



Development of an automated microliter-scale high-throughput evaluation system for amyloid aggregation inhibitory activity and evaluation of extracts from plants collected in Hokkaido

その他（別言語等）のタイトル	アミロイド凝集阻害活性の自動化微量ハイスループット評価システムの開発と北海道産植物エキスの評価
著者	SASAKI Rina, KURAGANO Masahiro, UWAI Koji, TOKURAKU Kiyotaka
journal or publication title	Annual Meeting Abstract of International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM)
volume	28
page range	14-14
year	2019
URL	http://hdl.handle.net/10258/00010073

Development of an automated microliter-scale high-throughput evaluation system for amyloid aggregation inhibitory activity and evaluation of extracts from plants collected in Hokkaido

Rina Sasaki, Masahiro Kuragano, Koji Uwai, ○Kiyotaka Tokuraku

Graduate school of Engineering, Muroran Institute of Technology, Hokkaido, Japan

[Background/Aims] Protein aggregation is the principal component of numerous protein misfolding pathologies termed proteinopathies, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, prion disease, and AA amyloidosis. For example, in AD, the amyloid- β (A β) and the tau aggregate in the brain of patients. Therefore, the aggregation inhibitors have great potential for the prevention, treatment, and research of proteinopathies. Recently, we developed a microliter-scale high-throughput screening (MSHTS) system of A β aggregation inhibitors using Qdot nanoprobe, though some challenges remain such as the ability to generalize this system so that it can be used by anyone and for any sample. In this study, we developed an automated system that can evaluate the protein aggregation inhibitory activity of many heterogeneous samples rapidly and accurately, and evaluated crude extracts from plants collected in Hokkaido using the developed system.

[Methods] The stepwise-diluted samples, 25 μ M A β , and 25 nM QD nanoprobe were mixed by Automated Workstation (JANUS G3, Perkin Elmer) and incubated in a 1,536-well plate at 37°C for 24 h to induce aggregation. The formed aggregates were observed by an inverted fluorescence microscope (ECLIPSE Ti-E, Nikon). Standard deviation (SD) values of fluorescence intensities of 432×432 pixels in the central region of each well were determined by the General Analysis program (NIS-Elements, Nikon). The half-maximal effective concentration (EC₅₀) was estimated from the SD values by Prism software (GraphPad) using an EC₅₀ shift by global fitting (Asymmetric sigmoidal, 5 parameter logistic) according to our previous method.

[Results] We successfully developed an automated microliter-scale (5 μ L) high throughput screening system with 1,536-well plates for amyloid aggregation inhibitors using quantum-dot nanoprobe. Screening 504 crude extracts revealed the relationship of A β aggregation inhibitory activities of plant extracts using a plant-based classification. Within the eudicots, rosids, Geraniales and Myrtales showed higher activity. MSHTS also identified three chaperone molecules as tau aggregation inhibitors. These results demonstrate that our automated MSHTS system is a novel and robust tool that can be adapted to a wide range of compounds and aggregation-prone polypeptides.

アミロイド凝集阻害活性の自動化微量ハイスループット評価システム の開発と北海道産植物エキスの評価

佐々木里奈、倉賀野正弘、上井幸司、○徳楽清孝

室蘭工業大学大学院 工学研究科

【背景・目的】 タンパク質の凝集は、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病、プリオン病、AA アミロイドーシスなど、プロテインパチーと呼ばれる様々なタンパク質変性疾患の主要因となる。例えば、AD においては患者の脳にアミロイド β ($A\beta$) やタウが凝集する。それゆえ、凝集阻害物質はプロテインパチーの予防や治療、また研究に対して有用である。近年、我々は量子ドットナノプローブを用いた $A\beta$ 凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング (MSHTS) システムを開発したが、誰でも、どのようなサンプルでも評価出来るまでには一般化されていなかった。そこで本研究では、粗抽出物のような多くの成分を含むサンプルのタンパク質凝集阻害活性を迅速かつ正確に評価することができる自動化システムを開発し、実際にその手法を用いて北海道産植物抽出物の評価を行った。

【方法】 段階的に希釈したサンプル、25 μ M $A\beta$ 、25 nM QD ナノプローブを自動分注装置により混合し、凝集を誘導するために 1,536 ウェルプレート中で 37°C、24 時間インキュベートした。形成した凝集体は倒立蛍光顕微鏡により観察した。ウェル中心部の 432×432 ピクセルの蛍光強度の標準偏差 (SD) 値を分析プログラム (NIS-Elements、ニコン社) により決定し、その値から 50% 効果濃度 (EC_{50}) を Prism ソフトウェア (GraphPad) の global fitting 法により決定した。

【結果】 我々は本研究により、5 μ L の微量スケールで、1,536 ウェルプレートを用いたハイスループットスクリーニングが可能な自動化システムの開発に成功した。実際に 504 種類の北海道産植物の粗抽出液を評価したところ、その活性が植物の分類に関係することが明らかになった。活性が高かった真性双子葉植物バラ類の中でも、フウロソウ目とフトモモ目の活性がより高かった。さらに、MSHTS 法は 3 種のシャペロンがタウの凝集阻害活性を有することを明らかにした。これらの結果は、今回開発した自動化 MSHTS システムが、幅広い化合物や凝集性ポリペプチドに対応可能な新規で強力なツールとなることを証明した。