

プロテオームによるアルツハイマー病の病態解析法の開発

●下濱 俊¹⁾ ◆吉里 勝利²⁾

1) 京都大学大学院医学研究科 2) 広島大学大学院理学研究科

〈研究の目的と進め方〉

プロテオミクスは、ゲノム情報の最終産物であるタンパク全体（プロテオーム）を大規模に解析することでゲノム情報の機能的側面を理解し、ゲノムと生命の関係を解き明かすための情報基盤を提供することを目的としている。タンパクは遺伝子の単なるdownstream expression ではない。組織的なホメオスタシスの影響下における生成と修飾と分解のバランスの結果であり、そこに含まれる情報は遺伝子情報よりはるかに多面的である。プロテオームのデータベース化は今後の生命科学研究の大きなテーマであるが、ヒトゲノムの解読が完了した今、最も期待されるのは様々な疾患研究への応用である。

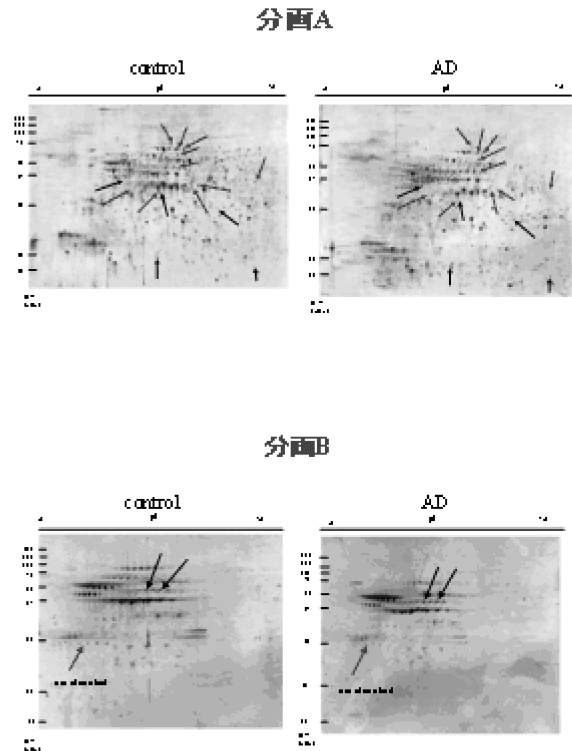
孤発例を主体とするアルツハイマー病では、生成されたタンパクを網羅的に検討し、その翻訳後修飾やタンパク相互作用を明らかにしてゆくことが重要である。ヒト脳においてはこのようなタンパクの多くはリン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾をうけており、その変化がアルツハイマー病のプロテオーム変動に深く関わっている可能性がある。今回は、タンパクプロファイルの詳細を検討する目的で、脳タンパクをその分画ごとにプロテオーム解析(subproteomics)する。分画は、細胞質中の水溶性タンパク、疎水性の高い膜タンパク、そして難溶性のタンパク分画の三つにわけ、各分画でタンパクのプロファイリングと抗体や質量分析によりその同定を行い、お互いの関連づけを厳密に行う。これらのデータを背景にタンパクリン酸化と糖鎖付加の網羅的検討を行う。

〈研究開始時の研究計画〉

- ① ヒト脳タンパクの包括的なプロテオームデータベースの作製
- ② アルツハイマー病のプロテオーム変動の検出と同定
- ③ アルツハイマー病脳タンパクの特異的翻訳後修飾の検出

〈研究期間の成果〉

- ① ヒト脳の親水性および疎水性タンパクの可溶化による包括的なヒト脳プロテオームデータベースの作製 (1-7)
- ② ヒト親水性および疎水性タンパクのアルツハイマー病特異的変動の検出 (1-7)
- ③ 質量分析によるアルツハイマー病特異的変動タンパクの同定 (1-7)



