

HPLC を用いた円管内流れによるタンパク質凝集体の分離分析法

日大生産工(院) ○阿部 幸太郎

日大生産工 齊藤 和憲, 南澤 宏明, 中釜 達朗, 朝本 紘充

1. まえがき

近年, 日本は超高齢社会を迎え, アルツハイマー型認知症患者の割合が増加している¹⁾. 本疾患は脳内にアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) 凝集体が蓄積することで発症すると考えられており, 現状の診断法では高いコストと専門施設が必要である. これより, 体液中の $A\beta$ 凝集体を, サイズや量を正確かつ簡便に検出し, 濃度モニタリングする技術の確立が重要な研究課題となっている.

分析法の一つであり生化学分野で広く用いられている高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は分離場に充填剤入りカラムを用いて相互作用で分離する. しかし, 分子間力のみで構成される $A\beta$ 凝集体は損壊してしまうため定量的な分析が困難であった.

本研究室では, 非損壊的な分離を実現するため, 中空のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) チューブを分離場として用いるHPLC法を開発した. 本法により, $A\beta$ 凝集体を損壊させることなく分離と検出に成功している²⁾. しかし, 現状では, 実際に分離された $A\beta$ 凝集体の正確なサイズや量を確認するには至っていない.

そこで本研究では, 開発した $A\beta$ 凝集体分析法の分離精度の評価を目的とする. 具体的には, 再現性向上の検討, 分離検出されたタンパク質凝集体の会合度測定を試みた.

2. 原理

2.1 $A\beta$ 凝集体の分離分析法

本研究では, 分離場として従来のカラムではなく中空の円管を採用した. 具体的にはHPLC

用配管としても汎用されているPTFEチューブを用いた. 円管内を流れる流体が層流の場合, 粒子は進行方向に対して垂直方向に働くMagnus効果により管中央へと移動する. さらに, Tubular pinch効果によって逆向きの力が働き, 力が釣り合うことで, 粒子はサイズごとに高濃度環を形成する³⁾. こうした濃度分布に加え, 層流における流速分布が粒子の移動速度に差を生じさせ, サイズに応じた分離が可能になると期待できる. 本法の検出においては, アミロイド線維にある特有の β シート構造に選択的結合することで特徴的な蛍光特性を示すチオフラビンT (ThT) を使用した⁴⁾. ThT を移動相に添加し, $A\beta$ 凝集体に結合した際の特異的な波長に設定することで選択的かつ高感度に検出することが可能である.

2.2 酵素処理を利用した会合度測定

$A\beta$ 凝集体の会合度を間接的に評価するため, 特定の部位で切断が可能なキモトリプシン⁵⁾による酵素処理を行いペプチド断片化した. それをODSカラムによる逆相クロマトグラフィーを用いて分離し, 各フラグメントの大きさや組成の確認をした. さらに追加事項として, PTFEチューブを用いた分離挙動に対する分配の影響を検証するため, 疎水性の異なる安息香酸エステル類およびウラシルを試料として用い, それらの挙動の比較検証を行った.

2.3 モデルタンパク質の会合度測定

前項の実験において $A\beta$ 凝集体の濃度不足が懸念されたことから, 安価で多量の入手が可能なりゾチームを用いて検証を行った. リゾチームは $A\beta$ 凝集と同様, アミロイド線維を形成す

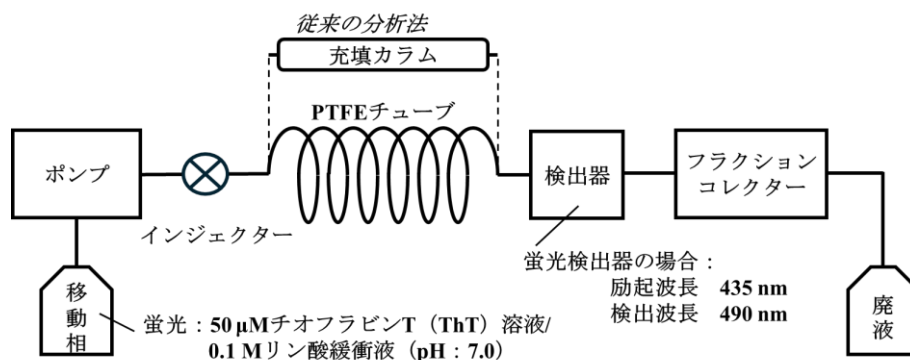


Fig. 1 $A\beta$ 凝集体の分離分析に用いる HPLC システムの概略図

Separation and Analysis of Protein Aggregates by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Utilizing Tubular Flow
Kotaro ABE, Kazunari SAITO, Hiroaki MINAMISAWA, Taturo NAKAGAMA and Hiromichi ASAMOTO

