年間特集「光」：ノート

PTFE チューブを分離場とするアミロイド線維の分離分析

朝本 紘充^{*1}, 長嶋 恭介², 中釜 達朗², 齊藤 和憲², 南澤 宏明¹

1 緒 言

アミロイド線維とは生体内において特定のタンパク質が形成する繊維状の凝集体を指し、これが神経細胞などに沈着することで発症する疾患のことをアミロイドーシスと呼ぶ¹⁾²⁾。アミロイドーシスの代表例としてはアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease, AD) やパーキンソン病が挙げられる。認知症の一つでもある AD を引き起こすタンパク質として知られるアミロイド β タンパク質 (Amyloid β protein, A β) は、特定の条件下において核形成反応と伸長反応の二段階の凝集過程より直接、あるいはプロト線維と呼ばれる状態を経てアミロイド線維を形成する³⁾⁴⁾。こうした A β の凝集過程の詳細はいまだ不明な点が多く、AD の根本的な治療法も確立されていない。凝集機構の解明にはアミロイド線維のみならず、その前駆体とされるプロト線維や A β オリゴマーを含めた各凝集体のサイズ別分離を可能にする検出法が必要である。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は簡便かつ高精度にタンパク質を分析できる代表的な方法であり、通常、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) や逆相クロマトグラフィー用のカラムと併用される⁵⁾⁶⁾。しかし、疎水性相互作用や水素結合などの分子間力が構造体を維持しているアミロイド線維⁷⁾を分析する場合、カラム内での充填剤との接触や強い相互作用により分解や損失が引き起こされる可能性がある。実際、こうした分子間結合性の凝集体を HPLC で分析した例はほとんど報告されていない。現在、*in vitro* の実験系では簡便かつ安価なアミロイド線維の検出法として、Fig. 1 に示したチオフラビン T (Thioflavin T, Th T) と蛍光分光光度計を用いた高感度な分析法が汎用されている^{8)~10)}。蛍光試薬である Th T は溶液中でアミロイド線維の特徴的な分子構造である積層した β シート構造部分と常温で速やかに分子間結合することで、その蛍光特性が変化することが知られている。実際、Th T とアミロイド線維の解離定数 (K_D) は構成タンパク質の種類で異なるがおおむ

ね数 μ M 以下と高い親和性を示す値である⁹⁾。また、結合した際の蛍光強度は pH 9 付近の強塩基性条件下で最も高くなる¹¹⁾。最近ではこうした Th T とマイクロプレートリーダーと組み合わせた、より高感度な検出法も報告されている¹²⁾。しかし、これらの検出法ではアミロイド線維と前駆体を含めた凝集体の総量を測定することしかできない。各凝集体のサイズ別の分離・検出を可能にするためには最適な分離場を組み合わせた新たな方法を確立する必要がある。

近年、充填剤を使用しないフューズドシリカキャピラリーを分離場として応用したキャピラリー電気泳動法により、凝集体を分解させることなく分離・検出した例がいくつか報告されている。Sabella らはダイオードアレイ検出器を備えたキャピラリー電気泳動装置を利用することで、アミロイド線維の前駆体と A β モノマーの分離・検出に成功した¹³⁾。ただし、同法は試料のフィルトレーションが必要なため最終生成物であるアミロイド線維は前処理の段階で除去されてしまう。一方、Kato らはレーザー励起蛍光検出器を備えたキャピラリー電気泳動装置と Th T を用いた A β のアミロイド線維の分析法を開発した¹⁴⁾。高感度かつ迅速な同法は、アミロイド線維と前駆体の分離・検出のみならず、A β の凝集を抑制する効果のある物質のスクリーニング探索をも可能にした。こうしたアミロイド線維の分離・検出が HPLC などのより汎用性の高い分析機器で可能になれば、形成機構の解明のみならず、創薬分子のスクリーニング探索への取り組みもさらに発展する可能性がある。

そこで著者らは HPLC と Th T を用いるアミロイド線維の新たな分離・検出法を開発した。通常、HPLC における分析対象物質の標識化法では前処理として標識化試薬と反応させた誘導体化物を調製し、分析に供する。しかし Th T の場合、分析対象物質であるアミロイド線維とは共有結合

