

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410145

研究課題名(和文) 標的タンパク質凝集体分析システムの構築

研究課題名(英文) Construction of analytical systems in fibrillation of target protein

研究代表者

島崎 洋次 (Shimazaki, Yoji)

愛媛大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80284389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド (A) 単量体の凝集化はアルツハイマー病の発症との関連性が指摘されている。このA 単量体やその凝集体を分離分析する技術はこの病気の発見をするうえで重要と考えられる。本研究では、A 抗体を固定化した膜を用いて、A をヒト血漿に添加した試料から選択的に捕獲する方法を構築した。また、この方法が鼻腔などの微小空間内にあるA を捕獲するのに有効な技術であることや、捕獲したA 単量体をプロテアーゼ消化することにより、A の凝集化を抑制できることを見出した。さらに、この抗体膜技術と電気泳動技術の組み合わせにより、A 凝集体を添加した生体試料から凝集体を分離分析できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The fibrillation of an amyloid (A) monomer is related to the progression of Alzheimer's disease. For the examination of A and its fibrous form, a method of isolation and analysis in A and its fibrous form is important. In the present study, a method of A monomer isolation from human plasma with the A was established using membrane-immobilized anti-A antibody (immunoaffinity membrane). We indicated that this method could be used to capture and analyze A within the micro-space such as nasal cavity, and the fibrillation of A could be suppressed via protease after A trapping. In addition, fibrous form of A could be isolated from the spiked human plasma by a combinational method of immunoaffinity membrane and electrophoresis.

研究分野：分析化学

キーワード：分離分析 抗体固定化膜 アミロイド 微量分析 生体試料分析

1. 研究開始当初の背景

アミロイドβ (Aβ)などのタンパク質凝集体の形成はアルツハイマー病などの疾患と関連しているため [1, 2]、Aβやその凝集体の分離分析法の構築は疾患の早期発見のために必要不可欠な技術である。特に、今後ますます超高齢化社会が加速する日本においては、アルツハイマー病など主として老年期に発病する疾患の早期発見技術の構築は重要かつ緊急性の高い課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、アルツハイマー病の発症との関連性が指摘されている Aβ単量体および凝集体を分離分析する方法を確立し、さらに、この方法をヒト血漿などの生体試料に添加された Aβの分離分析技術に適用できるかを検討した。また、単離された Aβ単量体の凝集を抑制する方法を検討し、生体内で最も毒性の高いとされる Aβ凝集体の生成を阻害する方法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗体膜の作製：非変性条件の電気泳動法によりアビジンを分離、膜へ固定化した。膜を 4×2 mm に切り取り、ビオチン化抗 Aβ抗体(Aβ抗体)およびビオチン化抗トランスフェリン抗体(control)を結合させ、抗体膜を作製した。

(2) 抗体膜による Aβ単量体の捕捉・溶出：Aβに Tris-HCl 緩衝液を加え、さらにヒト血清を添加し、混合試料を作製した。この試料を抗体膜に 90 分反応させ、洗浄後、抗体膜に結合したタンパク質を TFA で溶出し、MALDI-TOF MS で分析した。

(3) Aβの凝集能の測定：抗体膜で捕捉し、TFA で溶出したタンパク質を 37℃で2日間以上保温し、凝集体に結合し蛍光を発する色素 Thioflavine T(ThT)による Aβの凝集量を比較した(励起波長：455.0 nm 検出波長：470~570 nm)。また、動的光散乱法により、生成する凝集体の粒子サイズの確認を行った。

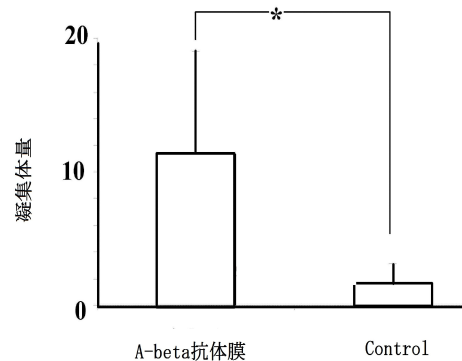
(4) Aβ凝集体の分離分析：ヒト血清に Aβ凝集体を添加した生体試料を非変性条件の電気泳動に添加し、添加させた凝集体以外のタンパク質を除去し、生体試料を回収した。さらに、この試料中の Aβ凝集体を抗体膜により分離、溶出した。溶出された Aβ凝集体量を ThT による蛍光測定法と動的光散乱法により調べた。

