

平成 22 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591027

研究課題名 (和文) 脳カルボキシペプチダーゼ B 特異的結合蛋白の機能解析と認知症病態
診断学的意義の解明研究課題名 (英文) Analysis of the function of human brain carboxypeptidase B and its
diagnostic significance in dementia of Alzheimer's type

研究代表者

松本 明 (MATSUMOTO AKIRA)

姫路獨協大学・薬学部・客員教授

研究者番号：80181759

研究成果の概要 (和文)：

1. ヒト脳におけるベータアミロイドペプチドの C 端消化機能の担い手であると推定される HBCPB と、そのヒト髄液中および血液中の結合蛋白 CPB-BP 1 および 2 との結合部位 (binding pocket) 解析結果。両蛋白の 1 次構造を基盤とした抗体を用いるエピトープマッピングから解析したところ、十分な特異性と感受性を併せ持つモノクロナル抗体が得られ、その結合阻害活性の解析から特異性・感受性とは別に、立体構造認識の差異に基づくと思われるグループ分けができ、今後結合ポケットの立体構造解析を進め、創薬ターゲット解析の視点から新たな研究計画を立案する基盤構築ができた。

2. ヒト血清中 CPB-BP およびその近縁蛋白の探索と解析について。ハイスループット解析を可能にするため、表層プラズモン解析装置を質量分析器と組み合わせ、CPB-BP およびその関連分子の同定解析を行った。即ち CPB の C 端エピトープ分子に対応したオリゴペプチドをリガンド分子として、精製ヒト血清検体 (大量発現蛋白除去血清) を解析した。免疫沈降法で得られた分子が同様に同定された他、その候補分子との相互作用が確認されている新たな分子が同定された。上記項目の解析結果との関連性も含め、同じ視点からの研究計画を構築が可能となった。

3. 病理標本の免疫組織化学。上記で作成し、特異性・比活性を確認したモノクロナル抗体を用い、AD 由来脳および正常人高齢者由来脳の比較免疫組織化学解析を行った。AD 脳及び一部の正常老人脳では海馬病態部位での CPB-BP 2 免疫活性の沈着が著明であった。

研究成果の概要 (英文)：

1. Biochemical and *in silico* analyses of the CPB-BP binding pocket of human brain carboxypeptidase B (HBCPB): In an attempt to understand the mechanism of action of HBCPB and its specific binding protein, CPB-BP (1 & 2), we have started an epitope mapping analyses by using antibodies generated based upon primary structures of the both proteins. These monoclonal antibodies (6 clones) exhibit sufficient specificity and sensitivity, and analyses of binding to CPB-BP (1 & 2) and its regulation have enabled classification of these in terms of difference in three-dimensional structures, apart from specificity and sensitivity. This achievement embodies a basis for structural analysis of the binding pocket and SBDD in the next experimental program.

2. A search and analysis for CPB-BP and related proteins in human serum. To facilitate HTP analyses for this purpose, the surface plasmon interaction analysis in combination with MALDI-TOF-MS was utilized. Using a peptide ligand corresponding to the C-terminal epitope of CPB, human peripheral serum samples, from which major abundant proteins were removed, were analyzed. In addition to the successful identification molecules previously determined by immunoprecipitation, a new molecule was identified, with which an interaction to the candidate molecule is recognized.

3. Immunohistochemical analyses of pathological specimen. All AD brain samples and a portion of brain samples from the normal aged both exhibit CPB-BP2 immunoreactivity in the hippocampus.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病、軽度認知機能障害、カルボキシペプチド B、立体構造認識、モノクロナル抗体、ベータアミロイド、CPB 結合蛋白、結合ポケット

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎える先進各国ではアルツハイマー病(AD)およびその前駆的病態と考えられている軽度認知障害(MCI)の病態に根ざした診断薬・治療薬開発に対して強い要請がある。家族性アルツハイマー病の研究成果から、神経毒性の強いアミロイド(A-beta)分子種の増加が原因遺伝子に関わらない共通した異常形質であることが明らかになった。しかし治療対象となる患者の殆どは遺伝的背景の明かでない孤発性ADであり、さらにこれらの患者脳ではA-beta 1-42の発現増加よりむしろその分解・消化の低下がその基本病態にあると考えられつつある。HBCPBは筆者らが新たに発見・解析・同定した新規酵素でヒト脳での局在が海馬など記憶学習・認知機能の中核での局在が顕著であること、本酵素が合成A-betaペプチドのC端側アミノ酸の消化作用を持つのみならず、記憶学習機能の電気生理学的示標である長期増強現象障害作用を持つA-betaオリゴマーを解離すること、髄液中に分泌されているなどユニークな特色をもつ。また、国際共同研究により日本人およびハンガリー人の孤発性AD脳の全例で、海馬菱形ニューロンでのHBCPB発現が著明に減少していることを確認した。一方ヒト髄液中HBCPBの診断学的意義を解明するため、多様な髄液検体に対しHBCPBおよびA-beta各分子種の定量・定性的解析を質量分析(抗体相互作用法)により行い、その解析情報と各検体提供者の臨床情報(疾患、痴呆