ヒト脳の親水性分画 (A) および疎水性分画 (B) の二次元電気泳動法。矢印がAD群で発現量が変化していたタンパクを示す。

(分画 A)	
酵素 (6)	<ul style="list-style-type: none"> NADH dehydrogenase (ubiquinone)/Fe-S protein (75kDa) ↓ isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha precursor ↓ guanine deaminase ↓ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ↑ triosephosphate isomerase 1 ↑ brain creatine kinase ↑
シャペロンタンパク質 (3)	<ul style="list-style-type: none"> glucose-regulated protein 75 ↓ heat shock protein 70-2 ↓ similar to T-complex protein 1, epsilon subunit ↓
細胞骨格タンパク質とその関連タンパク質 (3)	<ul style="list-style-type: none"> tubulin alpha 6 ↓ tubulin beta 5 ↓ glial fibrillary acidic protein ↑
その他 (3)	<ul style="list-style-type: none"> synaptotagmin 1 ↓ mu-crystallin ↓ SH3 domain binding acid-rich protein like ↑
(分画 B)	
	<ul style="list-style-type: none"> glial fibrillary acidic protein (2) ↑

二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析により同定されたAD 脳で発現量が変化していたタンパク。↓は、発現量の減少、↑は、発現量の増加を示す。

〈国内外での成果の位置づけ〉

アルツハイマー病で大多数を占める孤発例の病因は、多因子かつ複合的で特定の病因に還元できるとは考えに

くい。全ての発現タンパク質を分離同定しその総体をデータベース化するシステムティックな検討、プロテオーム解析の成果は、疾病の病態の解明・診断・治療ならびに創薬開発などに大きく貢献できると考えられる。しかし、組織のプロテオームデータベースは心筋や肝臓など比較的均一な臓器のものに限られ、ヒトの脳組織のプロテオームデータベースはまだ公開されていない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

①高分子量タンパクのプロファイリング。その理由として、1.IPGゲルの特性、2.可溶化過程での分解などが考えられた。②塩基性タンパクのプロファイリング。その理由として、電気的浸透により、泳動結果に大きなゆがみや欠失を生じることが考えられた。③リン酸化タンパクのプロファイリング。抗リン酸化タンパク抗体を用いた方法ではスポットを確実に特定できなかった。

〈今後の課題〉

今後、①アルツハイマー病で変化を示した微量タンパクの同定、②膜タンパクの分離及びタンパクのリン酸化の検出には、さらに方法論的にいくつかの試行錯誤が必要である。③今回行ったスポットごとの群間比較のみでなく、タンパクネットワーク中でのアルツハイマー病での変化を抽出する解析が必要である。多変量解析のみならず新たなグラフィカルモデリングなどを用いたアプローチをする必要がある。アルツハイマー病は、その症状、経過、薬物に対する反応性、リスクの有無など個体差が大きい。もし、血清、髄液あるいは尿などのプロテオームプロファイルを用いてその診断、病型、経過などをモニターすることが出来れば大変有用な情報になるだけでなく、個体差の背景となるタンパク変動を解析することで、新たな治療薬開発に大きく寄与することになる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Tsuji T, Shimohama S, Kamiya S, Sazuka T, Ohara O: Analysis of brain proteins in Alzheimer's disease using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Neurol Sci* 166:100-106, 1989
2. Tsuji T, Shimohama S: Analysis of the proteomic profiling of brain tissue in Alzheimer's disease. *Dis Markers* 17: 247-257, 2001
3. Tsuji T, Shimohama S: Protein degradation in Alzheimer's disease and aging of the brain. *Prog Mol Subcell Biol* 29: 43-60, 2002
4. Tsuji T, Shiozaki A, Kohno R, Uoshizato K, Shimohama S: Proteomic profiling and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 27: 1245-1253, 2002
5. Shiozaki A, Tsuji T, Kohno R, Kawamata J, Uemura K, Teraoka H, Shimohama S: Proteome analysis of brain proteins in Alzheimer's disease: subproteomics following sequentially extracted protein preparation. *J Alzheimers Dis* 6: 257-268, 2004
6. Tsuji T, Shiozaki A, Shimohama S: The application of proteomics in neurology. *Current Proteomics* 2:41-53, 2005
7. 特許出願
発明の名称：アルツハイマー病のタンパク質分子レベルにおける検出方法（特願 2003-367480号）