Fig. 1 Structure of thioflavin T

* E-mail: asamoto.hiromichi@nihon-u.ac.jp

¹ 日本大学生産工学部教養・基礎科学系: 275-8576 千葉県習志野市新栄 2-11-1

² 日本大学生産工学部応用分子化学科: 275-8575 千葉県習志野市泉町 1-2-1

Fig. 2 Flow diagram of the HPLC system with post-column fluorescence labeling

による誘導体化合物を形成するのではなく、水素結合などの分子間力で結合するため、カラム内でそれらが分離される可能性が高い。また、先述のとおり通常の SEC や逆相クロマトグラフィー用カラムではアミロイド線維そのものが分解される可能性もある。

本研究では分離場として組み込んだポリテトラフルオロエチレン (Polytetrafluoroethylene, PTFE) チューブにアミロイド線維を注入し、溶出された順に蛍光検出器の直前で別流路から流れてくる Th T と反応させるポストカラム法を設計した (Fig. 2)。分離場に充填剤入りのカラムではなく、アミロイド線維との間に僅かな疎水性相互作用をもたらす PTFE チューブを用いることで、結果的にアミロイド線維を分解することなく分離・検出することが出来ると考えた。本稿では PTFE チューブを分離場とする蛍光ポストカラム HPLC 法のアミロイド線維分析への適用可能性について、アミロイド線維形成のモデルタンパク質として知られるニワトリ卵白リゾチーム (Hen egg white lysozyme, HEWL)^{15)~18)}を用いて検討した成果について報告する。

2 実験

2.1 試料及び試薬

タンパク質試料として Sigma-Aldrich 製の HEWL、溶媒として和光純薬工業製の塩酸 (特級) を純水で希釈した水溶液 (pH 2.0) を用いた。アミロイド線維検出試薬として和光純薬工業製の Th T、溶媒として和光純薬工業製のリン酸二水素ナトリウムを純水に溶解した水溶液を使用した。本実験における超純水はすべて Milli-Q 水を用いた。また、Fig. 2 に示した HPLC システムのポンプ A の移動相として和光純薬工業製の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0, 生化学用) を使用した。

2.2 アミロイド線維と検出試薬の調製

希塩酸 (pH 2.0) を用いて 1.0 mM HEWL 溶液を調製し、これを約 55 °C で 6 日間インキュベートした溶液をアミロ

イド線維の試料溶液として用いた。また、Fig. 2 のポンプ B に設置する移動相には 25 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液 (pH 約 9.0) を用いて調製した 50 μM Th T 溶液を用いた。

2.3 HPLC 及び測定条件

蛍光ポストカラム HPLC (Fig. 2) を構成する機器はすべて日本分光製のものを利用した。具体的にはポンプ A, B はいずれも PU-2089 Plus 型を使用し、ポンプ A には 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、B には 50 μM Th T/25 mM リン酸二水素ナトリウム溶液を設置し、流量はそれぞれ 0.05 mL min⁻¹ 及び 2.0 mL min⁻¹ に設定した。また Column Oven は CO-2065 Plus 型を使用し、カラム温度は 30 °C に設定した。カラム部分にはジーエルサイエンス製の PTFE チューブ (内径 0.5 mm) を使用し、長さは 5 m とした。蛍光検出器には FP-2025 型を用い、励起、蛍光波長はそれぞれ 435 nm 及び 485 nm に設定した。また、ポンプ A, B 及び蛍光検出器の流路をつなぐコネクターにはジーエルサイエンス製のピークタフティー (3 方, オリフィス径 0.5 mm) を用いた。

3 結果及び考察

3.1 蛍光ポストカラム HPLC 法によるアミロイド線維の検出

Wang らは Th T 溶液と蛍光分光光度計を用いた測定より、HEWL の塩酸酸性溶液をおよそ 55 °C で 3 日間以上インキュベートすることで、アミロイド線維の存在を示す 485 nm の蛍光強度が著しく増大することを確認している¹⁵⁾。本研究ではまず、Fig. 2 に示された蛍光ポストカラム HPLC 法でアミロイド線維が検出可能か判断するために、調製直後の HEWL 溶液と併せ、6 日間インキュベートした試料溶液のクロマトグラムを測定した。その結果、インキュベートした試料でのみ、アミロイド線維の存在を示す、高い蛍光強度のピークが得られた (Fig. 3 (a))。これ

Fig. 3 Effect of the pump A flow rate on the separation efficiency of the HPLC system

Conditions: sample, 1 mM HEWL solution incubated at 55°C for 6 days; injection volume, 5 μ L.

