



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



アミロイド β 凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニングシステム

メタデータ	言語: eng 出版者: International Congress on Nutrition and Integrative Medicine 公開日: 2019-12-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 徳樂, 清孝, 上井, 幸司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10258/00010072

A microliter-scale high-throughput screening system of amyloid β aggregation inhibitors

○Kiyotaka Tokuraku, Koji Uwai

Division of Sustainable and Environmental Engineering,
Muroran Institute of Technology, Hokkaido, Japan

[Background/Aims] In 2050, the number of Alzheimer's patients worldwide is estimated to exceed 100 million. Since aggregation of amyloid β ($A\beta$) triggers the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), substances that inhibit aggregation are expected to be useful for prevention of AD. Recently, we reported a real-time imaging method of $A\beta$ aggregation using quantum-dot (QD) nanoprobe, and then developed a microliter-scale high-throughput screening (MSHTS) system for $A\beta$ aggregation inhibitors by applying the imaging method. In this presentation, we will report the methodology of the MSHTS system and the results of the screening by the system.

[Methods] The stepwise-diluted samples, $30\mu\text{M}$ $A\beta$, and 30nM QD nanoprobe were mixed and incubated in a 1,536-well plate at 37°C for 24 h to induce aggregation, and the formed aggregates were observed by an inverted fluorescence microscope. Standard deviation (SD) values of fluorescence intensities of 10,000 pixels (100×100 pixels) in the central region of each well were determined by ImageJ software (NIH). An inhibition curve was established by plotting the SD values, which were approximately proportional to the amount of aggregates against the concentrations of added samples, and the half-maximal effective concentration (EC_{50}) values for $A\beta$ aggregation inhibition were estimated from the inhibition curves.

[Results] First, we evaluated ethanol extracts of 52 spices by the MSHTS system. The results revealed that almost more than 90% of the tested extracts showed inhibitory activity for the $A\beta$ aggregation, although the EC_{50} values were widely distributed (EC_{50} : 0.001-10 mg/mL) among plant families. We also found that the ethanol extracts of the Lamiaceae and Myrtaceae families showed significantly higher activities than the average of tested extracts, and an active compound constituted in the Lamiaceae family was found to be rosmarinic acid. Next, we evaluated ethanol and boiling water extracts of 11 seaweeds by the MSHTS system. The results revealed that the inhibitory activity of boiling water extracts was higher than that of ethanol extracts.

アミロイド β 凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニングシステム

○徳樂清孝、上井幸司

室蘭工業大学大学院 工学研究科 環境創生工学系専攻

【目的】 2050 年、世界のアルツハイマー病患者数は 1 億人を突破すると見積もられている。アミロイド β ($A\beta$) の凝集がアルツハイマー病 (AD) 発症の引き金となることから、凝集を阻害する物質は AD の予防に有用であると期待されている。最近、我々は量子ドット (QD) ナノプローブを用いた $A\beta$ 凝集のリアルタイムイメージング法について報告し、そのイメージング法を応用した $A\beta$ 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。今回の発表では、MSHTS 法の原理とこの手法を用いた凝集阻害物質のスクリーニングの結果について報告する。

【方法】 段階的に希釈したサンプル、 $30\mu\text{M}$ $A\beta$ 、 30nM QD ナノプローブを混合し、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。次に、形成した凝集体を倒立蛍光顕微鏡で観察し、ウェル中心部の 10,000 ピクセル (100×100 ピクセル) の蛍光強度の標準偏差 (SD) 値を ImageJ (NIH) で決定した。凝集体量とおよそ相関する SD 値を縦軸に、加えたサンプルの濃度を横軸にプロットし、凝集阻害曲線とした。その阻害曲線から $A\beta$ 凝集阻害活性の 50% 効果濃度 (EC_{50}) を決定した。

【結果】 最初に、MSHTS 法によって香辛料 52 種類のエタノール抽出物の $A\beta$ 凝集阻害活性を評価した。その結果、90% 以上のほとんどの抽出物に $A\beta$ 凝集阻害活性を示すことが明らかになったが、 EC_{50} 値は植物の科によって広くばらついていた (EC_{50} : 0.001 - 10 mg/mL)。また、シソ科とフトモモ科のエタノール抽出物が調べた抽出物の平均より著しく高い活性を示すことを見出した。次に、MSHTS 法によって 11 種の海藻のエタノールおよび熱水抽出物を評価した。その結果、熱水抽出物の阻害活性がエタノール抽出物より高いことが明らかになった。