RT-QuIC 法を用いたリポソーム固定化カンチレバーセンサによる αシヌクレインの検出

Detection of α-Synuclein by liposome immobilized cantilever sensor using RT-QuIC method

京工繊大・電気電子 [1]，京都大・医 [2]，新潟大・自然科学 [3]
○(M1)小林 亮子 [1]，澤村 正典 [2]，山門 穂高 [2]，寒川 雅之 [3]，山下 馨 [1]，野田 実 [1]
Kyoto Inst. Tech. [1], Kyoto Univ. [2], Niigata Univ. [3]
°R. Kobayashi[1], M. Sawamura[2], H. Yamakado[2], M. Sohgawa [3], K. Yamashita [1], M. Noda [1]
E-mail: m9621026@edu.kit.ac.jp

【はじめに】

我々はリポソーム固定化カンチレバーセンサを用いて，α シヌクレイン(αSyn)の検出を行っている。αSyn は神経変性難病の一種であるパーキンソン病の発症原因となるタンパク質で，通常はモノマー状態で脳内に存在している。しかしモノマーから凝集，伸長し，線維化し，オリゴマーやフィブリルに変化することで神経毒性を獲得する。また，モノマーの中に極少量のフィブリルが存在すると，このフィブリルにより凝集現象が促進されることが分かっている。RT-QuIC 法[1]はこの αSyn フィブリルによるモノマーの凝集現象の促進を利用する方法である。ウェル内に αSyn モノマーのみの溶液を入れ振動させても溶液中の αSyn の状態は変化しないが，極少量のフィブリルを加えた溶液では振動後に溶液中のフィブリルの量が格段に増加するというものである。本研究では RT-QuIC 法に着目し，本カンチレバーセンサで RT-QuIC 法を応用し，αSyn の凝集過程の検出と，極低濃度の αSyn の検出を目指した。

【実験内容と結果】

最初に αSyn モノマーのみの溶液で抵抗変化率を測定した。モノマー溶液の濃度は高濃度の 7 μM とした。その後，7 μM モノマー溶液と極低濃度のフィブリル溶液を 1:1 の割合で混合し振動させた溶液で抵抗変化率を測定した。In vitro fibrilization の方法として，本カンチレバーセンサの液体保持構造に注入する前に 20 回振動を与え，その後液体保持構造内に注入し incubation した (Fig. 1)。

Fig. 2 に測定結果を示す。αSyn モノマーのみの場合，濃度が 7 μM と高濃度であるが，抵抗変化率に上昇は見られなかった。このことはモノマー状態の αSyn は，DPPC リポソームとほとんど相互作用しないことを示唆していると考える。次にフィブリル溶液と混合した場合，フィブリル濃度 700 pM では約 600 ppm，70 pM では約 120 ppm，7 pM では約 80 ppm で飽和した。この結果は，フィブリルのみを検出する場合よりも 2 桁強低濃度の検出ができることを示した[2]。

以上より，添加する極微量のフィブリルがモノマーの凝集を促進していると考えられ，RT-QuIC 法で想定される現象がミクロスケールのカンチレバー上でも再現できていると考える。また今回 7 pM まで検出することができたが，カンチレバーセンサの出力は数十 ppm あり，本カンチレバーセンサでは数 ppm までの検出が可能であるため，数百 fM オーダーの高感度な αSyn 検出が行えることが期待される。

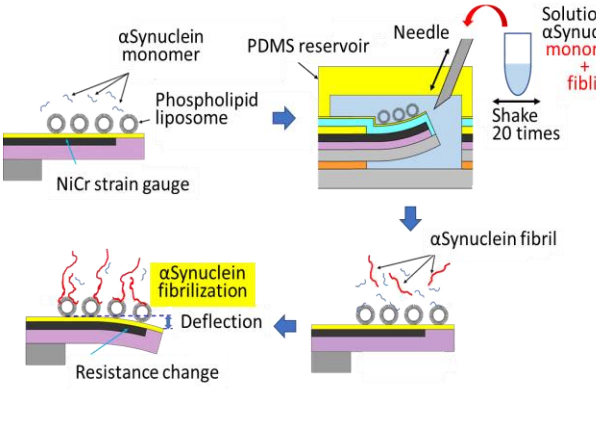

Fig. 1 Mimicking of RT-QuIC on the surface of phospholipid-immobilized cantilever sensor.

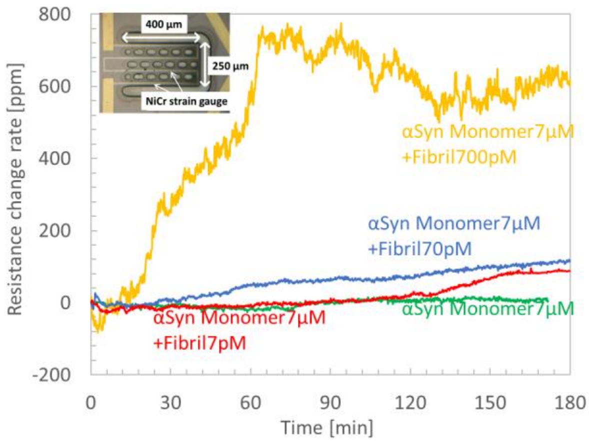

Fig. 2 Time courses of change rate of gauge resistance of cantilever sensor for recombinant aSyn fibril (0, 7, 70, 700 pM) added in 7 μM monomeric aSyn, respectively, with RT-QuIC method.

【参考文献】

[1] G. Fairfoul et al., "Alpha-synuclein RT- QuIC in the CSF of patients with alpha- synucleino pathies", Annals of Clinical and Translational Neurology 3(10) (2016), pp. 812–818.

[2] 小林亮子 他 : 2019 春応物 9p-W242-14

© 2019年 応用物理学会