(5) タンパク質分解酵素による Aβの凝集抑制の検討：捕捉溶出され、中和された Aβ溶液に種々のタンパク質分解酵素を加え反

応させた後、Aβがどのように分解されるかを MALDI-TOF MS で分析した。さらに酵素分解後の Aβを溶液内で凝集化し、Aβの凝集量を測定した。

4. 研究成果

(1) 独自に作製した Aβ抗体膜により種々の Aβ単量体を選択的に捕獲する方法を構築できた。また、この技術と MALDI-TOF MS による分析法を組み合わせることにより、ヒト血漿に添加された Aβ単量体の特異的に分離分析することが可能となった。さらに、抗体膜の面積を微小化することにより、鼻腔などの微小空間内に存在する Aβを捕獲、分析するのに有効な技術であることを示した。この分離溶出された Aβには凝集化されることが ThT を用いた蛍光測定法と動的光散乱法により明らかにした。



図：捕獲溶出された Aβの凝集化 (*; P < 0.05, Student's t-test)

(2) 非変性条件の電気泳動法と抗体膜法の組み合わせにより、Aβ凝集体をヒト血漿から単離することに成功した。得られた凝集体は ThT による蛍光測定により検出し、その粒子径は動的光散乱法により測定できた。しかしながら、得られた Aβ凝集体は生体試料に含まれる初期量の 29%であった。この点は今後改善する必要がある。

(3) 捕獲・溶出した Aβ単量体を種々のタンパク質分解酵素により消化することで、Aβ凝集を抑制できることを見出した。この方法は Aβの人工的な抑制技術に繋がると考えられる。

<引用文献>

[1] G. Bitan *et al.* Proceeding of Natural Academy of Science USA 100, 330-335 (2003)

[2] K. Murakami *et al.* Journal of the American Chemical Society 127, 15169-15174 (2005)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Youji Shimazaki, Yuki Sato : Retaining activity of enzymes after capture and extraction within a single-drop of biological fluid using immunoaffinity membranes, Journal of Chromatography B 1021, 108-113 (2016).査読有

Youji Shimazaki., Yoko Takatsu : Combined method of immunoaffinity membrane within tubes and MALDI-TOF MS for capturing and analyzing amyloid beta, Applied Biochemistry and Biotechnology 177, 1565-1571 (2015)査読有

Youji Shimazaki, Yu Hirose: Isolation and analysis of amyloid β 1-42 monomer and oligomers in liquid droplets using an immunoaffinity membrane, Journal of Chromatography B 972, 53-57 (2014).査読有

Youji Shimazaki, Ai. Hashimoto: A microfluidic device containing membrane-immobilized antibodies for successively capturing cytosolic enzymes, Talanta.125, 400-404 (2014).査読有

Ayaka Kimura, Youji Shimazaki Micro-scale extraction and analysis of intact carboxylesterase after trapping on an immunoaffinity membrane surface, Applied Biochemistry and Biotechnology 172, 4053-4061 (2014). 査読有

Youji Shimazaki, Madoka Michhiro : Analysis of trypsin inhibition activity in human plasma proteins after separation by non-denaturing two-dimensional electrophoresis,. Clinica Chimica Acta 425, 48-53 (2013).査読有

Youji Shimazaki, Yuri Nishimura, Masaki Saito : Antigen digestion on the target plate of MALDI-TOF MS after isolation using an immunoaffinity membrane, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 83, 293-298 (2013).査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

島崎洋次, 鷹津陽子 抗体膜法と MALDI-TOF MS によるアミロイド 単量体の分離分析法の構築. 日本分析化学会第 64 年会(2015 年 9 月 11 日, 九州大学・福岡県福岡市)

島崎洋次, 佐藤友紀, 宮塚理乃 非変性条件の電気泳動法による酵素抗体複合体の分離法の検討. 第 66 回日本電気泳動学会(2015 年 9 月 5 日, 東京工科大学・東京都大田区)

島崎洋次: 生体酵素の機能と構造の分析法の開発 日本分析化学会中国四国支部愛媛地区講演会(2014 年 12 月 10 日, 新居浜市市民文化センター・愛媛県新居浜市)

島崎洋次, 友澤孝宣: 非変性条件の電気泳動後のタンパク質の機能解析法の検討. 第 65 回日本電気泳動学会総会(2014 年 10 月 25 日, 横浜情報文化センター・神奈川県横浜市)

島崎洋次, 廣瀬優: アミロイド 単量体および凝集体の分離分析法の検討. 日本分析化学会第 63 年会(2014 年 9 月 19 日, 広島大学・広島県東広島市)

斎藤正樹, 島崎洋次: アミロイド 1-42 単量体の酵素分解による凝集制御法の検討 日本分析化学会第 63 年会 (2014 年 9 月 17 日, 広島大学・広島県東広島市)

島崎洋次, 斎藤正樹: アビジン固定化膜を用いた抗原選別と酵素消化連続分析法の確立. 日本分析化学会第 62 年会(2013 年 9 月 12 日, 近畿大学・大阪府東大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 洋次 (SHIMAZAKI Yoji)

愛媛大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80284389