 0.02 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. また分離場には全長 10 m, 内径 0.25 mm PTFE を採用した<sup>5)</sup>. さらにクロマトグラム上のピークを分取するために, 本システムにフラクションコレクターを導入した.

会合度解析の予備検討のために, 凝集体への酵素による断片化処理を行い, これを逆相クロ

マトグラフィーで測定することで, 分離成分 (Aβ 凝集体) の重合度・分子量を解析する. 酵素はキモトリプシンを用いた. 移動相にはアセトニトリル/PB (3:97,v/v)にトリフルオロ酢酸 1%を添加し, 流速は 0.05 mL/min に設定した. 検出器には UV 検出器を用い, 波長を 215 nm と 254 nm と設定した. カラムには全長 150 mm, 内径 4.6 mm の ODS(C18)カラムを用いた.

### 3. 結果と考察

上記測定条件により Aβ 凝集体の良好な分離を示すクロマトグラムが得られた(図 4). そこでフラクションコレクターを用いてピーク画分を分取した. 予備検討では, 215 nm と 254 nm でそれぞれピークが得られた. 図 5 より酵素処理の時間が長くなるほどピーク強度が下がったのが確認できてキモトリプシンが Aβ 凝集体を加水分解したことが示唆された.

本講演では分取した Aβ 凝集体を会合度解析の結果についても説明する.

#### 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**, 326~332 (2008)
- 2) 朝本紘充, 長嶋恭介, 中釜達朗 他, 分析化学 (*BUNSEKI KAGAKU*), **66**, 89 (2017).
- 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**, 6 (1990)
- 5) 光永, 齊藤, 南澤, 中釜, 朝本, 日本分析化学会第 72 年会(2023)

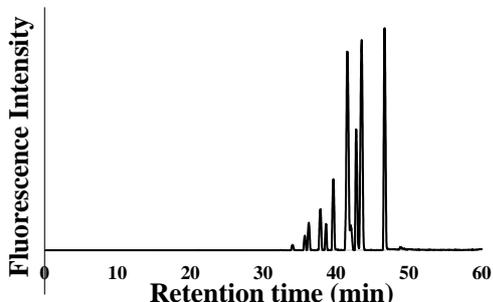


図 4. 分取時に得られた Aβ 凝集体のクロマトグラム

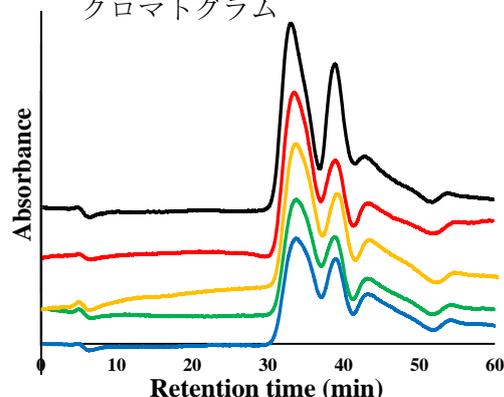


図 5. Aβ のクロマトグラム (254 nm) : 黒色は未処理, 赤色は酵素添加後 30 分, 橙色は 60 分, 緑色は 90 分, 青色は 120 分.