より, 従来の蛍光分光光度計を用いた方法と同様, 本法でも高感度なアミロイド線維の検出が可能であることがわかった。

3・2 最適分離条件の検討

前項の条件 (ポンプ A 流量: 1.0 mL min⁻¹) で得られた単一ピークを示すクロマトグラム (Fig. 3 (a)) より, 蛍光分光光度計を用いた従来法と同様, 試料溶液中に存在するアミロイド線維と前駆体を含めた凝集体の総量を本法でも確認できることがわかった。項目 1 でも述べたとおり, アミロイド線維の形成機構を解明するには総量の測定のみならず, 凝集体のサイズ別分離が必須である。そこで著者らは Fig. 2 のシステムにおけるポンプ A の流量を低下させ PTFE チューブ内面と凝集体との相互作用の度合いを増加させることで, Fig. 3 (a) の単一ピーク中に共存すると予想される各凝集体のサイズ別分離を試みた。具体的にはポンプ A の流量を 1.0 mL min⁻¹ から 0.5, 0.10, 0.05 及び 0.025 mL min⁻¹ と段階的に引き下げ, それぞれの条件下でのアミロイド試料溶液のクロマトグラムを測定した。その結果, 0.05 mL min⁻¹ において良好に分離した 5 本以上のピークを示すクロマトグラムが得られた (Fig. 3 (d))。なお, 流量 0.025 mL min⁻¹ ではポンプ A の脈流がノイズとして現れ, ピークの消失が確認された。これより, 分離におけるポンプ A の最適な流量は 0.05 mL min⁻¹ に決定した。なお, この条件下でポンプ B から Th T を含まない移動相 (25 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液) を送液しながら測定を行ったところ, アミロイド線維はもちろん, 構成要素で

Fig. 4 A chromatogram of an amyloid fibrils sample obtained with a HPLC system without Th T

Conditions: sample, 1 mM HEWL solution incubated for 8 days; injection volume, 5 μ L; mobile phase B (shown in Fig. 2), 25 mM disodium phosphate solution.

ある HEWL のピークも検出されなかった (Fig. 4)。これより, 本手法では従来法と同様, アミロイド線維が選択的に検出されることが確認できた。

これまでに報告されているキャピラリー電気泳動法によるアミロイド線維の分離分析ではフューズドシリカキャピラリーが使用され, 凝集体の表面電荷の差異に基づく分離が行われてきた¹³⁾¹⁴⁾。一方, 本法では凝集体の PTFE 表面への親和性, すなわち疎水性の差異に基づく分離が行われ, 結果的に検出されたピーク数は既報を大幅に上回る形となった。これより, 本法を用いることでより詳細に凝集過程を解析することができる可能性がある。さらに, モノマー及び凝集体の疎水性の度合いは細胞毒性の高さに相関がある¹⁹⁾²⁰⁾ことから, 本法は伸長段階の異なるアミロイド線維の細胞毒性の評価, 及びアミロイドーシスのための創薬分子のスクリーニング探索にも有用である。

ここではさらなる分解能の向上を目指し, PTFE チューブの内径の影響について検討した。通常, HPLC システムのポンプから検出器に至るまでの配管には試料の拡散等を防ぐために細い内径のチューブが用いられる。今回使用したポンプ (日本分光製 PU-2089 Plus 型) においても注入部から検出部までは内径 0.5 mm 以下のステンレスまたは PTFE チューブの使用が推奨されている。そこで今回は内径 0.5 mm または 0.25 mm の PTFE チューブ (5 m) をカラムとして使い, クロマトグラムを測定した (Fig. 5)。このとき, 感度向上のために蛍光検出器のゲインはこれまでの 10 倍の値に設定した。その結果, 内径 0.5 mm では良好に分離・検出されたピーク群 (Fig. 5 (a)) が内径 0.25 mm の場合には大幅に前方へ移動したとともに, ピーク数及び強度の著しい減少 (Fig. 5 (b)) が確認された。カラム内径の縮小は分解能や感度の向上, 及び省溶媒化などが期待できる反面, 試料の負荷量や流量の影響を受けやすく, 条件次第では大幅な理論段数の低下に繋がる場合がある。今回の結果もこうした現象を反映している可能性が高い。さら

Fig. 5 Effect of the internal diameter of a PTFE Tube column on the separation efficiency of the HPLC system

Conditions, sample: 1 mM HEWL solution incubated for 10 days; injection volume, 5 μ L; detector gain, 10.

