

マイクロ流体を用いたタンパク質凝集体検出法開発

福山真央*

Development of Microfluidic Detection Method for Protein Aggregates

Mao FUKUYAMA*

We have developed a microfluidic-based compartmentalization method to achieve quantitative detection of α -synuclein (α syn) aggregates in complex biological samples. Conventional seed amplification assays (SAA) sometimes lack quantitative precision due to the stochastic nature of fibril growth in bulk solution. By compartmentalize the reaction mixture into thousands of uniform microdroplets using a microfluidic device, we converted the presence of seeds into a discrete digital signal. We optimized the formation of droplets and the reaction conditions to ensure stable signal generation in the presence of serum by using insulin seeds. This compartmentalization approach is expected to provide a robust platform for the sensitive and quantitative analysis of protein aggregates.

1. 緒言

パーキンソン病、レビー小体型認知症をはじめとするシヌクレイノパチーでは、脳内に α シヌクレイン (α syn) の凝集体が形成することが知られている。近年、脳脊髄液¹⁾や血清中²⁾の α synの微小凝集体（シード）が極めて重要なバイオマーカーとして注目を集めている。体液中のシードの検出法として、シードに α synモノマーを添加することでシードより線維を伸長し、チオフラビンT (ThT) の蛍光により検出するSeed Amplification Assay (SAA) が広く用いられている。しかし、従来のプレートリーダーを用いたSAAは、バルク溶液中での反応であるため、反応速度のばらつきや夾雑物の影響を受けやすく、定量的な評価が困難であった。これまで我々は、マイクロ流体技術を用いて反応系をマイクロメートルサイズの微小な水滴（マイクロ水滴）中に区画することで、個々の区画内で独立して線維の核生成・伸長反応を観察する手法を開発してきた³⁾。この手法を応用することで、 α synシードの有無を計測する手法の開発を目的とした。本研究ではその前段階として、血清中に添加したインスリンシードを用いた原理実証を目指した。

2. 実験方法

血清中のタンパク質の除去を実証することを目的とし、血清中タンパク質をAlexa Fluor 488 NHSを用いて無作為に修飾したものをを用いた。また、疑似サンプルとして、人工的に調整したインスリンシードが分散したバッファーおよび血清を用いた。フッ素系有機相としてはHFE7500と008-fluorosurfactantを用いた。マイクロ流体デバイスを用いてフローフォーカシング法により、上記のAlexa Fluor 488修飾タンパク質やシード分散液を含む水溶液を水相として用い、フッ素系有機相によりでせん断することで、直径約30 μ mの均一なマイクロ水滴を生成した。また、マイクロ水滴内でのインスリンシードの観察においては、線維特異的蛍光試薬であるチオフラビンT (ThT) を添加し、シードを染色した。血清中のタンパク質の挙動確認およびインスリンシード検出は、蛍光顕微鏡観察を用いて行った。

3. 結果と考察

マイクロ流体の流速、フッ素系有機相の組成、および温度を検討し、サイズの均一なマイクロ水滴を再現性良く作製する条件を見出した。また、水相内の内部組成および前処理を最適化することで、血清中のタンパク質を除去する手法を確立した。この条件を用いて、バッファー中のインスリンシードを疑似サンプルとして、マイクロ水滴による線維の補足とThTによる染色を実証した(図1B)。また、シードを用いて、ただし、この結果でにおけるインスリンシードの濃度は、推測される血清中の α synシード濃度より約 10^5 倍高いため、線維伸長条件の最適化等による検出感度の向上が必要であることが分かった。

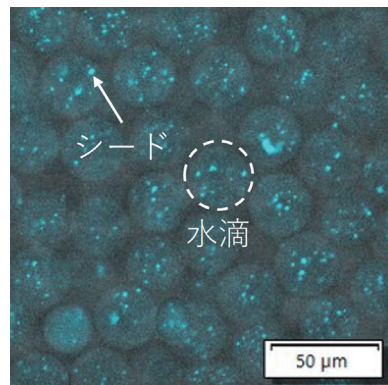


図1 マイクロ水滴内におけるインスリンシードの線維の検出。

4. 結言

本研究により、マイクロ水滴内において血清中のインスリンシードの検出にが可能であることを実証した。本手法は、従来のSAAが抱えていた定量性の課題を「デジタル計測」というアプローチで解決する可能性がある。今後、本手法における定量性の確認や、高感度化、多検体処理能力の向上により、実試料への適用性を広げていく予定である。

REFERENCES

- 1) M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert, *Nature*, **388** (1997) 839-840.
- 2) A. Siderowf, L. Concha-Marambio, D.-E. Lafontant, C. M. Farris, Y. Ma, P. A. Urenia, H. Nguyen, R. N. Alcalay, L. M. Chahine, T. Foroud, D. Galasko, K. Kiebertz, K. Merchant, B. Mollenhauer, K. L. Poston, J. Seibyl, T. Simuni, C. M. Tanner, D. Weintraub, A. Videnovic, S.-H. Choi, R. Kurth, C. Caspell-Garcia, C. S. Coffey, M. Frasier, L. M. A. Oliveira, S. J. Hutten, T. Sherer, K. Marek and C. Soto, *The Lancet Neurology*, **22** (2023) 407-417.
- 3) A. Okuzumi, T. Hatano, G. Matsumoto, S. Nojiri, S. Ueno, Y. Imamichi-Tatano, H. Kimura, S. Kakuta, A. Kondo, T. Fukuhara, Y. Li, M. Funayama, S. Saiki, D. Taniguchi, T. Tsunemi, D. McIntyre, J.-J. Géraldy, M. Mittelbronn, R. Kruger, Y. Uchiyama, N. Nukina and N. Hattori, *Nature Medicine*, **29** (2023) 1448-1455.
- 4) J. Kawakami, T. Ozawa, Y. Maruyama, H. Ishikawa, K. Yamauchi, K. Kobayashi, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, S. Tomita, T. Agarwal, T. Sneideris, K. Nakajima, K. Shiraki, H. Taguchi, A. Hibara, T. Knowles, E. Chatani, Y. Mizuno, Y. Ohhashi and M. Fukuyama, *ChemRxiv*, 2025, doi.org/10.26434/chemrxiv-2025-6xwgc-v2.