

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461766

研究課題名(和文) A 産生機構の変化に関連する新規分子群の脳脊髄液中での探索

研究課題名(英文) Identification of molecules related to modulation of Amyloid beta production in human cerebrospinal fluid (CSF)

研究代表者

児玉 高志 (Takashi, Kodama)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員(常勤)

研究者番号：30512131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病ではアミロイドベータを産生する仕組みに何らかの異常が生じていると考えられている。本研究では、脳内の状態を反映する脳脊髄液を正確に調べ、アルツハイマー病発症のしくみに関する情報を得るために、脳脊髄液を高感度の液体クロマトグラフィー質量(LC/MS/MS)分析装置を用いて調べて、アルツハイマー病と関連して、どのような分子群がどのように変動するのかということを確認する方法の確立を目指した。その結果、数種の候補となる分子の存在を明らかにした。また、脳脊髄液中にごく微量存在するペプチドを高感度で定量することができた。

研究成果の概要(英文)： In this study, molecules in human cerebrospinal fluid (CSF) have been investigated using LC/MS/MS measurements and amino acid sequence search using public and home-developed databases. The purpose of this study is to establish a method to identify and quantify peptides which is related to the modulation of gamma-secretase and beta-secretase activities in Alzheimer's disease (AD). We have identified 102 of membrane proteins, 54 of disease associated proteins, and 2 of neurodegeneration-related proteins in human CSF. We also developed and improved an advanced liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method to determine the concentration of sub-femtomolar order of APLP1 derived peptides which is an established molecular marker of AD.

研究分野：生物物理学

キーワード：アルツハイマー病 質量分析 アミロイドベータ産生機構 APL1ベータペプチド

1. 研究開始当初の背景

認知症の中で大きな比率を占めるアルツハイマー病では、アミロイドベータ前駆体蛋白質と呼ばれるたんぱく質が切断されて生ずるアミロイドベータの異常が病態と密接に関連すると考えられている。(アミロイド仮説) しかし、そもそもアミロイドベータ産生機構の異常がなぜ生ずるのかという点に関しては、未解明のままである。アルツハイマー病発症の仕組みを深く理解するため、そして、病気の進行のごく初期に的確な診断を行うためには、分子レベルでの理解を進展させる必要があった。

2. 研究の目的

アルツハイマー病では、病気の進行のごく初期から脳内でアミロイドベータを産生する仕組みに何らかの異常が生じていると考えられている。本研究では、脳内の分子レベルでの状態を反映するヒト脳脊髄液について、その中に存在する分子群の存在量や量比を正確に調べ、アルツハイマー病発症のしくみに関する情報を得るために、脳脊髄液を高感度の液体クロマトグラフィー質量(LC/MS/MS)分析装置を用いて調べて、アルツハイマー病と関連して、どのような分子群がどのように変動するのかということを正確に評価する方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 脳脊髄液中に存在する各種低分子化合物、ペプチドの量を再現性よく網羅的に定量するために、試料の前処理の方法、液体クロマトグラフィーでの分離の条件を検討した。
- (2) LC/MS/MS型質量分析装置により評価できる分子群のピークを探索し、それがどのような分子種に由来するのかを同定し、さらに感度を上げる条件を決めることを試みた。
- (3) アルツハイマー病との関連を詳細に調べ

るため、培養細胞外液を用いた実験を可能にするため、上述の実験で得られた候補に関する特異抗体を作成した。

4. 研究成果

本研究ではアルツハイマー病で、病気の進行と密接な関係にあると考えられているアミロイドベータと呼ばれるペプチドを産生する仕組みが、アルツハイマー病の発症、進行に伴って変化していると考え、その際に、それに伴って脳脊髄液中で量が変動するアミロイドベータ以外の分子群を探し出して同定することが重要であると考えた。そのため LC/MS/MS 型液体クロマトグラフィー質量分析装置によって脳脊髄液中の物質群を測定し、同定、定量する方法を確立することをめざした。まず、ヒト脳脊髄液(CSF)中に多量に存在するアルブミンなどの分子量の大きなタンパク質を除去して測定を行ったが、その結果、脳脊髄液中には当初の予想をはるかに超えた非常に多くの分子種が存在しており、その個人差も非常に大きいことが分かった。このことから、脳脊髄液中に存在するペプチドなどの分子群に対して直接、網羅的な定量を行う際の問題点が明らかになった。そこで、さらに条件を絞り込んで、アルツハイマー病との関連を評価することができそうな分子群の候補を得るため、アフィニティー樹脂やゲル濾過による分子量の分画を行うなどの処理と組み合わせる質量分析装置による測定を行うことにより、多くのペプチド配列に関する情報を得た。そして、これらアミノ酸配列の情報が得られたペプチドについて、さらに詳細に配列情報を精査し、102種類の膜タンパク質、54種類の疾患関連蛋白質、2種類の神経変性疾患関連蛋白質などに由来するペプチドであることが明らかになった。このうち神経変性疾患と関連することがすでに知られている蛋白質の断片は、アミロイド前駆体タンパク質(Amyloid beta A4 protein)とアミロイド様蛋白質1(Amyloid-like protein 1/ APLP1)由来のペ