に、内径 0.25 mm は通常、マイクロカラムに分類される値であり、その分解能の改善には試料の負荷量や流量を μ L から nL オーダーといった精度で調整する必要がある。簡便性も鑑み^{かんが}、以降の測定では内径 0.5 mm の PTFE チューブを分離場として用いた。

3.3 アミロイド線維伸長反応のモニタリング

アミロイド線維の形成について理解を深めるためには、その過程を定性的かつ定量的にモニタリングすることが重要である。最近では Th T と全反射蛍光顕微鏡を組み合わせた、アミロイド線維伸長反応をリアルタイムに可視化するための方法も開発され²¹⁾、形成機構の定性的な理解が進んでいる。アミロイド線維の形成は本質的に物質の結晶成長と同じ現象であり、核形成と伸長の二段階から成ることがわかっている。また、アミロイド線維の形態（多形）は形成反応の条件次第で異なること、さらに、こうした形態や伸長度（サイズ）の違いは細胞に対する毒性の強さに影響を及ぼす⁷⁾。著者らは PTFE チューブを分離場とした本法がアミロイド線維の形態や伸長度の変化の定量的なモニタリングに応用可能であると考えた。実際に Fig. 3 (d) で検出された多数のピークは本法の原理上、アミロイド線維表面の疎水性、すなわち形態または伸長度の違いを反映していると考えられる。そこで、上記の最適化された分析条件において、アミロイド線維形成の反応時間（インキュベーション時間）ごとの HEWL 溶液のクロマトグラムを測定した。その結果、インキュベーション 8 日目 (Fig. 6 (c)) から 10 日目 (Fig. 6 (d)) にかけてピーク数の減少とともに強度の増大が確認された。Yamaguchi らは異なる形態のアミロイド線維が競争的に成長する条件では、最終的にその環境に

Fig. 6 Chromatograms of 1 mM HEWL solutions (amyloid fibrils samples) incubated for various times at 55 °C

Conditions: injection volume, 5 μ L; detector gain, 10.

適した形態が伝播されて伸長し続ける現象を明らかとし、これをアミロイド線維の成熟と定義した²²⁾。今回確認された 10 日目にかけてのクロマトグラムの変化は、この成熟の過程を反映している可能性がある。なお、Fig. 6 (a) 及び (b) ではピークはほぼ検出されておらず、既報¹⁵⁾のとおり、インキュベーション時間が短い場合にはアミロイド線維形成がほとんど進行していないことがわかる。以上の結果は本法がアミロイド線維形成の定量的なモニタリングに応用できる可能性を示している。

4 結 言

簡便かつ高感度なアミロイド線維の分離分析法の確立を目指し、PTFE チューブを分離場とする蛍光ポストカラム HPLC システムを構築した。検出用試薬としてアミロイド線維と特異的に結合する蛍光試薬である Th T、並びに分離場として PTFE チューブを応用した本法により、それぞれ疎水性が異なるアミロイド線維の存在を示す 5 本以上のピークが HEWL 試料溶液中から検出された。これまで、HPLC でアミロイド線維とその前駆体を選択的に分離・検出できた例はほとんど報告されていない。汎用性が極めて高い装置でのアミロイド線維の分離分析を可能にした本法は、今後、アミロイドーシスの病態解析や創薬分子のスクリーニング探索への応用が期待できる。

文 献

- 1) G. Merlini, V. Bellotti : *N. Engl. J. Med.*, **349**, 583 (2003).
- 2) W. H. Binder, O. W. Smrzka : *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 7324 (2006).
- 3) D. M. Hartley, D. M. Walsh, C. P. Ye, T. Diehl, S.

