

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350917

研究課題名(和文)アルツハイマー病に関するカルパインの生体内基質・阻害剤の探索と動態解析

研究課題名(英文) Search for in vivo substrates and inhibitors of calpain related to Alzheimer's disease

研究代表者

津吹 聡 (TSUBUKI, SATOSHI)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・専門職研究員

研究者番号：20217368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の発症に関与しているカルパインを異常活性化させたカルパスタチン遺伝子欠損マウスと野生型マウスの海馬の初代培養細胞を使用して、カルパインの生体内基質の同定を試みた。回収した細胞抽出液を4つの画分に分画後、蛍光二次元電気泳動法により解析した。またカルパイン結合カラムを作製し、4つの画分を添加し、吸着したタンパク質を電気泳動後、銀染色したタンパク質スポットをゲルから切り出し、酵素消化後、質量分析によりタンパク質同定を行った。さらに同定したカルパインの生体内基質の可能性のあるタンパク質の特異的抗体を使用してウェスタンブロッティングを行い、動態を解析した。

研究成果の概要(英文)：I tried to identify in vivo substrates of calpain related to Alzheimer's disease using hippocampal primary neurons of calpastatin-ko and wild-type mice. I analysed four fractions of homogenates of primary neurons by two dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. Also I applied them to the calpain-binding column and identified the adsorbed protein as a in vivo substrate by liquid chromatography-mass spectrometry. And I tried kinetic analysis using the specific antibodies.

研究分野：生物化学・分析化学・有機化学・酵素化学

キーワード：アルツハイマー病 カルパイン カルパスタチン 二次元電気泳動 タンパク質同定 質量分析 遺伝子改変マウス 初代培養細胞

1. 研究開始当初の背景

生体内で重要な働きをしているタンパク質分解酵素であるカルパインは、カルシウムによって活性化される細胞内中性システインプロテアーゼであり、カルパインの異常活性化により、アルツハイマー病(AD)、筋ジストロフィー、糖尿病、胃腸疾患、ガン、白内障などを発症する。生体内では様々な酵素によって酵素反応が連続的に行われており、最初の酵素-基質反応の生成物が次の酵素反応の基質となって、順次代謝が進行していくことで、生命活動が維持されている。カルパインの異常活性化が関与している病気を研究する上で、異常活性化したカルパインの生体内基質を同定することは病気の予防や治療に結びつく端緒となり、基質切断部位の情報は特異的阻害剤の開発や基質切断部位特異的認識抗体の作製に有用である。

2. 研究の目的

生体内で重要な働きをしているタンパク質分解酵素であるカルパインの異常活性化は、ADをはじめ様々な病気の発症に関与している。従って、異常活性化したカルパインの生体内基質を同定することは、病気の予防や治療に結びつく端緒となるので、異常活性化したカルパインの生体内基質を同定することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) カルパインの特異的内在性阻害剤として知られているカルパスタチンの遺伝子を欠損させてカルパインを異常活性化したマウスおよび野生型マウスの海馬の初代培養細胞を使用する。海馬は記憶に関与し、ADにおいては多大な損傷を受ける部位である。また、初代培養細胞は生体から採取されてあまり時間がたっていないことから、生体と同様な挙動を示すことが期待される。カルパイン

を活性化させるためにグルタミン酸を添加した細胞あるいは未添加の細胞を回収し、細胞質画分、膜・オルガネラ画分、核画分、細胞骨格マトリックス画分の4つに分画する。

(2) (1)で作製した各画分からタンパク質以外の物質を除去し、ラベリング用バッファーに溶解後、タンパク定量を行なう。

(3) 各画分 50 μ g を蛍光試薬(Cy3-N-ヒドロキスクシンイミドおよび Cy5-N-ヒドロキスクシンイミドのジメチルスルホキシド溶液)(400pmol)でラベルし、蛍光二次元電気泳動(2D-DIGE)法により解析する。まず試料を等電点電気泳動用のゲルである Immobiline DryStrip(pH4-7 および 3-10NL, 13cm)に添加し、等電点電気泳動システム(Ettan IPGphor)にて等電点電気泳動を行った後、さらに二次元目の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行う。カルパスタチン遺伝子欠損マウスと野生型マウス間およびグルタミン酸添加の有無での各画分のタンパク質スポットを蛍光検出システム(Typhoon 9400)にて比較・解析する。その後、ゲルを質量分析用の銀染色を行い、グルタミン酸添加により増減するタンパク質スポットを切り出し、トリプシン消化後、高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)により解析し、タンパク質データベース(MASCOT)を利用して基質タンパク質を同定する。量が少なく基質タンパク質の同定が困難な場合は、等電点電気泳動するタンパク量を 200 μ g に増加する。

