

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23780147

研究課題名（和文）神経変性疾患に関与する変性タンパク質の翻訳後修飾を指標とした定量解析法の開発

研究課題名（英文）The analytical method of post-translational modification to proteins related to the neurodegenerative disorder.

研究代表者

日坂 真輔 (HISAKA SHINSUKE)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：60583838

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスに起因する脂質過酸化のタンパク質に対する非酵素的翻訳後修飾を標的としたバイオマーカー評価法を構築するにあたり、本研究では対象の修飾構造及びタンパク質のアミノ酸配列を認識できるモノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体は、修飾構造（プロパノイル構造）及びその修飾部位近辺のアミノ酸配列をエピトープとして有していることが示唆された。また本抗体を用いた競合 ELISA 法により、定量解析が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, the monoclonal antibodies, which could recognize the propanoylation, one of non-enzymatic post-translational modification derived from lipid peroxidation products in addition to amino acid sequences of the target protein, were obtained to construct the quantification method of biomarker related to the neurodegenerative disorder. We constructed the competitive ELISA using this antibody and prepared the standard curve. These results suggested that it was possible to quantify the level of this modification *in vivo* as the biomarker.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：翻訳後修飾、脂質過酸化、モノクローナル抗体、ELISA、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素に代表される酸化ストレスは、近年、老化や神経変性疾患、癌、動脈硬化症などを含む生活習慣病の発症における重要なリスクファクターとして着目されている。この酸化ストレスは生体内における酸化還元バランスが崩れ、酸化側へとシフトした結果としてもたらされる、ある種の恒常性の破綻と考えられる。

この酸化ストレス下において DNA やタンパク質、多価不飽和脂肪酸の酸化といった生体分子の障害が増加することが認められている。そのため、これら生体分子の酸化障害

が蓄積した結果として疾患の発症に関与するもと考えられる。このように考えた場合、この酸化ストレスを、バイオマーカー等を通じて評価することで、疾患の発症における予兆を推し量ることが出来るのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、生体内における酸化ストレスを評価しうるバイオマーカーに着目し、その検出・定量法の構築を目的とした。

ここで特に着目したバイオマーカー候補としては、タンパク質における酸化ストレス

起因の特異な修飾構造を有する点に加え、その修飾を受けたタンパク質が酸化ストレスと関連する疾患の発症に寄与する可能性を有するものとした。

(1) 標的とするタンパク質候補

本研究では、神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病 (AD) の原因タンパク質と考えられているアミロイドβタンパク質に着眼した。AD は、認知症の中でも最も多くの比率を占める認知症の一つであり、今後の超高齢社会において、その病態解明が急がれる疾患の一つである。この AD 発症仮説のひとつであるアミロイド仮説の最も上流において、アミロイドβ タンパク質は重要な役割を果たしていると考えられている。そのため、発症の初発となるタンパク質に置ける酸化ストレスの関与を検証することにした。

(2) 特異な修飾構造 (プロパノイル化)

アミロイドβ タンパク質における修飾構造としては、ω-3 系の脂質過酸化に由来するアシル化構造 (プロパノイル化) に着目した。

これは、加齢を重要なリスクファクターとする神経変性疾患の発症における酸化ストレス説が徐々に受け入れられつつある背景を踏まえ、加齢に伴って亢進する脂質過酸化反応が生体内における酸化ストレスとして神経変性疾患の発症に寄与している可能性を考えたことによる。

さらに、加齢に伴う脂質過酸化物の脳内の蓄積や、AD 患者の脳内におけるドコサヘキサエン酸 (DHA) の減少も報告されていることから、DHA の酸化の亢進が寄与していることが強く推測される。

そして、このプロパノイル化は、この DHA の酸化物に由来し、脳内におけるタンパク質への修飾が生じた場合、この構造をバイオマーカーとして捉えることで評価できると考えた (Fig. 1)。

