

自己評価報告書

平成23年 4月 18日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2012

課題番号：20590594

研究課題名(和文) 髄液中の酸化蛋白質のプロテオーム解析によるアルツハイマー病早期診断マーカーの開発

研究課題名(英文) Proteomic investigation of oxidized proteins in cerebrospinal fluid for developing novel biomarkers of Alzheimer's disease.

研究代表者

戸田 年総 (TODA TOSIFUSA)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・

東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：80133635

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学

1. 研究計画の概要

(1) 二次元電気泳動および質量分析に基づく新たな酸化蛋白質のプロテオーム解析技術を開発し、臨床検査に適用可能なヒト髄液中の酸化修飾蛋白質の定量的分析技術を確立する。

(2) 新たに開発された酸化蛋白質のプロテオーム解析技術を用いてアルツハイマー病患者および軽度認知障害(MCI)患者の髄液中の酸化蛋白質を多角的に分析し、早期診断マーカーの候補となる蛋白質を絞り込む。

2. 研究の進捗状況

(1) 内部標準蛋白質を用いた蛍光標識二次元電気泳動によるカルボニル化蛋白質の定量分析法を開発し、患者髄液中の蛋白質のカルボニル化レベルを分析した。その結果、患者髄液においてトランスサイレチンのカルボニル化レベルが上昇する傾向が認められた。さらに症例数を増やし、バイオマーカー蛋白質を探索する指標としてのカルボニル化レベルの有用性について詳細な解析を行っている。

(2) 蛋白質中のシステイン残基の酸化レベルについても、内部標準蛋白質を用いた蛍光色素標識法による相対的定量法を開発し、患者髄液中の蛋白質の分析を行った。その結果、カルボニル化同様トランスサイレチンにおいて患者間で酸化レベルに変化が見いだされ、他の酸化修飾との相関性および、アルツハイマー病の症状の進行度とシステインの酸化の関係についてさらに詳細な解析を進めている。

(3) メチオニン残基の酸化については、新しい蛍光色素 Oriole とアスパラギン酸特異的な消化酵素を組み合わせによる質量分析

法を開発。高精度の定量分析を行うことが可能であることが確認された。今後本法を用いて髄液中のトランスサイレチンにおけるメチオニン酸化レベルの分析を行い、メチオニン酸化と認知症の関係を詳しく調べる。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

ヒト髄液中の蛋白質の酸化状態の指標として、カルボニル化、システインの酸化、およびメチオニンの酸化レベルを定量的に分析する技術を確立することができた。また、この技術を用いてアルツハイマー病患者および軽度認知障害(MCI)患者髄液中の主要な蛋白質の酸化レベルの解析を行った結果、トランスサイレチンが特に酸化を受けやすい蛋白質の一つであることを明らかとなった。また同じ蛋白質分子の酸化でありながら、これら3種の酸化のレベルには独立した動きが見られ、複数のアミノ酸残基における酸化状態を個別に定量分析し総合的に判断すること重要であることがわかった。

4. 今後の研究の推進方策

一連の解析の結果、特に髄液中のトランスサイレチンにおいてカルボニル化、システインの酸化、およびメチオニンの酸化が、脳内の酸化ストレス状態をモニターするためのバイオマーカーとして利用できる可能性が出て来たが、トランスサイレチンは、アルツハイマー病の原因および増悪因子と考えられているβアミロイドペプチドの単量体と結合親和性を有することがわかっており、トランスサイレチンにおけるこれらのアミノ酸残基の酸化修飾状態が、βアミロイドとの

結合親和性に影響をおよぼしていることが考えられる。今後さらに症例数を増やし、詳細な解析を行うことによって、アルツハイマー病の病態診断と重症化のリスクを予測するための新たなバイオマーカーとしての有用性を検証したいと考えている。

5. 代表的な研究成果

(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3件)

- ① Miura Y, Sato Y, Arai Y, Abe Y, Takayama M, Toda T, Hirose N, Endo T. Proteomic analysis of plasma proteins in Japanese semisuper centenarians. *Experimental Gerontology*. 46, 81-85, 2011、査読あり
- ② Toda T, Nakamura M, Morisawa H, Hirota M, Nishigaki R, Yoshimi Y. Proteomic approaches to oxidative protein modifications implicated in the mechanism of aging. *Geriatrics Gerontology International*, 10 (Supplement 1), S25-S31, 2010、査読あり
- ③ Nakamura M, Morisawa H, Imajoh-Ohmi S, Takamura C, Fukuda H, Toda T. Proteomic analysis of protein complexes in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by using blue-native gel electrophoresis: An increase in lamin A/C associated with heat shock protein 90 in response to 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress. *Experimental Gerontology*, 44(6-7), 375-382, 2009、査読あり

[学会発表] (計7件)

- ① 戸田年総、岩本真知子、森澤 拓、吉澤利弘、芝崎 太、脳脊髄液タンパク質の酸化還元状態の多角的プロテオーム解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会連合大会、2010年12月7-10日、神戸
- ② 戸田年総、中村 愛、酸化ストレスによるラミンのリン酸化と分子シャペロン複合体形成のプロテオーム解析、日本電気泳動学会第62回総会、2010年9月18-19日、札幌
- ③ Tosifusa Toda, Megumi Nakamura, Futoshi shibasaki, Toshihiro Yoshizawa, Proteome Analysis of Carbonyl Proteins in Cerebrospinal Fluid by Cy5-Hydrazide Labeling、HUPO 8th Annual World Congress、2009年9月26-30、Tronto、Canada
- ④ 戸田年総、中村 愛、廣田三佳子、森澤

拓、二次元目に Tris-Tricine 緩衝液系 SDS-電気泳動を用いた場合のスタッキング効果に影響を及ぼす緩衝液条件の検討：ミニゲル二次元電気泳動のための泳動条件の最適化、第60回日本電気泳動学会総会、2009年9月19-20日、松本

- ⑤ Motoji Sawabe, Tomio Arai, Yuko Saito, Takahiko Shimizu, Tosifusa Toda, Shigeo Murayama, Masashi Tonaka, Kaiyo Takubo, Makiko Naka, Noriko Tanaka, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital Autopsy Resource (TMGH-AR)、19th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics、2009年7月5-9日、Paris、France
- ⑥ 戸田年総、中村愛、森澤拓、岩本真知子、シアニン系蛍光標識試薬を用いたタンパク質フリーチオールレベルの定量分析法に関する基礎的検討、第59回日本電気泳動学会総会、2008年11月15-16日、東京
- ⑦ Tosifusa Toda, Megumi Nakamura, Hiraku Morisawa, Machiko Iwamoto, Junpei Ohkata, Hajime Sato, Hiroshi Tanaka, Kazutomi Kanemaru、An approach to the quantitative analysis of free thiol levels in human CSF proteins by the method of 2-D gel fluorimaging with using cyanine dyes and fluorescent gel stain、MPSA2008 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis、2008年8月26-29日、札幌