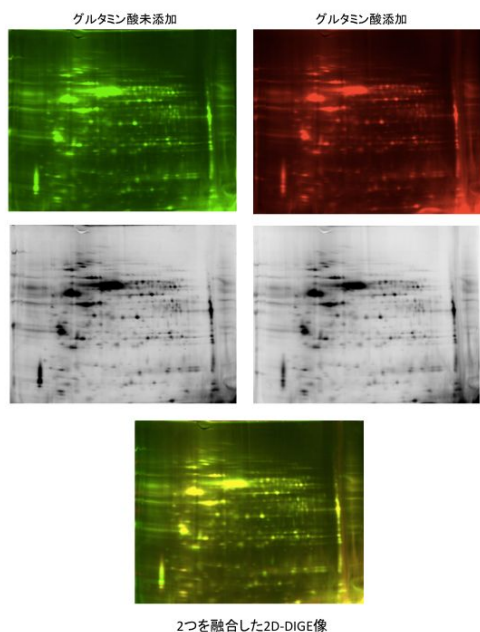
(4) 以上のような実験が計画どおりに進まない場合は、バイオラッドのアフィゲル(N-ヒドロキスクシンイミド基を有し、タンパク質やペプチドの第一級アミノ基およびチオール基と結合する)にカルパインを結合させたアフィニティーカラムを作製し、マウス海馬の初代培養細胞抽出液から調製した4つの画分や脳抽出液を添加後、カラムに結合したタンパク質を洗浄・溶出させる。カルパイン

結合カラムに吸着するタンパク質はカルパインに親和性をもつので、基質タンパク質である可能性がある。溶出液を電気泳動で分離後、質量分析用の銀染色を行い、スポットを切り出し、トリプシン消化後、LC-MS/MSによりタンパク質を同定する。

(5)特異的な抗体を使用して基質タンパク質かどうかを解析し、各種試料を用いて動態解析を行う。

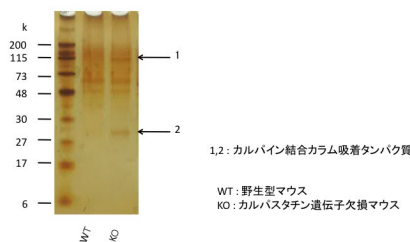
4. 研究成果

カルパスタチン遺伝子欠損マウス海馬初代培養細胞抽出液の細胞質画分を 2D-DIGE 法により比較した結果を以下に示した。

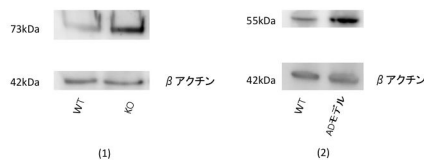


各種サンプルを比較・検討したが、今回用いた 2D-DIGE 法では、カルパインの基質として可能性のあるタンパク質スポットの検出が困難であったので、新たにカルパイン結合カラムを作製し、カラムに吸着するタンパク質の同定を試みた。抽出画分溶液をカラムに添加後、吸着したタンパク質混合物を溶出させ、SDS-PAGE を行い、質量分析用の銀染色後、タンパク質スポットをゲルから切り出し、トリプシン消化し、質量分析により同定した。

その結果、カルパインに高い親和性があり、基質の可能性のあるタンパク質を同定することができた。野生型マウスおよびカルパスタチン遺伝子欠損マウスの細胞骨格マトリックス画分のカルパイン結合カラム吸着タンパク質の銀染色図を以下に示した。タンパク質 1 と 2 は同じタンパク質の断片として同定され、カルパインの基質タンパク質である可能性を有した。



さらに同定したカルパイン結合カラム吸着タンパク質の市販の特異的な抗体を使用して、カルパスタチン遺伝子欠損マウスと野生型マウスの海馬の初代培養細胞抽出液、当該研究室で作製した AD モデルマウス(18 ヶ月齢)および野生型マウス(18 ヶ月齢)の脳抽出液のウェスタンブロッティングを行い、フラグメントタンパク質の動態を解析した結果を以下に示した。遺伝子改変マウスと野生型マウスにおいてフラグメントタンパク質の発現量の差が認められた。



カルパスタチン遺伝子欠損マウスと野生型マウスの海馬の初代培養細胞抽出液(1)および当該研究室で作製したADモデルマウスと野生型マウスの脳抽出液(2)のウェスタンブロッティング

今後、基質タンパク質のカルパインによる切断部位を HPLC 等を使用して同定し、切断部位認識抗体の作製や阻害剤を開発することにより、AD の発症メカニズムの解析や、予

防・治療に大いに貢献する可能性がある。

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)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 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：

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

津吹 聡 (Tsubuki Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合

研究センター・専門職研究員

研究者番号：20217368