

リポソーム固定化 QCM 力学センサを用いた α シヌクレイン線維化の検出 Detection of fibrillization of α -Synuclein by liposome-immobilized Quartz-Crystal-Microbalance Mechanical Sensor

京工繊大・電気電子¹, 京都大・医²

○(M1) 小林 亮子¹, 澤村 正典², 山門 穂高², 野田 実¹

Kyoto Inst. Tech.¹, Kyoto Univ.²

°R. Kobayashi¹, M. Sawamura², H. Yamakado², M. Noda¹

E-mail: m9621026@edu.kit.ac.jp

【はじめに】

パーキンソン病の原因物質である α シヌクレイン(α Syn)は単量体(モノマー)から重合体(オリゴマー, フィブリル)へと凝集、線維伸長することにより神経毒性を発揮する。我々は α Syn 重合体検出のために、ラベルフリーカンチレバーセンサを用いたより高感度かつ安定した新しい手法を開発してきた[1,2,3]。一方、カンチレバーセンサと同様に、水晶振動子マイクロバランス(QCM: Quartz-Crystal-Microbalance)もその表面に吸着したターゲット分子の質量変化から α Syn 重合体の高感度検出が可能であると推定される。カンチレバーセンサでは吸着や相互作用に伴う表面ストレスに由来するカンチレバーの歪みから α Syn 重合体が検出されるため、歪発生 of 物理的要因は複数考えられるが、QCM は Sauerbrey の式から質量変化のみを検出するため現象を理解しやすい。本研究では、QCM による α Syn 重合体測定を行い、従来得てきたカンチレバーセンサでの測定結果との比較・検討を行った。

【実験内容と結果】

QCM センサとして、initium 社製 AFFINIX QN μ を用いた。質量変化の感度は 30 pg/Hz である。センシング分子である DPPC リポソームはサンプル溶液を満たすセルの中で QCM 振動子の Au 電極表面に SAM を介して固定した (Fig. 1)。この固定はカンチレバー上と同様のプロトコルで行った[1,2,3]。セル内を 400 μ L の PBS で満たし、 α Syn モノマーを比較的高濃度である 7 μ M となるように注入、周波数が安定化した 90 分後に、ターゲットである α Syn フィブリルを 700 pM から 700 fM となるように導入し測定を行った (Fig. 2)。なお、サンプル溶液は常に攪拌棒で攪拌するため(攪拌回転数: 1000 rpm)、単純な物理的吸着は発生しないと想定される。

第一段階として α Syn モノマー分子がリポソームと相互作用し電極表面全体へ吸着することで振動数が変化するが、一定時間で定常状態となる。そこに極微量の α Syn フィブリルを添加した 90 分以降は、持続的な振動数の減少が観察された。 α Syn フィブリルの吸着とこれを核とした monomer の取り込みによる fibril の伸長が並行しているものと考えられ、時間経過からもカンチレバーセンサにおける実験と同じ現象を観察しているものと推測された。なお今回の QCM の検出下限は 7 pM であり、カンチレバーを用いた測定の方がより高感度であった。

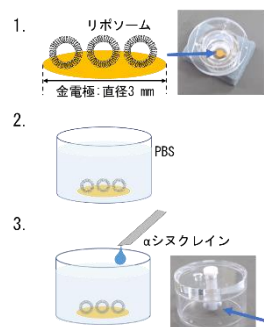


Fig. 1. Immobilization of liposome on the surface of QCM oscillator and introduction of target α Syn solution into QCM cell.

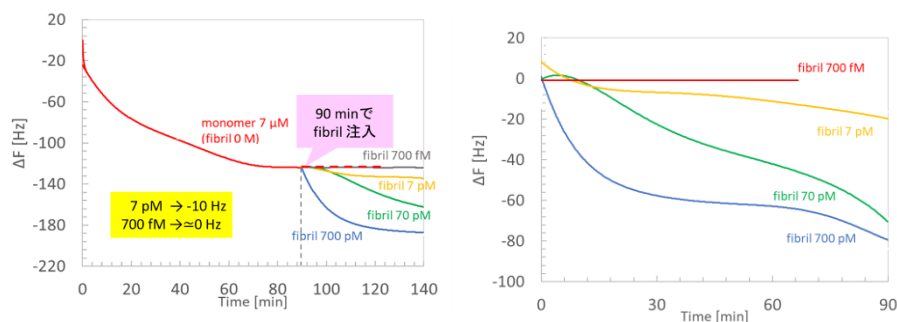


Fig. 2. (Left) Time courses of change of oscillation frequency of QCM oscillator after adding monomeric α Syn (7 μ M), and after 90 min, adding a trace amount of fibrillar α Syn. (Right) The measurement was done until 180 min. (90+90 min)

【参考文献】

- [1] R. Kobayashi *et al.*, C3L-A-2, *IEEE Sensors 2019*, Montreal, Canada, October. 27–30 (2019) 1274.
[2] 小林亮子 他: 2019 秋応物 19a-E203-1 [3] 特願2019-160220