

糖鎖修飾リポソームを用いた蛍光分子封入リポソームアレイセンサによる アミロイドβの検出

Detection of Amyloid Beta Protein by Fluorescent Liposome Arrayed Biosensor Utilizing Sugar Chain-modified Liposome

京工繊大¹, 岡山大² 吉田 一晶¹, 今村 亮太¹, 村田 直樹¹, 島内 寿徳², 山下 馨¹, 福澤 理行¹,
野田 実¹

Kyoto Inst. Tech.¹, Okayama Univ.² Kazuaki Yoshida¹, Ryota Imamura¹, Naoki Murata¹,
Toshinori Shimanouchi², Kaoru Yamashita¹, Masayuki Fukuzawa¹, Minoru Noda¹

E-mail: b3121058@edu.kit.ac.jp

【はじめに】 我々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・濃度等を識別する技術を検討してきており、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5種リポソーム脂質種を用いた同センサにてアルツハイマー病の原因物質であるアミロイドβタンパク質(Aβ)の検出を行い、主成分分析を用いてAβ濃度・Aβ線維伸長段階の識別を行った[1]。今回新たに糖鎖をリポソーム表面親水基に修飾した蛍光分子封入糖鎖修飾リポソームを用いてリポソーム-Aβ間相互作用を評価した。またAβを添加したリポソーム導入量の低減・安定化を目指してアレイセルの深さを小さくした微小化アレイセンサを構築した。

【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 622.53)を封入した DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)リポソーム(粒径 $d \leq 100$ nm) に糖脂質である C16 D-Glucosyl ceramide (分子量 700.04)を10%修飾した糖鎖修飾 DMPC リポソームを用いて測定を試みた。Fig. 1に糖鎖修飾リポソームのイメージ図を示す。生体において糖鎖はクラスターを形成し選択性が高まることが知られている[2]。本測定ではリポソーム溶液にモノマー状態のAβ(1-40) (分子量 4329.8)溶液を添加した時刻を0として常温下で静置することでAβを凝集・線維伸長させる。今回、Aβ(1, 10 μM) 添加糖鎖修飾 DMPC リポソーム(0.5 mM)溶液をアレイセルに0.7 μL 導入し蛍光顕微鏡にてアレイ画像を撮像する。この工程を3時間ごとに繰り返し、Aβ添加リポソームの蛍光強度を経時測定した。そして蛍光強度、測定開始時の蛍光強度に対する相対蛍光強度の経時特性よりリポソーム-Aβ間相互作用を評価する。Fig. 2にAβ添加糖鎖修飾 DMPC における相対蛍光強度の経時特性を示す。Fig. 2より6時間から15時間にかけて相対蛍光強度が大きく上昇しており、Aβの凝集・線維伸長によりリポソーム-Aβ間相互作用が増大したことが分かる。これより糖鎖修飾 DMPC リポソームにおいて前回より低濃度の1 μM のAβ線維伸長段階を検出できた。また糖鎖修飾 DMPC(0.5 mM)は従来の約20分の1の濃度でAβ線維伸長段階を検出できたことから、リポソームへの糖鎖修飾により検出感度が20-200倍向上することが示唆された。この理由として糖鎖修飾リポソームにおいては糖鎖が集積されているため多点分子結合(糖鎖クラスター効果[2,3])を起こすことで強い相互作用を示した結果、リポソーム-Aβ間相互作用が増強されたと考えられる。

さらに溶液導入量の安定化・低減を目指して deepRIE プロセスにより Si アレイ型を作製し、新規微小 PDMS アレイを作製した。本アレイはマイクロディスペンサによる機械的溶液導入が可能であり、またアレイセルの深さが約430 μmであるため、導入溶液量が0.7 μLから0.2 μLに低減できる。本アレイにてAβ(10 μM)添加 DPPC リポソームの経時測定を行った所、Aβ線維伸長段階を検出することができた。これより新規微小アレイセンサにてより低濃度のAβ検出をできることが示唆された。

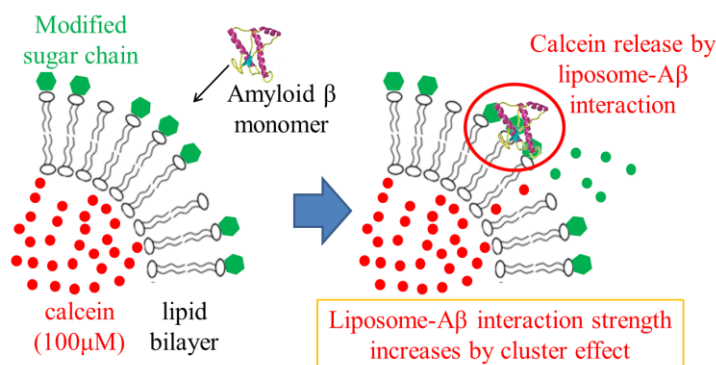


Fig 1. An image of sugar chain-modified liposome and Aβ(1-40) and mechanism of calcein release owing to liposome-Aβ(1-40) interaction.

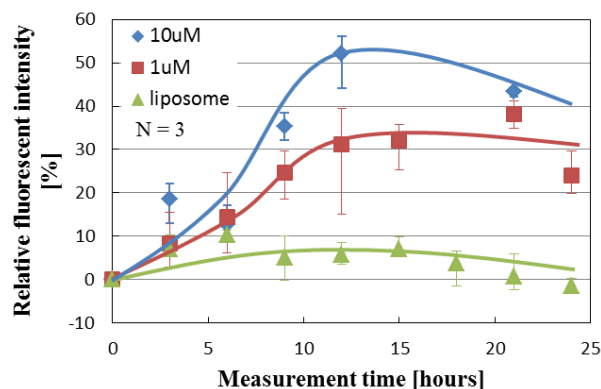


Fig 2. Relative fluorescent intensity of sugar chain-modified DMPC after adding Aβ(1-40) vs. measurement time on the conventional array chip.

【謝辞】 本研究の一部は科研基盤 A (一般) 25249048、挑戦的萌芽研究 26630157 の助成を受けて行われた。

【参考文献】 [1] 今村亮太 他, 2016 秋季応物 15a-B8-4, [2] 門松健治 他, 第三の生命鎖 糖鎖の機能と疾患, 羊土社 (2013) pp.117, [3] 三浦佳子, Chemical Times, No.3 (2009) pp.6-11