プチドであった。これらのうち、膜タンパク質に由来するペプチド断片(さらにそのうちの 27 種類のペプチドはアミロイド前駆体タンパク質と同じ I 型膜タンパク質に由来するもの)について、ガンマセクレターゼ複合体、ベータセクレターゼの酵素活性の基質となりうるものが存在するかどうかについて個別に検討した。その結果、今回、本研究により脳脊髄液中に存在することが確認された候補の分子群の中の ORAI1/CRACM1/TMEM142A(Calcium release-activated calcium channel protein 1/ Protein orai-1/Transmembrane protein 142A) や V-set and immunoglobulin domain-containing protein 2(CT-like protein /Cortical thymocyte-like protein) などを含む数種の候補を選び、それらのペプチドに対する特異抗体を設計、作製することにより、培養細胞外液を用いた実験が可能になった。

また、定量的解析の際の参照として用いる三種の APL1beta ペプチドに関しては、質量分析装置による MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定によって、より高感度にフェムトモル(fmol)以下の量のペプチドを定量する系を確立することができた。

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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

学会 1

演題名等

Determination of APL1 β Peptide Concentration in Cerebrospinal Fluid (CSF) by ELISA

演者

Takashi. S. Kodama, Masayasu Okochi, Sinji Tagami, Kanta Yanagida, Naoki

Mizuta, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda

会名 場所 年月日

Neuro2013, 21 June 2013, Kyoto, International Conference Center

学会 2

演題名

Identification and quantitative analysis of APL1 β peptides in human cerebrospinal fluid (CSF)

演者

Takashi. S. Kodama, Masayasu Okochi, Sinji Tagami, Kanta Yanagida, Naoki Mizuta, Toshihisa Tanaka, Takashi Morihara, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda

会名 場所 年月日

WFSBP 2013 congress Kyoto, 27 June 2013, Kyoto, International Conference Center

学会 3

演題名

Identification and quantitative analysis of short peptides derived from amyloid-beta peptides in living cell

演者

Kodama T.S., Okochi M., Tagami S., Yanagida K., Mizuta N., Tanaka T., Morihara T., Kudo T., Takami M., Ihara Y., Takeda M.

会名 場所 年月日

IPA's 16th International Congress, 2

October 2013, Seoul Korea, COEX

学会 4

演題名

アミロイドベータ産生機構解析のための細胞内ペプチドの測定

演者

児玉高志、大河内正康、田上真次、柳田寛太、高見真子、井原康夫、武田雅俊

会名 場所 年月日

第 25 回日本老年医学会近畿地方会
和歌山県立医科大学 紀三井寺キャンパス
基礎教育棟 3 階 生涯研修センター
和歌山市 2014 年 10 月 11 日

学会 5

演題名

細胞内に存在する A β 由来のオリゴペプチドの LC-MS/MS による測定

演者

児玉高志、大河内正康、田上真次、柳田寛太、水田直樹、高見真子、井原康夫、武田雅俊

会名 場所 年月日

第 33 回 日本認知症学会学術集会
パシフィコ横浜 会議センター 横浜
2014 年 11 月 29 日、30 日、12 月 1 日

学会 6

演題名

ヒト血漿中に存在する A β ペプチドのサロゲートマーカー APL1 の LC-MS/MS による測定

演者

児玉高志、大河内正康、田上真次、柳田寛太、森原剛史、田中稔久、工藤喬、朝長毅、武田雅俊

会名 場所 年月日

第34回日本認知症学会学術集会

2015年10月2日(金)~4日(日)

会場：リンクステーション青森・ホテル青森

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 高志 (KODAMA, Takashi)

大阪大学医学研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：30512131

(2) 研究分担者

大河内 正康 (OKOCHI, Masayasu)

大阪大学医学研究科・講師

研究者番号：90335357

(3) 研究分担者

田上 真次 (TAGAMI, Shinji)

大阪大学医学研究科・助教

研究者番号 40362735

(4) 研究分担者

柳田 寛太 (YANAGIDA, Kanta)

大阪大学医学研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号 70467596