（ 様式D－２ ）
（ 別　　紙 ）

令和６年度　海外派遣研究員研究報告書

令和 7 年 2 月 20 日

日本大学理事長　　殿
日本大学学長　　殿

所　　属　　生産工学部（生産工学研究所）
資格・氏名　　准教授　朝本 紘充
■本報告書の内容を公表することは了承しております。
（公表可の場合，チェック■すること）

令和６年度海外派遣研究員（中期）の研究実績を，下記のとおり報告いたします。

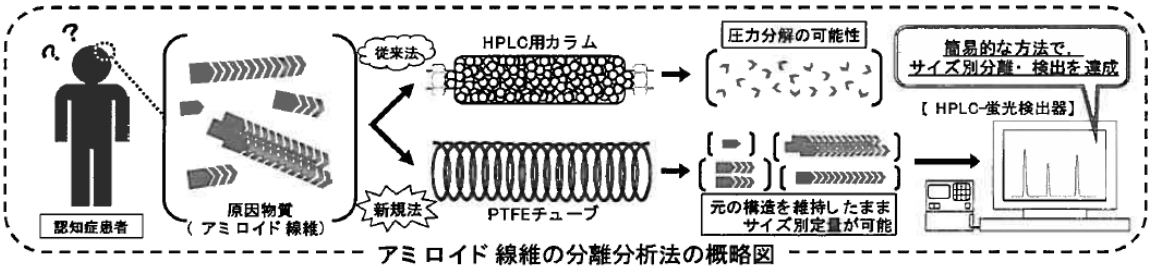
記

１　区　　分　　中　期
２　研 究 課 題

流れ分析における樹脂製中空カラムの分離場としての精度評価に関する研究

３　派 遣 期 間　　西暦 2024 年 6 月 29 日　　～　　2024 年 12 月 26 日
４　派　遣　先　　オーストラリア連邦・シドニー工科大学
５　研 究 目 的

神経変性疾患の一種であるアルツハイマー病(AD)は，脳内のアミロイドβタンパク質(Aβ)の凝集体が神経細胞に沈着することで発症する[1, 2]。当該疾患の詳細な病理機構を解明するためには病状の進行に伴い発現量が変化する，会合度が異なる凝集体（アミロイド線維とも呼ばれる）の種類と量を網羅的かつ高精度に解析出来る分析法が必要である。著者はこれまで，化学工学分野などで知られる「分級」の原理をもとに，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるタンパク質凝集体の分離分析技術の開発を行ってきた。その結果，分離場にメートルオーダーの長さの中空カラム(樹脂製チューブ)を用いることで，Aβをモノマーとしたアミロイド線維の分離分析に成功している（下図参照）。しかし，分離された凝集体のサイズ（会合度・分子量等）の精密な測定までには至っていない。そこで本研究では，電気泳動法や質量分析計を用いて本法の精度について詳細に検証することを目的とする。



アミロイド線維の分離分析法の概略図

6　研 究 概 要

ある種のタンパク質は，溶存している媒体の極性や pH などの環境変化により変性し，疎水性相互作用をはじめとした分子間力によって結合することで溶解度の低い凝集体となる。モノマー間で強固な共有結合を形成している一般的な高分子(ポリマー)とは安定性が異なり，固体粒子が詰め込まれた通常の HPLC 用カラムを使用した場合，圧力等の影響で分解や損失が引き起される可能性がある。現在，in vitro の実験系では簡便かつ安価なアミロイド線維の検出法として，蛍光色素のチオフラビン T と蛍光分光光度計を用いた高感度な分析法が汎用されている[3-5]。しかし，これらの検出法ではアミロイド線維と前駆体を含めた凝集体の総量を測定することしかできない。各凝集体のサイズ別の分離・検出を可能にするためには最適な分離場を組み合わせた新たな方法を確立する必要がある。著者は約 20 年に渡り，HPLC を用いる生体分子の分析に従事してきた。本装置はあらゆる可溶性物質を簡便かつ高精度に分析できる分析システムであり，タンパク質のモノマー分析の際には通常，サイズ排除クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィー用のカラムと併用される[5, 6]。しかしアミロイド線維などのタンパク質凝集体を分析する際，これらのカラムでは分析種そのものを損壊する可能性が高い。そこで我々は，流路内で圧力がほとんど発生しない中空のポリテトラフルオロエチレン（PTFE）チューブを HPLC の分離場として組み込むことでアミロイド線維を損壊することなく分離・検出することが出来ると考えた。実際，鶏由来のリゾチームタンパク質の凝集体を試料として用いた際，良好な分離を示すクロマトグラムが得られた[7]。さらに Aβ 凝集体への適用も達成されている[8]。しかしながら，得られたクロマトグラム上の溶出時間やピーク強度と凝集体の分子量や会合度などとの詳細な相関性は未だ不明瞭なままである。そこで本研究では本法の精度向上を図るとともに，分離検出された各凝集体の分子量の測定を試みた。具体的には，HPLC よりも感度並びに分離能が高く，分析時間の短縮も可能な超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）を用い，分離場には内径が 200 μm 以下の PTFE チューブを採用した（下表参照）。さらに分離検出された各タンパク質凝集体のピーク画分を溶出順に分取したうえで，電気泳動法または質量分析計を用いて会合度と分子量を算出する。こうした計画を実現すべく，今回の海外派遣ではシドニー工科大学（UTS）の Matthew Padula 博士の研究室に Visiting Fellow（客員研究員）として所属し，実験を行った。

