

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790845  
 研究課題名(和文) 双極性障害患者由来リンパ芽球におけるミトコンドリアプロテオーム解析  
 研究課題名(英文) Mitochondrial Proteomic Analysis in the lymphoblastoid cells derived from patients with bipolar disorder  
 研究代表者  
 数野 安亜 (KAZUNO AN-A)  
 独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・リサーチアソシエイト  
 研究者番号：40360523

研究成果の概要：一卵性双生児双極性障害不一致例由来の培養リンパ芽球のミトコンドリア分画からタンパク質の回収を行い、蛍光標識2次元ディフュゼンシャルゲル電気泳動を用いて、一卵性双生児双極性障害不一致例におけるリンパ芽球のミトコンドリア関連タンパク質の比較解析を行った。その結果、両方で差異を示す可能性があるタンパク質が認められ、一卵性双生児双極性障害不一致例間で発現の変化するタンパク質群が存在することが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：脳神経疾患、プロテオーム、ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

双極性障害はその患者数の多さ、社会的影響、本人・家族の苦悩など、最も解明の待たれる精神疾患の一つである。双生児研究や家族研究より多数の遺伝子と環境因子の両方が複雑に関与していると考えられている。双極性障害の病態として、モノアミンおよび細胞内情報伝達系から気分安定薬の神経保護作用が注目されつつある。しかし、神経保護作用の分子基盤については様々な報告があり、未だ統一した見解はない。

これまでの研究では、双極性障害患者の MRS 所見で、細胞内 pH やクレアチンリン酸が低下しているなどの脳エネルギーの代謝異常

が確認されている。また、双極性障害では血球細胞のカルシウム反応が変化していることが報告されている。ミトコンドリアはエネルギー産生だけでなく、細胞内カルシウム動態に深く関与している。さらにミトコンドリア DNA 多型や欠失と双極性障害との関連がみられること、双極性障害死後脳を用いたマイクロアレイの解析ではミトコンドリア関連タンパク質が減少していることも報告されている。以上のことより双極性障害においてはミトコンドリア機能障害が起こっている可能性がある。

また、ミトコンドリア病において、気分障害の合併が報告されており、核遺伝子変異によ

る慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)と気分障害の併発の報告もある。さらに、脳特異的にミトコンドリア変異が蓄積する遺伝子改変マウスの行動学的解析が双極性障害と関連していることも報告されている。そこで、われわれは双極性障害では核にコードされたミトコンドリア DNA の複製や安定性に関与する遺伝子の mutation や多型が年齢と共にミトコンドリア DNA に欠失や mutation を蓄積させ、ミトコンドリアの機能障害を引き起こすのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究ではこのミトコンドリアの機能障害を双極性障害患者及び正常被験者由来のリンパ芽球を用いてミトコンドリアタンパク質を比較検討することで検出することを目的としている。具体的には双極性障害患者及び正常被験者由来のリンパ芽球を培養後、ミトコンドリア分画をそれぞれ分離し、ミトコンドリアからタンパク質を可溶化する。疾患の有無で蛍光標識をかえ、2次元電気泳動を用いて、疾患の有無で差のあるミトコンドリアタンパク質を同定する。