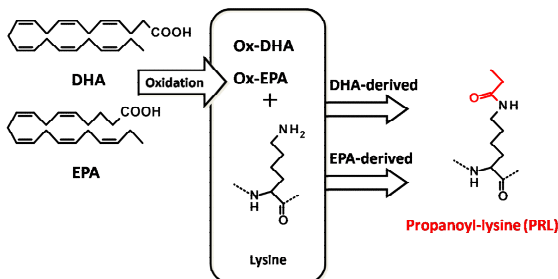


Fig. 1 プロパノイル化生成機構

以上の点を加味し、このプロパノイル化修飾構造を有するアミロイドβタンパク質の配列を選択的に検出・定量解析可能な評価法を構築することで、本バイオマーカーを疾患の

発症との関連性を定量的に示唆するものとして確立することが本研究の最終目標となる。

3. 研究の方法

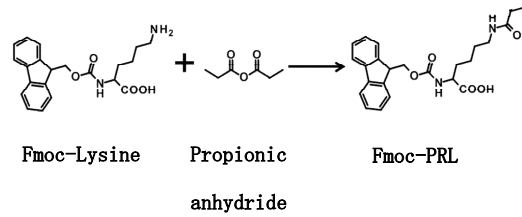


Fig. 2 PRL 抗原の作製

(1) 抗原の作製

抗原となるプロパノイル化構造を有するペプチドの合成には、まずプロパノイル化構造を有するアミノ酸の合成から開始した。これは、無水プロピオン酸を用いて *N*α-Fmoc-Lysine のε-アミノ基を修飾させることで調製した (Fig. 2)。

これを原材料として、ある程度のアミノ酸配列を有する標的タンパク質のペプチド断片を合成した。

以上のように合成したペプチドを用いてキャリアープロテインに縮合することで抗体作製のための抗原を作製し、本抗原をマウスへと免疫を行うことで抗体作製を開始した。

(2) モノクローナル抗体作製へのステップ

マウス血清中の抗体価の上昇を確認後、ミエローマ細胞との細胞融合により、抗体を産生し、増殖力を有するハイブリドーマ細胞を作製することで、最終的にはモノクローナル抗体としての樹立を目指した。

(3) 競合 ELISA 法の構築

作製したモノクローナル抗体による競合 ELISA 法を構築することで、標的タンパク質のペプチド配列に加え、プロパノイル修飾構造を合わせて検出・定量が可能な評価法の確立を目指した。この構築を行う際に既存のアミロイドβタンパク質の ELISA kit が生体試料の定量可能領域の参考となるため、対比として用いた。

4. 研究成果

(1) 免疫マウスにおける目的抗体の産生

標的タンパク質の部分配列において、プロパノイル修飾を施したペプチドをハプテンとする抗原をマウスにアジュバントとともに免疫した。追加免疫を繰り返し、本抗原に対する抗体の産生を、尾静脈より採取したマウス血清を用いた ELISA により確認した

(Fig. 3)。

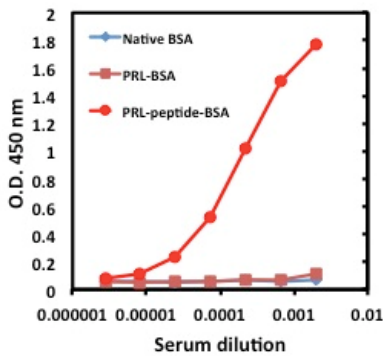


Fig. 3 マウス血清を用いた ELISA

これにより、マウス血清中において本抗原に対する抗体の産生が認められ、さらに特筆すべきことに、PRL-BSA (bovine serum albumin: ウシ血清アルブミン) との交差性が認められないことから本抗体のエピトープとして修飾構造 (プロパノイル構造) に加え、アミノ酸配列を必要としていることが示唆された。

