

【目的】 タンパク質は合成と分解の代謝回転により常に入れ替わっている。しかし、一部のタンパク質は、産生された後分解されず生涯使い続けるものが知られている。このような長寿命タンパク質の機能維持には、代謝回転とは異なる品質管理が求められる。アルツハイマー病脳の神経細胞にはタウタンパク質の異常蓄積が認められ、神経変性に関与しているとされている。この異常蓄積が分解系の異常に起因していると想定される一方、タウが実はほとんど分解されない長寿命タンパク質である可能性も提唱されている。タウの異常蓄積メカニズムの解明にむけて、脳内におけるタウの半減期を明らかにする必要がある。タンパク質の半減期解析は、同位体による一過性の標識（ラベル）とその後の定量的追跡（チェイス）からなる。生体を対象とした応用例はあるものの、従来法では同位体標識のコストや質量分析計の精度の点で正確な測定が困難であった。そこで本研究では、体内窒素のごく一部を安定同位体である ^{15}N で置換し、高精度の二次イオン質量分析法を用いて同位体を定量することにより生体内タンパク質の半減期を測定する解析系の開発を目的とした。

【方法】 >98%の窒素が ^{15}N で構成されているスピルリナを一定濃度混入させたマウス用飼料を作製した。C57BL/6系統マウスについて交配を行い、膈プラグの形成を確認するとともにラベル化飼料に変更し、出産後も継続して飼育した。生後28日目において離乳後、産仔について通常飼料に変更し継続飼育させた。各解析時期においてマウスより組織を採取し、冷凍保存させた。飼料および採取した組織より総タンパク質画分を調製し、一部をタンパク質、一部を2次イオン質量分析計による窒素原子の同位体解析を行った。

【結果】 はじめに、二次イオン質量分析計の感度と精度について検証を行った。任意のタンパク質量に調製したリコンビナントタウにイオンビームを照射し、検出されるイオン数から安定して検出できるタンパク質量を検討した。その結果 $0.1\mu\text{g}/\text{spot}\sim 1.0\mu\text{g}/\text{spot}$ の範囲で安定してイオン化した同位体を検出できた。また ^{15}N 標識および未標識のスピルリナからタンパク質を抽出し、任意の割合で混和した試料を同位体分析することで二次イオン質量分析計の精度について検証した。その結果、 ^{15}N の天然存在比0.364%に対し、わずか0.1%の混入であっても正確に分析できることを確認した。次に ^{15}N で標識した飼料をマウスへ一定期間投与し、採血、大脳皮質の摘出を行った。血漿、大脳皮質タンパク質を抽出し、これらの組織タンパク質がどの程度 ^{15}N によって標識されるかどうかを検証した。その結果、血漿、大脳皮質タンパク質ともに餌に含まれるタンパク質中の ^{15}N と同程度にまで標識された。さらに ^{15}N ラベル後、5週間のチェイスを行った結果、血漿タンパク質では通常飼料中の ^{15}N 濃度にまで低下したのに対し、大脳皮質由来のタンパク質では ^{15}N の残存が認められた。

マウスを用いたタンパク質寿命測定法の概要