## 3. 研究の方法

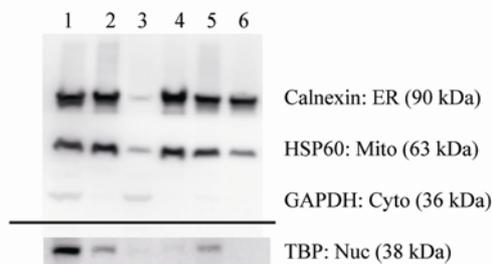
以前に作製され凍結保存されていた双極性障害患者および正常被験者由来のリンパ芽球を研究試料として使用した。凍結保存されたリンパ芽球を 20% FBS、50 U/ml Penicilin、50 µg/ml Streptomycin、60 µg/ml Tylosin を添加した RPMI-164 培地で起こし、細胞数が約  $1 \times 10^8$  個程度になるまで 10% FBS、0 U/ml Penicilin、50 µg/ml Streptomycin、60 µg/ml Tylosin を添加した RPMI-164 培地で培養を行った。培養したリンパ芽球は卓上型遠心機で遠心 (500×g、10 分間、4°C) して回収し、PBS で洗浄した後、さらに遠心して回収し、Qproteome Mitochondria Isolation Kit (QIAGEN) を用いてミトコンドリアを単離した。ミトコンドリアの単離には冷却式卓上型超遠心装置、Optima™ TLX Ultracentrifuge (Beckman Coulter) を使用した。単離の作業はすべて 4°C で行った。単離したミトコンドリア分画が、核や細胞質等、他の分画を含んでいないことを確認するため、ミトコンドリアの単離の過程で分けられた核分画、細胞質分画、マイクロソーム分画等を回収し、アセトン沈殿等を用いて、それぞれの分画におけるタンパク質の抽出・濃縮を行った。各タンパク質の濃度は Protein Assay kit (Bio-Rad)、スタンダードに牛血清アルブミンを用いて測定した。それぞれの分画について以下の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、分画が正しく行われたことを

確認した。細胞質分画については抗 GAPDH 抗体 (Abcam)、核分画については抗 TBP 抗体 (Abcam)、小胞体分画については抗 Calnexin 抗体 (Sigma)、ミトコンドリア分画については抗 HSP60 抗体 (Calbiochem) を使用した。上記の方法で単離したミトコンドリアは膜タンパク質などの疎水性タンパク質をより可溶化するバッファー (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4 % CHAPS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)) を用いて可溶化した。可溶化したミトコンドリアタンパク質は各種 (Cy2, Cy3, Cy5) の CyDye (GE Healthcare) を用いて蛍光標識を行った。蛍光標識方法はミニマルラベル法を用いた。疾患の有無で Cy3, Cy5 と標識をかえてそれぞれのタンパク質を蛍光標識し、同じゲル上で 2 次元電気泳動を行った。その際、発現変動解析を行うすべてのサンプルを等量ずつ混合し Cy2 ラベルしたものを内部標準として使用した。この一連の操作は GE Healthcare 社の Ettan-DIGE system を利用した。泳動後、ゲルは蛍光イメージスキャナーにて可視化し、スポット発現解析ソフトである DeCyder (GE Healthcare) を用いてスポットの検出、差のあるスポットの統計解析等を行った。

## 4. 研究成果

一卵性双生児双極性障害不一致例由来のリンパ芽球は、理化学研究所・脳科学総合研究センターにおける倫理委員会承認のもと、双極性障害患者および正常被験者に口頭および書面にて研究の意義、方法を十分に説明し、同意を得た上で採取した末梢血からリンパ球を分離し、EBV を用いて芽球化された。これらの細胞を起こし、培養リンパ芽球から高感度密度勾配を用いた方法により各分画を回収し、ミトコンドリア分画からタンパク質の回収を行い、ウエスタンブロットで確認を行った (下図参照)。

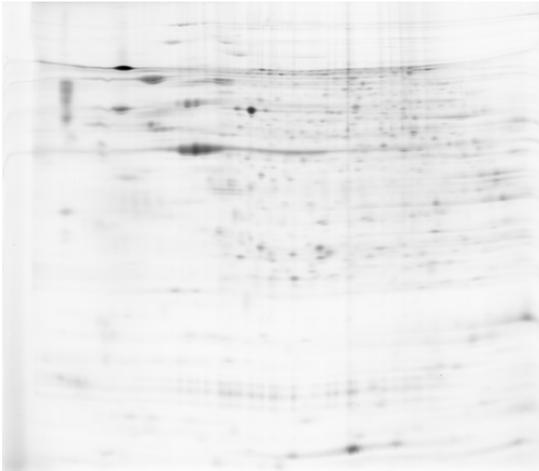
### Western blot analysis



- 1: Whole cell lysate
- 2: Cytosol
- 3: Nuclei
- 4: Mitochondria and ER
- 5: Mitochondria
- 6: ER

