

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590061

研究課題名(和文)酸化修飾アミロイドタンパクの定量的プロファイルと脳組織での探索

研究課題名(英文)Profiling analysis of post-translational oxidative modification of amyloid-beta in brain

研究代表者

井之上 浩一 (Inoue, Koichi)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：30339519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルツハイマー型認知症(AD)患者の剖検脳を対象とした実際のアミロイドペプチドの酸化修飾を含めた翻訳後修飾(PTM)の定量的解析に関する検討を実施した。実験では、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)を主軸に様々な分析条件を含めて、実検体への応用を試みた。その結果、実際にPTM型アミロイド(ラセミ化やイソ化)などが定量的に数～数十%存在していることを見出し、世界に先駆けて発見した。本研究より、実際のアミロイドは高い確率でPTMしていることを見出し、今後の病理へ展開できるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The spontaneous accumulation of chemical modifications within a bio-molecule can be regarded as an aging process. Since the post-translational modification of proteins in the brain may affect the folding and turnover regarding neurons, they reduce the activate protein functionality over time and may be linked to the neurodegenerative pathology. Alzheimer's disease is diagnosed by the progressive decline in cognitive functions, and has substantially increased among people aged 65 years or more, with a progressive decline in memory, thinking, affections, language, and learning capacity from the normal age-related decline in cognitive functions. This study is a first discussion of how research into one hypothesis, the so-called racemization/isomerization of aspartyl residues in amyloid peptides, is enabling researchers to identify ways to develop early and effective treatments for Alzheimer's disease.

研究分野：物理系薬学

キーワード：質量分析法 アルツハイマー 認知症

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症 (AD) の病理所見の一つにアミロイド ペプチドの沈着が観察される。実際にその老人斑の形成など詳細なことは分かっておらず、分子レベルでの解析が望まれた。生化学的分析手法は、抗体を用いた免疫染色が主であり、ペプチドの詳細な構造まで解析は及んでいない。申請者らは、アミロイド の酸化的修飾変化を理化学的分析手法により解析し、既にいくつかのアミノ酸残基で変化していることを見出していた。そこで、本研究では、実際の AD 患者の剖検脳に沈着した老人斑においても、このような翻訳後修飾変化 (PTM) が生じているのか解明するため、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) を採用し詳細を分析することとした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、AD 患者における剖検脳の解析を目指して、LC-MS を駆使した PTM アミロイド の定量解析・プロファイリングを行うこととする。既に、申請者は、酸化修飾変化を LC-MS による質量電荷比 ( $m/z$ ) 値を用いた詳細な解析により、His や Met アミノ酸残基の酸化修飾反応を見出していた。その基本的な概念を基軸にさらなる検討を行った。今回の PTM には、最も分析の難しいラセミ・異性化アミノ酸残基などを含む PTM を対象とした。

本研究で用いたヒト剖検脳は、既に臨床機関および基礎研究機関の倫理審査等の適切な対応のもと実施した。

### 3. 研究の方法

ヒト剖検脳からアミロイド 抽出には、様々な溶媒の検討を行い、グアニジン塩酸塩や高濃度ギ酸を用いることとした。また、精製には、固相抽出法を採用し、イオン交換型のものを最適とした。その後、ペプチドの定量的解析のため、安定同位体補正およびトリプシンフラグメントを分析対象とした。また、LC-MS には、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) および飛行型 (TOF) を採用した。

### 4. 研究成果

現在までにヒト剖検脳から実際にアミロイド ペプチドを効率的かつ高い精製能力を持った前処理法の検討は殆ど報告されていなかった。本研究では、初めて、ヒト剖検脳から効率的に前処理を行う手法を開発した。本手法の発展として、メタボロミクス解析にも応用でき、それに関しても報告してきた。また、酸化修飾のみならず、PTM の分析として最も難しいラセミ・異性化反応を詳細に定量でき、数～数十%の確率で老人斑に存在していることを初めて見出した。また、男女差や死亡年齢差などで特徴が観察され、今後の展開へつながるデータを所得したと思われる。さらに、メタボロミクス解析への応用

も試み、飛躍的なテーマとなった。本手法は、十分にヒト剖検脳へ応用でき、今までのような免疫染色のみならず、分子レベルでアミロイド を分析することが達成できた。

### 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 5 件)

Koichi Inoue, Haruhito Tsutsui, Hiroyasu Akatsu, Yoshio Hashizume, Noriyuki Matsukawa, Takayuki Yamamoto and Toshimasa Toyo 'oka

"Metabolic profiling of Alzheimer's disease brains."

*Scientific Reports*, 3, 2364 (2013)

Koichi Inoue, Daiju Hosaka, Nana Mochizuki, Hiroyasu Akatsu, Kaname Tsutsumiuchi, Yoshio Hashizume, Noriyuki Matsukawa, Takayuki Yamamoto, Toshimasa Toyo 'oka

"Simultaneous determination of post-translational racemization and isomerization of N-terminal amyloid- $\beta$  in Alzheimer's brain tissues by covalent chiral derivatized ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry."

