Aβ ラベルフリー検知リポソーム固定 NiCr 歪ゲージカンチレバーセンサ Label Free Sensing of Amyloid Beta Protein Using NiCr Strain Gauge Cantilever with Immobilized Liposomes 京都工芸繊維大学¹,新潟大学² [°]張 子洋¹,寒川 雅之²,山下 馨¹,野田 実¹ Kyoto Inst. Tech.¹, Niigata Univ.² [°]Z. Zhang¹, M. Sohgawa², K. Yamashita¹, M. Noda¹ E-mail: zhang-zy@kit.ac.jp

【はじめに】アルツハイマー病原因物質としてアミロイド β (Aβ) タンパク質は脳神経細胞に沈着・蓄積し、神経細胞が破壊され脳が萎縮することにより脳機能が低下するという病因仮説が有力となっている[1, 2]。具体的には、非凝集状態の Aβ モノマーが無害であり、凝集してオリゴマー化、または線維化した Aβ が細胞に対して毒性を示す [3, 4]。即ち、Aβ 各状態の検知及び Aβ 凝集メカニズムの解明はアルツハイマー病の予防法や根本的な治療法の開発に非常に重要である。現在、ELISA 法による Aβ 検出技術は主流となっている[5]が、大量のサンプルや試薬が必要であり、大型・高価の装置が必要である。それに対して、安価、簡易、微量の Aβ 無標識検知技術の研究・開発が求められている。近年、Aβ と人工細胞膜(リポソーム)の相互作用についての研究が進められており、Aβ モノマーとリポソームの相互作用が非常に小さいが、凝集した Aβ とリポソームの相互作用が大きいことが報告されている[6]。一方、我々はリポソーム固定 NiCr 歪ゲージカンチレバーセンサにて CAB やリゾチーム等のタンパク質の判別と濃度をNiCr 歪ゲージの抵抗変化から静的に直接検出できることを報告した[7]。本研究ではこのカンチレバーセンサを用いて、Aβ とカンチレバー上のリポソームの相互作用による検知を行った。

【実験内容と結果】前回、我々はリポソーム固定NiCr歪ゲージカンチレバーの作製方 法を報告し[7]、検出対象溶液の蒸発を抑制するため、PDMS製の液滴保持構造をカンチ レバー周辺に形成した(Fig. 1)。今回、Aβ(1-40)溶液を検知対象タンパク質として用い た。0.1 wt%のアンモニア水の溶媒中に-20 ℃で保存したAβ(1-40)を必要濃度に溶解して 用いた。ここで、100 μMのAβ(1-40)溶液を常温で静置し、各9、12、15、18、21、40時 間静置したAβ(1-40)溶液をカンチレバーセンサ上に10 μL滴下形成し、各時間のAβ(1-40) とリポソームの相互作用によるカンチレバー撓み量変化をNiCr歪ゲージの抵抗変化に より測定した。

Fig. 2 は各静置時間後の Aβ(1-40)溶液中での NiCr 歪ゲージの抵抗変化率 (ΔR/R₀)を 示す。本計測前に、抵抗値は純水中では経時的に 10 ppm 以下で安定していることが確 認された。静置直後の Aβ(1-40)溶液中では、1 時間経過後の抵抗は約 40 ppm 程度増加 した。Aβ(1-40)溶液を9時間静置しても、抵抗はほとんど変化しなかった。この結果か ら9時間以下で静置した Aβ(1-40)は DPPC と強く相互作用する Aβ 凝集体になっていな いと考えられる。これとは対照的に、9~21時間静置した Αβ(1-40)溶液中でのセンサの 抵抗変化率は静置時間の増加とともに著しく増加した。最大の抵抗変化率は 21 時間静 置した Aβ(1-40)溶液中で約 430 ppm に達した。この結果から、9 時間以上静置した Αβ(1-40)では、静置時間の増加とともに Αβ 凝集化は急速に進んだと考えられる。しか し 40 時間静置した Aβ(1-40)溶液中では、抵抗変化率は約 200 ppm に低下した。文献[3] によると、線維化過程中の AB 凝集体は AB 線維自体よりも強い病原性を示すと報告さ れている。一方、23時間程度後に Αβ(1-40)繊維化が終わっているという報告がある[8]。 このことから、9~21時間静置した Aβ(1-40)は線維化の途中段階であり、40時間後完全 に線維化した Aβ(1-40)は DPPC 人工細胞膜との相互作用が小さくなったと考えられる。 以上より、このリポソーム固定 NiCr 歪ゲージカンチレバーセンサにより Aβ の無標識 検知が可能であることが示唆された。





Fig. 1 A cross-sectional view (a) and a surface photo (b) of the droplet-sealed structure.



Time after preparing A β (1-40) target solution (h) Fig. 2 Resistance change rate of NiCr strain gauge after filling the reservoirs with A β solutions of different stages for 1h.

(謝辞)本研究の一部は科研基盤 A(一般)25249048 の助成を受けて行われた。

【参考文献】[1] R. L. Nussbaum *et al.*: N. Engl. J. Med. **348** (2003) 1356. [2] J. Hardy *et al.*: Science **297** (2002) 353. [3] M. Bucciantini *et al.*: Nature **416** (2002) 507. [4] H. A. Lashuel *et al.*: Nature **418** (2002) 291. [5] H. Englund *et al.*: J. Neurochem. **103** (2007) 334. [6] J. A. Kotarek *et al.*: Anal. Biochem. **399** (2010) 30. [7] 張子洋 *et al.*: 2014 春応物 19p-E15-13. [8] Y. Ohhashi *et al.*: J. Biol. Chem. 279 (2004) 10814.