(2) 抗体産生ハイブリドーマ細胞の作製

(1) のように免疫を繰り返したマウスより脾臓細胞を摘出し、ミエローマ細胞を用いた定法によりハイブリドーマ細胞を樹立することに成功した。この過程で PRL-BSA との交差性を有さない抗体の選択を行っている。したがって、得られるモノクローナル抗体は、抗原に対して非常に特異的な抗体となる。

最終的には 2 種のモノクローナル抗体を得ることが出来たが、この 2 種のうち、ELISA 法により適した抗体の選択を行った。この判断には、抗原に対してより低濃度で交差し得ることと、競合法で定量法を構築することを目指しているため、低濃度の競合物質と交差できる点を判断基準とした。

そして、最終的に得られたモノクローナル抗体は、競合 ELISA における最適化を行った結果、pmol/L オーダーでの定量が可能であることが認められた (Fig. 4 検量線)。

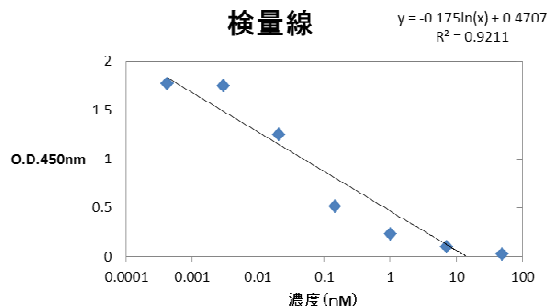


Fig. 4 Standard curve

これは、本研究で標的としているアミロイドβタンパク質の定量 ELISA Kit (高感度版) の感度とほぼ同レベルかそれ以上であり、実際にヒト生体サンプルからの検出・定量といった臨床応用への適応可能性を示唆している。

(3) この後の課題

今後さらに臨床応用へと向け、アミロイドβタンパク質を過剰に発現させたトランスジェニックマウスなどの疾患モデル動物における定量解析が考えられる。

これに加えて、本研究の背景として酸化ストレス惹起に伴う脂質過酸化物の関与の位置づけをより明確にする必要性も考えられる。つまり、加齢に伴う脂質過酸化の亢進が、そもそも何を起因として誘導されるかという点である。もちろん、酸化還元バランスの変化と考えられうるが、ここではこのバランスが崩れる要因のことを示している。加齢におけるこの観点を明確化することができれば、認知症を含む老年病の予防的観点から実験的な検証をすることも可能になると考えられる。

このような観点も留意し、モデル動物におけるバイオマーカーの経時的な推移や、修飾タンパク質の生成に伴う認知機能の変化など多くの検証すべき課題が考えられる。

一方で、実際のアルツハイマー病患者由来の生体試料 (血清や脳髄液) を用いた検証も行うことで、バイオマーカーの有用性や想定されるメカニズムが、実際にヒトにおける疾患の発症において関与しているのか実証する必要性も考えられる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

1. 発表者名: 日坂 真輔、発表表題: アミロイドβタンパク質における脂質過酸化に由来する翻訳後修飾の解析、学会名: 第 85 回日本生化学会大会、発表年月日: 2012 年 12 月 15 日、発表場所: 福岡県 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)

2. 発表者名: 日坂 真輔、発表表題: 多価不飽和脂肪酸は酸化ストレスを介して神経変性疾患を惹起しうるか、学会名: フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、発表年月日: 2012 年 10 月 25 日、発表場所: 愛知県 (名古屋観光ホテル)

3. 発表者名: 日坂 真輔、発表表題: 脂質過酸化に由来するタンパク質の翻訳後修飾の

解析、学会名：日本酸化ストレス学会東海支部設立シンポジウム、発表年月日：2012年2月18日、発表場所：愛知県(鶴友会館)

4. 発表者名：日坂 真輔、発表表題：神経変性疾患関連タンパク質における脂質過酸化に由来する翻訳後修飾の解析、学会名：第84回日本生化学会大会、発表年月日：2011年9月24日、発表場所：京都府(京都国際会館)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日坂 真輔 (HISAKA SHINSUKE)
名城大学・薬学部・助教
研究者番号：60583838

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：