Table. Optimized UPLC measurement conditions

Parameter	Description
Sample solution	0.25 mg/mL Amyloid β Protein (1-42) solution
Column	PTFE Tubing (10 m × 0.18 mm i.d.)
Column temperature (°C)	60
Excitation wavelength (nm)	435
Emission wavelength (nm)	485
Gain	× 16
Sensitivity	Medium
Cell teperature (°C)	10 >
Mobile phase A	50 μM Thioflavin T / 20 mM Ammonium acetate solution
Mobile phase B	None
Flow rate (mL/min)*	0.05
Autosampler temperature (°C)	15
Needle stroke (mm)	53
Sampling speed (μL/s)	2.5
Injection volume (μL)	5

* The pressure observed under these conditions: Approximately 55 psi

7　研究結果・成果

まずは本分析法を UPLC に適用するために，分析条件の最適化を行った（上表参照)。なおその際，緩衝液には将来的な質量分析計への接続も視野に入れ，従来のリン酸緩衝液ではなく揮発性塩類である酢酸アンモニウムの緩衝液を用いた。最適化の結果，従来法よりも高感度かつ分析時間が大幅に短縮されたクロマトグラムが得られた（下図参照)。そこで検出されたピーク画分をすべて分取し，含有成分の分子量について電気泳動法による算出を試みた（データ未記載)。電気泳動法についてはポリアクリルアミドゲルを支持体とした Native PAGE および SDS-PAGE の両方を実施したが，いずれも感度不足のためかバンドは検出されなかった。分析対象である Aβ は構造内に高い比率(%)で疎水性アミノ酸残基を有するためか，マイクロチューブをはじめとした実験容器の内壁への非特異的吸着により損失する可能性が高い。今後は UPLC または HPLC において高感度に検出されたタンパク質成分が，電気泳動法においても問題なく検出されるよう，前処理条件などを詳細に検証する必要がある。

本法はアミロイド線維の形成機構の解明のみならず，創薬分子のスクリーニング探索など疾患プロテオミクス分野や予防医学分野への貢献が期待できる。

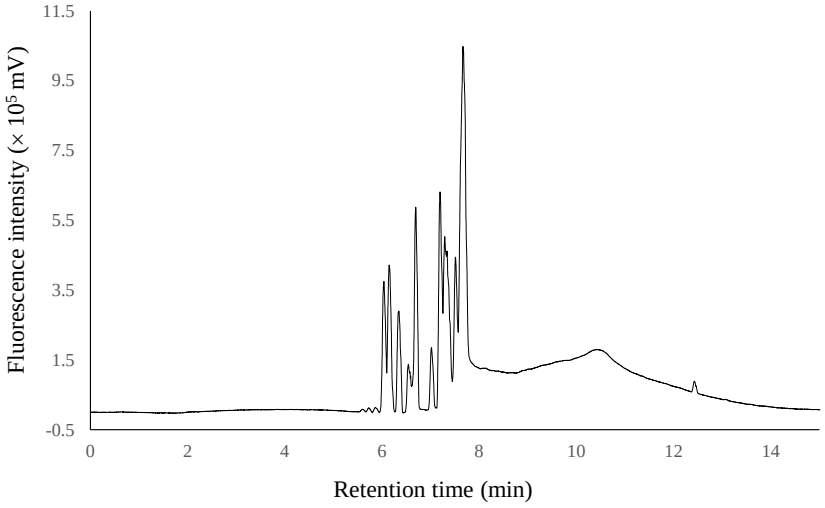


Fig. A chromatogram of Aβ aggregates obtained the UPLC system utilizing a PTFE tubing as a separation field.

【参考文献】

1) G. Merlini, V. Bellotti., *N. Engl. J. Med.*, **349**, 583 (2003).

2) W. H. Binder, O. W. Smrzka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 7324 (2006).

3) A. Chauhan, T. Pirttila, V. P. S. Chauhan et al, *J. Neurol. Sci.*, **154**, 159 (1998).

4) M. Biancalana, S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 1405 (2010).

5) R. Khurana, C. Coleman, C. I. Zanetti et al., *J. Struct. Biol.*, **151**, 229 (2005).

6) P. Hong, S. Koza, E. S. P. Bouvier, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **35**, 2923 (2012).

7) H. Asamoto, K. Nagashima, T. Nakagama et al., *BUNSEKI KAGAKU*, **66**, 2, 89-94 (2017).

8) H. Asamoto, K. Nagashima, T. Nakagama et al., *SSS&T*, **5**, 66-73 (2025)

以　　上