- Vasquez, P. M. Vassilev, D. B. Teplow, D. J. Selkoe : *J. Neurosci.*, **19**, 8876 (1999).
- 4) Y. Hori, T. Hashimoto, Y. Wakutani, K. Urakami, K. Nakashima, M. M. Condron, S. Tsubuki, T. C. Saido, D. B. Teplow, T. Iwatsubo : *J. Biol. Chem.*, **282**, 4916 (2007).
- 5) P. Hong, S. Koza, E. S. P. Bouvier : *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **35**, 2923 (2012).
- 6) G. Mitulovic, K. Mechtler : *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, **5**, 249 (2006).
- 7) 李映昊, 小澤大作, 後藤祐児 : 生化学, **81**, 677 (2009).
- 8) R. Khurana, C. Coleman, C. I. Zanetti, S. A. Carter, V. Krishna, R. K. Grover, R. Roy, S. Singh : *J. Struct. Biol.*, **151**, 229 (2005).
- 9) M. Biancalana, S. Koide : *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 1405 (2010).
- 10) A. Chauhan, T. Pirttila, V. P. S. Chauhan, P. Mehta, H. M. Wisniewski : *J. Neurol. Sci.*, **154**, 159 (1998).
- 11) V. Fodera, M. Groenning, V. Vetri, F. Librizzi, S. Spagnolo, C. Cornett, L. Olsen, M. Weert, M. Leone : *J. Phys. Chem. B*, **112**, 15174 (2008).
- 12) H. LeVine III : *Methods Enzymol.*, **309**, 274 (1999).
- 13) S. Sabella, M. Quaglia, C. Lanni, M. Racchi, S. Govoni, G. Caccialanza, A. Calligaro, V. Bellotti, E. D. Lorenzi : *Electrophoresis*, **25**, 3186 (2004).
- 14) M. Kato, H. Kinoshita, M. Enokita, Y. Hori, T. Hashimoto, T. Iwatsubo, T. Toyo'oka : *Anal. Chem.*, **79**, 4887 (2007).
- 15) S. S. S. Wang, K. N. Liu, W. H. Lee : *Biophys. Chem.*, **144**, 78 (2009).
- 16) A. Cao, D. Hu, L. Lai : *Protein Sci.*, **13**, 319 (2004).
- 17) S. S. S. Wang, K. N. Liu, Y. C. Lu : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **381**, 639 (2009).
- 18) M. Holley, C. Eginton, D. Schaefer, L. R. Brown : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**, 164 (2008).
- 19) E. Frare, M. F. Mossuto, P. P. Laureto, S. Tolin, L. Menzer, M. Dumoulin, C. M. Dobson, A. Fontana : *J. Mol. Biol.*, **387**, 17 (2009).
- 20) Y. Oma, Y. Kino, N. Sasagawa, S. Ishiura : *Biochimica et Biophysica Acta*, **1748**, 174 (2005).
- 21) 後藤祐児 : 高分子, **58**, 92 (2009).
- 22) K. Yamaguchi, S. Takahashi, T. Kawai, H. Naiki, Y. Goto : *J. Mol. Biol.*, **352**, 952 (2005).
-

Separation Analysis of Amyloid Fibrils Utilizing a PTFE Tube as a Separation Field

Hiromichi ASAMOTO^{*1}, Kyosuke NAGASHIMA², Tatsuro NAKAGAMA²,
Kazunori SAITOH² and Hiroaki MINAMISAWA¹

^{*} E-mail : asamoto.hiromichi@nihon-u.ac.jp

¹ Department of Liberal Arts and Basic Science, College of Industrial Technology, Nihon University, 2-11-1, Shinnei, Narashino-shi, Chiba 275-8576

² Department of Applied Molecular Chemistry, College of Industrial Technology, Nihon University, 1-2-1, Izumicho, Narashino-shi, Chiba 275-8575

(Received September 23, 2016; Accepted November 18, 2016)

We developed an easy-to-use analytical method for amyloid fibrils by high-performance liquid chromatography (HPLC) with post column fluorescent labeling. Thioflavin T (Th T), which was used widely as a labeling agent for amyloid fibrils, is a traditional probe for the confirmation of amyloid fibril formation. Although the traditional fluorescence spectroscopy measurements are used for monitoring the aggregation reaction, they have no applicability to separation analysis of the amyloid fibrils. In order to understand the fibril formation process, the development of an efficient method that enables to separate and detect the amyloid fibrils is required. In this work, Th T labeling of amyloid fibrils in 1 mM hen egg white lysozyme (HEWL) solution was performed following separation of different-sized amyloid fibrils in a PTFE tube (5000×0.50 mm i.d.) as a separation field. The fluorescence was monitored at 485 nm, with the maximum excitation wavelength at 435 nm. The novel method's sensitivity for the detection of amyloid fibrils was high and compared well with the traditional fluorescence spectroscopy measurements. In addition, the developed method detected more than 5 peaks within 20 min under the optimum separation conditions. These results suggest that this analytical method is used to understand the amyloid fibril formation process.

Keywords: amyloid fibril; HPLC-fluorescence detection; PTFE tube.