の客観評価、検査所見、画像情報など)相関検索により、その診断学的意義の解明を試みた。解析した検体(AD群22例、MCI群9例、病態対照群221例)情報の相関解析から、HBCPBペプチドのAD/MCI病態マーカーとしての有用性を明らかにし、質量分析(MS)手法に至適化した検体の前処理法、相互作用手法、MS解析手法を確立した。さらにヒト髄液中におけるHBCPB結合蛋白の探索のため、複数の正常群髄液3検体から調整、解析を行ったところ、夫々から同一の蛋白(CPB-BP)を確認した。精製したCPB-BPは*in vitro*でHBCPBおよびその特定のフラグメントと中性域pHで、1:1のモル比で結合すること、HBCPBの合成A-betaペプチドのC端側アミノ酸の消化作用とA-betaオリゴマー解離作用を共に阻害する機能を有することを確認した。ヒト髄液中ではHBCPBの重要な生理機能と考えられるA-beta 1-42の消化作用、およびオリゴマー乖離作用が、CPB-BPとの結合キネテックスにより適正に制御されている機構が伺われた

2. 研究の目的

- (1) 検体(髄液及び血清)中CPB-BPの測定・解析(質量分析を含む)に至適化したモノクロナル抗体の作成。
- (2) 各病態由来の髄液検体について、単独のCPB-BPと、HBCPBと結合したCPB-BPを夫々区別して抗体相互作用質量分析により定性・

定量解析を行い、両者の AD / MCI 病態診断マーカーとしての意義を解明する。

(3) ヒト血清中 CPB-BP およびその近縁蛋白の探索と解析

(4) 病理標本等の免疫組織化学

3. 研究の方法

(1) 一般生化学的手法およびマウス脾臓細胞系ハイブリドーマ作成手法。

(2) 表層プラズモン共鳴解析および MALDI-TOF 質量分析手法。蛋白高次構造ソフトを用いた *in silico* 構造解析。

(3) 一般生化学的手法

(4) 免疫組織化学手法

4. 研究成果

(1) HBCPB の CPB-BP 結合部位 (binding pocket) の解析について：HBCPB とその特異的結合蛋白である CPB-BP の作用機作の解析を目的として、両蛋白の 1 次構造を基盤とした抗体を用いるエピトープマッピングから解析を進めたところ、十分な特異性と感受性を併せ持つモノクロナル抗体が複数 (6 クローン) 得られ、クローン毎に CPB-BP との結合能の制御の解析を行った。結合阻害活性の解析から、特異性、感受性とは別に立体構造認識の差異に基づくと思われるグループ分けができ、今後さらに結合ポケットの立体構造解析を進め、創薬ターゲット解析の視点からも新たなプロジェクトで研究を推進したい。

(2) ヒト血清中 CPB-BP およびその近縁蛋白の探索と解析について：多検体についてのハイスループット解析を可能にするため、表層プラズモン解析装置を質量分析器と組み合わせ、CPB-BP およびその関連分子の同定解析を行った。即ち CPB の C 端エピトープ分子に対応したオリゴペプチドをリガンド分子として、精製 (アルブミン、免疫グロブリンの抗体アフィニティカラムによる除去) したヒト血清検体を解析した。免疫沈降法で得られた分子が同様に同定された他、その候補分子との相互作用が確認されている新たな分子が同定された。上記項目の解析結果との関連性も含め、上項と同様の視点から新たなプロジェクトで研究を推進したい。

(3) 病理標本等の免疫組織化学について：(1)

(2) の研究で作成し、特異性・比活性を確認したモノクロナル抗体を用い、AD 由来脳および、正常人高齢者由来脳の比較免疫組織化学解析を行った。AD 脳では海馬病態部位での CPB-BP 免疫活性の沈着が著明であった。

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3件)

Akira Matsumoto, Reiko Matsumoto, Keiichi Kadoyama, Shogo Matsuyama, et al. (6名中1番目) Quantitative analysis of beta-amyloid peptides expressed in human cerebrospinal fluid by an improved method of antibody-assisted time-of-flight mass spectrometry. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 査読有, 15, 2009, 205-210.

Takano Masaoki, Otani Mieko, Shogo Matsuyama, Akira Matsumoto, et al. (9名中6番目) Use of a phosphosensor dye in proteomic analysis of human mutant *tau* transgenic mouse. Neuro-report, 査読有, 20, 2009, 1648-1653.

Shogo Matsuyama, Akira Matsumoto, et al. (4名中4番目) Long-term potentiation-like facilitation through GABA-A receptor blockage in the mouse dentate gyrus in vivo. 19, 2008, 1809-1813.

[学会発表](計1件)

Taizo Taniguchi, Akira Matsumoto, Shogo Matsuyama, et al. Parkinsonism induced by tauopathy: analysis of SJLB mice, The 2009 ISN/APSJ joint meeting, Aug. 24, 2009, Busan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 明 (MATSUMOTO AKIRA)

姫路獨協大学・薬学部・客員教授

研究者番号：80181759

(2) 研究分担者

松山 正剛 (MATSUYAMA SHOGO)

研究者番号：80243319