

# アミロイド凝集阻害物質の微量探索システムの開発

室蘭工業大学大学院工学研究科

徳楽清孝, 田井中玲奈, 松井一史, 吉成航

## 目的

認知症の約7割を占めるアルツハイマー病は、アミロイドβ (Aβ) やtauタンパク質が脳内でアミロイドと呼ばれる凝集体を形成、蓄積されることが発症の引き金となるため、凝集を阻害する物質が病気の予防や治療に有用である。我々は量子ドットナノプローブを用い、蛍光顕微鏡下でアミロイド凝集阻害物質を探索する微量ハイスループットスクリーニングシステムの開発を行ってきた。本手法では、アミロイド凝集体の形成やその阻害を蛍光顕微鏡下で直接観察することが可能であるというメリットがあるが、解像度が低いため凝集体中に含まれる線維一本一本を観察することは不可能である。そこで、ナノテクプラットフォーム事業を活用し、透過型電子顕微鏡 (TEM) でアミロイド凝集体を観察することで、線維形態やプローブとの相互作用の詳細な観察を行い、探索システム開発のための一助とした。

## 成果

### 【実験方法】

Aβ およびtauを37 °Cで24 h、α-Synucleinを37 °Cで7日間インキュベートした。試料溶液をグリッドにのせ、10分間インキュベート後、水滴をろ紙で吸い、2.5%グルタルアルデヒドを含むPBSにのせて室温で5分間程度静置し、試料分子を膜面に固定した。パラフィルム上に1%リンタングステン酸の液滴を2つ用意し、試料側が水滴に接するように被せ、2つのリンタングステン酸水滴にそれぞれ数秒位ずつ接触させた。ろ紙で余剰の染色剤を吸収し、10分間自然乾燥させ、TEM (日立、H-7600) を用いて観察した。

### 【結果と考察】

Aβ、tau、α-Synucleinを凝集させ、形態の違いをTEMで観察した。その結果、これらのアミロイド線維の形態は類似していること (図a、EM上)、形成した線維に量子ドットナノプローブが結合する様子が確認された (図a、EM下)。量子ドットナノプローブ共存下でこれらを蛍光顕微鏡観察したところ、凝集していく様子を継時的に観察できること、形成した凝集体の溶液中での形態が異なること、凝集阻害を画像から定量化できることが明らかになった (図b-e)。

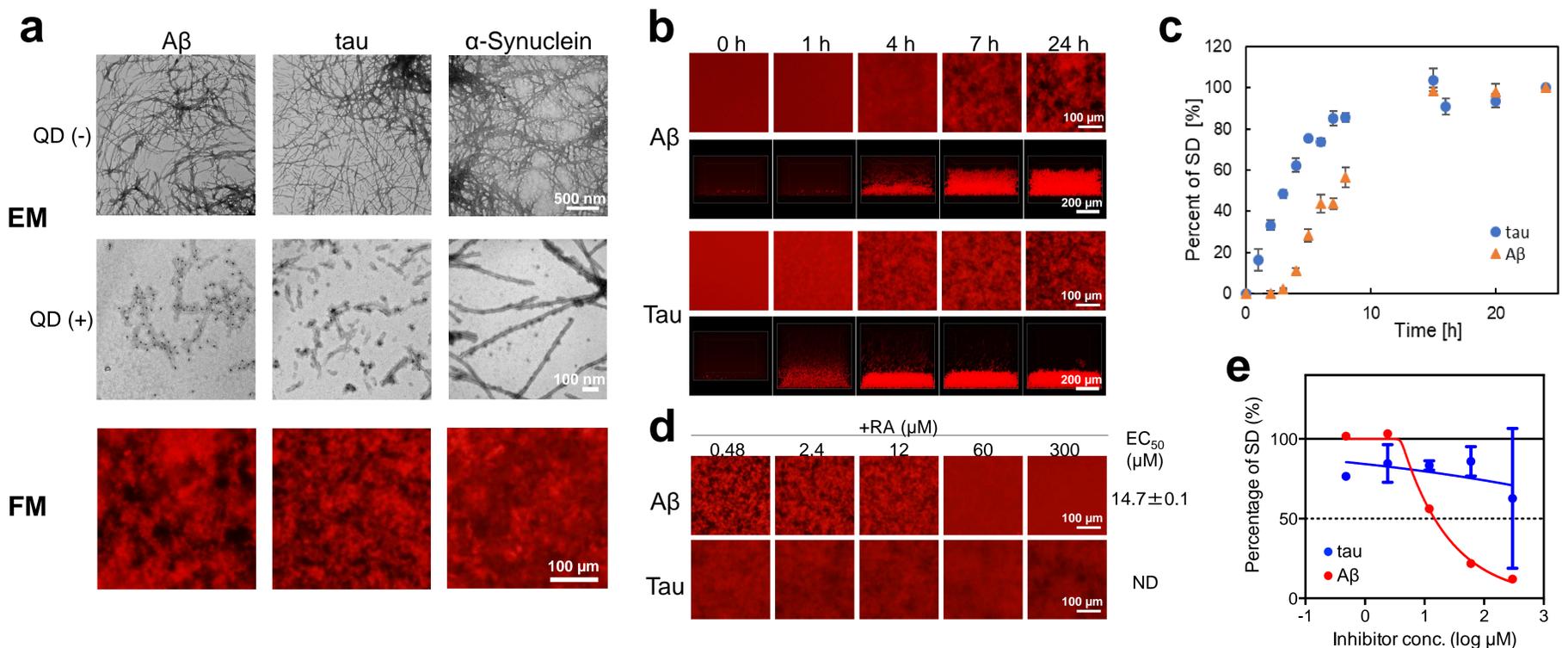


図 Aβ、tau、α-Synuclein凝集体のTEMおよび蛍光顕微鏡観察

## 実施機関からのコメント

支援実施者はTEMを製作した日立と連絡を取り合い、適切なサンプル調製法や観察法をユーザーに提案した。蛍光顕微鏡観察による凝集の継時的観察に加え、TEMによる凝集体形状や量子ドットナノプローブとの相互作用を解析することで、アミロイド凝集阻害物質の微量探索システムの信頼性向上に寄与することができた。

(支援実施者：山崎郁乃, 河野敬一)