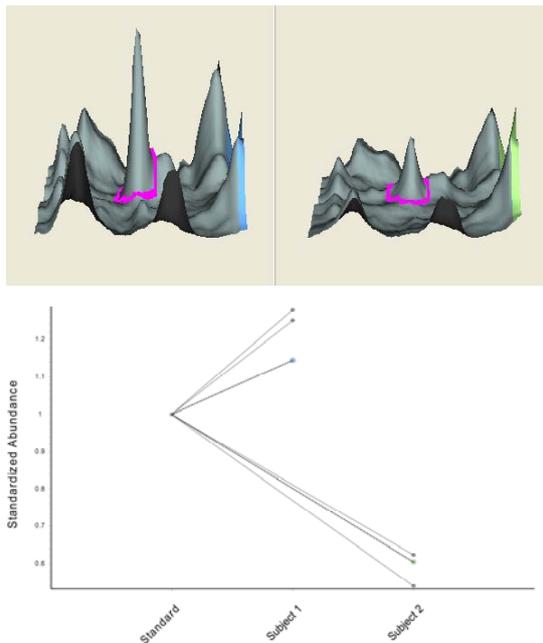
蛍光標識 2次元ディファレンシャルゲル電気泳動 (Two Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis : 2D-DIGE) を用いて、一卵性双生児双極性障害不一致例におけるリンパ芽球のミトコンドリア関連タンパク質の比較解析を行った。各サンプルを蛍光標識し、2次元電気泳動で分離した結果、約 3000 から 3300 のスポットが検出された (下図参照)。

Gel image



ほとんどのタンパク質の発現パターンは同じであり、これは一卵性双生児であるため多くのタンパク質の発現量が等しいものと考えられた。しかしながら、一部に両者で差異を示す可能性があるスポットが約 100 個程度認められた。

3D-image



以上の結果から一卵性双生児双極性障害不一致例由来のリンパ芽球において発現の変化するタンパク質群が存在することが分かった。これらは双極性障害と関連した分子である可能性があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① Kazuno AA, Munakata K, Mori K, Nanko S, Kunugi H, Nakamura K, Mori N, Yamada K, Yoshikawa T, Kato N, Kato T. Mitochondrial DNA haplogroup analysis in patients with bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 150B(2):243-7, 2009, peer reviewed.

② Kazuno AA, Munakata K, Tanaka M, Kato N, Kato T. Relationships between mitochondrial DNA subhaplogroups and intracellular calcium dynamics. *Mitochondrion.* 8(2):164-9. Epub 2007 Dec 23, 2008, peer reviewed.

〔学会発表〕 (計 5 件)

① An-a Kazuno、Mitochondrial DNA polymorphisms and intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008)、2008 年 12 月 12 日、神戸

② An-a Kazuno、Analysis of mitochondrial DNA polymorphisms and haplogroups in Bipolar Disorder、16th World Congress on Psychiatric Genetics (WCPG 2008)、2008 年 10 月 13 日、大阪

③ An-a Kazuno、Effect of mitochondrial DNA polymorphisms on responses to cellular stress、2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP、2008 年 9 月 12 日、富山

④ 数野 安亜、ミトコンドリアのカルシウム調節における G418 の影響について、第 7 回日本ミトコンドリア学会、2007 年 12 月 21 日、鹿児島

⑤ 数野 安亜、細胞質のカルシウム反応に影響するミトコンドリア DNA12358 多型と双極性障害の関連解析、第 29 回日本生物学的精神医学会・第 37 回日本神経精神薬理学会合同年会、2007 年 7 月 13 日、札幌

[その他]  
ホームページ等  
[http://www.riken.jp/index\\_j.html](http://www.riken.jp/index_j.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

数野 安亜 (KAZUNO AN-A)  
独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態  
研究チーム・リサーチアソシエイト  
研究者番号：40360523