*Analytical Chemistry*, 86, 797-804 (2014)

Koichi Inoue, Hirofumi Tsuchiya, Takahiro Takayama, Hiroyasu Akatsu, Yoshio Hashizume, Takayuki Yamamoto, Noriyuki Matsukawa, Toshimasa Toyo 'oka

"Blood-based diagnosis of Alzheimer's disease using fingerprinting metabolomics based on hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometry and multivariate statistical analysis."

*Journal of Chromatography B*, 974, 24-34 (2015)

井之上浩一、赤津裕康、豊岡利正

「展望：認知症の分析科学的アプローチ」

日本分析化学学会「ぶんせき」3月号, 132-139 (2013)

井之上浩一

「総説：アルツハイマー早期診断を目指したメタボロミクスの戦略」

日本医用マススペクトル学会「JSBMS Letters」39, March, 6-14 (2014)

[学会発表](計 13 件)

望月奈々、筒井陽仁、赤津裕康、関 俊哲、轟木堅一郎、山本孝之、井之上浩一、豊岡利正「アミロイド ペプチドの C-末端アミノ酸配列を利用したトリプシン分解-UPLC-MS/MS 定量法の検討」

新アミノ酸分析研究会 第2回学術講演会(東京) 2012年10月26日

赤津裕康、井之上浩一、望月奈々、福原崇臣、山本孝之、橋詰良夫、豊岡利正、遠山育夫「ヒト鼻粘膜・嗅球における A 解析と診断の可能性」  
第31回日本認知症学会学術集会(筑波) 2012年10月26-29日

井之上浩一、望月奈々、筒井陽仁、赤津裕康、関俊哲、轟木堅一郎、山本孝之、豊岡利正「ヒト脳組織中アミロイド を対象とした C-末端フラグメントターゲットの超高感度 UPLC-MS/MS の開発」  
第23回クロマトグラフィー科学会議(岐阜) 2012年11月16-17日

望月奈々、井之上浩一、赤津裕康、山本孝之、豊岡利正「アルツハイマー病患者の脳組織中の不溶性アミロイド に関する抽出法の検討」  
日本薬学会第133年会(横浜) 2013年3月27-30日

井之上浩一、保坂大樹、堤内 要、関俊哲、轟木堅一郎、豊岡利正「キラル誘導体化 UPLC-MS/MS 法による N-末端アスパラギン酸翻訳後修飾アミロイド の分離分析」  
第20回クロマトグラフィーシンポジウム(神戸) 2013年6月5-7日

保坂大樹、筒井陽仁、望月奈々、土屋浩史、井之上浩一、赤津裕康、松川則之、橋詰良夫、山本孝之、豊岡利正「質量分析法を利用する認知症研究へのアプローチと可能性 - UPLC-MS/MS による翻訳後修飾 N-末端アミロイド の解析」  
認知症研究を知る若手研究者の集まり 2013(湯河原) 2013年7月27-28日

井之上浩一、保坂大樹、望月奈々、土屋浩史、赤津裕康、松川則之、橋詰良夫、山本孝之、豊岡利正「微細構造修飾アミロイド の UPLC-MS/MS 分析法 - アルツハイマー患者の脳組織への応用」  
第26回バイオメディカル分析科学シンポジウム(東京) 2013年8月3日

保坂大樹、井之上浩一、赤津裕康、松川則之、橋詰良夫、山本孝之、豊岡利正「キラル誘導体化 UPLC-MS/MS によるアルツハイマー病脳中の翻訳後修飾 N-末端アミロイド の解析」  
第38回日本医用マススペクトル学会年会(神戸) 2013年9月26-27日

Koichi Inoue 「 Detection of Post-translational Racemization and Isomerization of Amyloid-beta by UPLC-MS/MS. 」

BIT 's 7th Annual World Protein & Peptide Conference (Dailian) 2014年4月25-28日

井之上浩一、赤津裕康、土屋浩史、高山卓大、松川則之、橋詰良夫、山本孝之、豊岡利正「アルツハイマー型認知症を対象としたメタボロミクス解析の応用」  
第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム(東京) 2014年8月20-21日

山本 誠、井之上浩一、赤津裕康、松川則之、橋詰良夫、山本孝之、豊岡利正「UHPLC-MS を用いたアルツハイマー病の標的プロテオミクス/メタボロミクス統合解析」  
第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム(東京) 2014年8月20-21日

井之上浩一、赤津裕康、土屋浩史、高山卓大、松川則之、橋詰良夫、山本孝之、豊岡利正「アルツハイマー病脳・血液のターゲットメタボロミクス解析」  
第39回日本医用マススペクトル学会年会(千葉) 2014年10月16-17日

井之上浩一、赤津裕康、土屋浩史、高山卓大、松川則之、橋詰良夫、山本孝之、豊岡利正「質量分析法を基盤とする認知症患者病理試料のノンターゲット多変量解析」  
第33回日本認知症学会学術集会(横浜) 2014年11月29日-12月1日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

井之上 浩一 (INOUE KOICHI)  
静岡県立大学・薬学部・講師  
研究者番号：30339519

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：