ることから比較系として利用できる。ここではまず、PTFEチューブを用いたHPLCシステムで分取されたピークがタンパク質成分であることを確認した。具体的には、分取したピーク成分をクーマシーブリリアントブルー (CBB) により染色したうえで、UV/vis検出による会合度測定を試みた。

3. 実験方法および測定方法

実験方法をFig.1に示す。

3.1 A β 凝集体の分離分析

Amyloid β Protein Fragment 1-42 を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、37°Cでインキュベートすることで調製した。50 μ M ThT溶液を移動相とした。蛍光検出器を備えたHPLCを用いてA β 凝集体の分離分析を行った。具体的には、ThTを含む移動相を 0.05 mL/min で送液し、分離場には内径 0.5 mmおよび0.25 mm、長さ 10 m の PTFE チューブを使用した。検出条件は励起波長 435 nm、蛍光波長 490 nmに設定した。

3.2 酵素処理および分配の影響の検証

キモトリプシンを0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し調製した。3.1と同様のA β 試料をフラクションコレクターで 5 分ごとに溶出液を分取した。次に、これらの試料溶液に添加し37°Cでインキュベートすることでペプチド断片化を試みた。この測定には、複数種の逆相クロマトグラフィー用カラムを分離場として使用し分離分析を行った。

チューブ内での分配の影響を評価するため、ウラシルおよび 4 種の安息香酸エステル類をそれぞれアセトニトリル水溶液に溶解して試料とした。移動相は、TFAを 0.1% 含むアセトニトリル溶液を移動相として用いた。分離場には内径 0.5 mm および 0.25 mm で長さ 10 m の PTFE チューブを用いた。また、長さ 50 mm の ODS カラムでも検証を行った。いずれの場合もHPLCシステムでUV/Vis 検出器を使用し、波長は 254 nm に設定した。

3.3 リゾチームの会合度測定

リゾチームを50% (v/v) アセトニトリル水溶液に溶解し、37°Cでインキュベートすることで調製した。移動相は、アセトニトリル水溶液を用いて調製した。再現性の検証のため初濃度のリゾチームを3回測定した。続けて、分取を時間ごとに30 sに1サンプル、合計40サンプルを採取しCBBで染色後、再度同方法で測定した。分離場には内径 0.25 mm で長さ 10 m の PTFE チューブを用いた。いずれもUV/vis検出器を使用し、測定波長は、254 nm、595 nmに設定した。

4. 実験結果および考察

チューブ内径を変更することで再現性の向上が見られた。フラクションコレクターで分取したA β 凝集体の酵素処理物についてUV/vis検出を試みたが、会合度を測定することはできなかった。これは、当該試料中に含まれるA β 凝集体由来の成分が検出下限以下であったためと考える。

一方、分配の違いを検証するために、疎水性の異なるウラシルと安息香酸エステル類を用いた中空カラムによる分離分析を行った。疎水性の性質が強まるほど保持時間は長くなった。

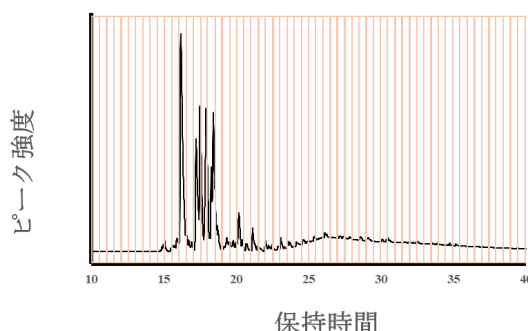


Fig.2 リゾチームの分取クロマトグラム

赤い線は分画した時間帯を示す。

この結果から、PTFEチューブ内でも疎水性相互作用が影響することが示唆される。

さらにリゾチームを用いたタンパク質凝集体の分取の結果、UV/vis検出器においてA β 凝集体のクロマトグラムと同様の再現性を確認した。分画し再度測定した際、波長を変更したが同様にピークを得ることができた。これより、UV/vis検出器でタンパク質を測定することができること、CBB染色よりタンパク質由来のピークであることが考えられる。

本報告では、これに加えて電気泳動法による定量的な測定の結果についても併せて報告する。

参考文献

- 1) 内閣府, 高齢化の現状と将来像|令和6年版高齢社会白書 (全体版)
- 2) H. Asamoto, K. Nagashima, T. Nakagama, K. Saitoh, H. Minamisawa, *SSS&T*, 5, 66-73 (2025)
- 3) 大垣 一成ほか, *化学工学論文集*, 16, 6, (1990) 1252-1255
- 4) M. Biancalana, S. Koide, *Biochim Biophys Acta.*, 1804, 7, 1405-1412 (2010)
- 5) キモトリプシンの酵素の特徴・機能・分類・調節, *生物化学*, 1, 6, 23-36 (2014)