

蛍光分子封入リポソームセンサによるアミロイド β タンパク質の検出

Detection of Amyloid Beta Protein Using Biosensor Utilizing Liposome Encapsulating Fluorescent Molecules

○今村 亮太¹、張 子洋¹、島内 寿徳²、村田 直樹¹、山下 馨¹、福澤 理行¹、野田 実¹

(1. 京都工芸繊維大、2. 岡山大)

○Ryota Imamura¹, Ziyang Zhang¹, Toshinori Shimanouchi², Naoki Murata¹, Kaoru Yamashita¹, Masayuki Fukuzawa¹, Minoru Noda¹ (1.Kyoto Institute of Technology., 2.Okayama Univ.)
E-mail: m5621003@edu.kit.ac.jp

【はじめに】 当グループでは蛍光分子封入リポソームを用いた蛍光アレイセンサにてターゲットタンパク質の種類・濃度を識別する技術の開発を進めており、疾病に関連するタンパク質の検出・診断を行うセンサの開発を目指している。前回、同センサにてウシ炭酸脱水素酵素(CAB)、リゾチームの識別を行った[1]。今回は新規のターゲットタンパク質としてアミロイド β タンパク質(A β)の検出を試みた。A β はアルツハイマー病の原因物質として知られており、脳神経細胞に沈着・蓄積することで神経細胞が破壊され、脳が委縮し脳機能が低下することで発症するという仮説が有力である[2, 3]。またA β は非凝集状態のモノマー、凝集したオリゴマー、そして線維状態へと伸長する性質があり、特に線維伸長時に強い毒性を示すことが知られている[4]。以上よりA β の線維伸長段階の検出方法を確立することでアルツハイマー病の診断、治療への応用が期待される。本報告では蛍光顕微鏡を用いる蛍光分子封入リポソームセンサによりリポソーム-A β 間相互作用を検出し、その相互作用強度からA β の線維伸長段階を検出した。

【実験内容と結果】 本実験では蛍光プローブ分子であるカルセイン(分子量 622)を封入した DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)リポソームを用いた。リポソームの粒径は 100nm とした。検出対象は 100 μ M の A β (1-40)であり、-20 $^{\circ}$ Cで保存した A β (1-40)の粉末を溶媒である 0.1wt%のアンモニア水に溶解して用いた。本測定ではA β 溶液の調製直後を 0 時間として、常温下で 0, 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24時間静置することでA β を伸長させ、0.7 μ L の A β 添加リポソーム溶液を PDMS セルに導入し蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度を測定した。そしてリポソーム-A β 間相互作用を蛍光強度のA β 静置時間特性から議論する。A β 静置時間特性の測定結果を Fig.1 に示す。Fig.1(a)の蛍光強度のA β 静置時間特性より静置 0 時間から 6 時間にかけて蛍光強度の変化は比較的小さいが、6 時間から 12 時間にかけて蛍光強度が大きく上昇した。A β 線維伸長段階において強い毒性を示す[4]ことを踏まえると、A β の線維伸長に伴うリポソームとの相互作用の増大により、蛍光強度が上昇したことが理由の一つとして考えられる。12 時間以降の蛍光強度の減少は、A β 線維化が終了することによるリポソームとの相互作用の低減に起因すると考えられる。この結果とカンチレバーセンサによる同様の静置時間特性の測定結果(Fig.1(b)) [5]とは概ね対応している。したがって、本リポソームセンサもカンチレバーセンサと同様のA β 検出特性を有すると考えられる。さらに相互作用特性から、線維伸長段階の検出の可能性も示唆された。

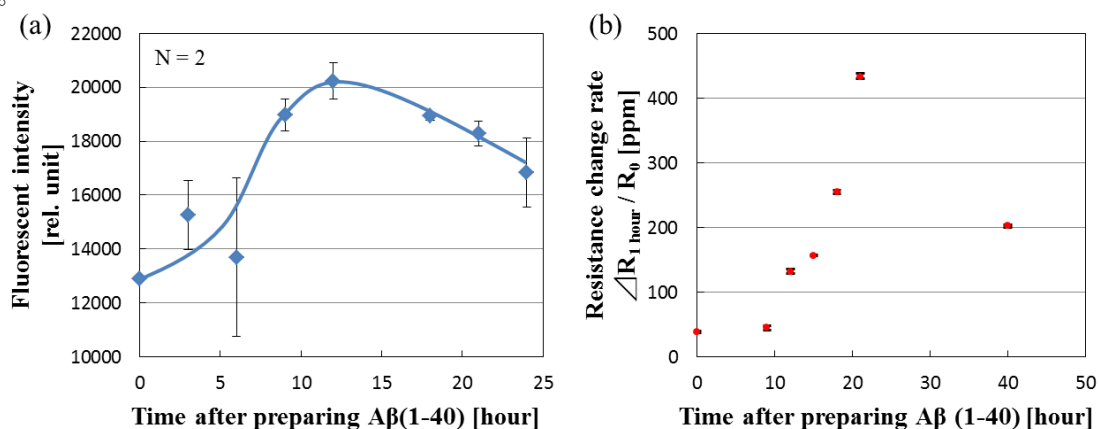


Fig.1. (a) Fluorescent intensity vs time after preparing A β (1-40). (b) Resistance change rate of cantilever sensor vs time after preparing A β (1-40).

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] 今村亮太 他, 2015 秋季応物 13a-2B-5, [2] R. L.Nussbaum *et al*, N. Engl. J. Med., 348(2003) pp.1356-1364, [3] J. Harky *et al*, Science, vol.297, No.19 (2002) pp.353-356, [4] J.E. Walsh *et al*, Nature, vol.418, No.18 (2002) pp.291-292, [5] 張子洋 他, 2014 秋季応物 20p-A2-5