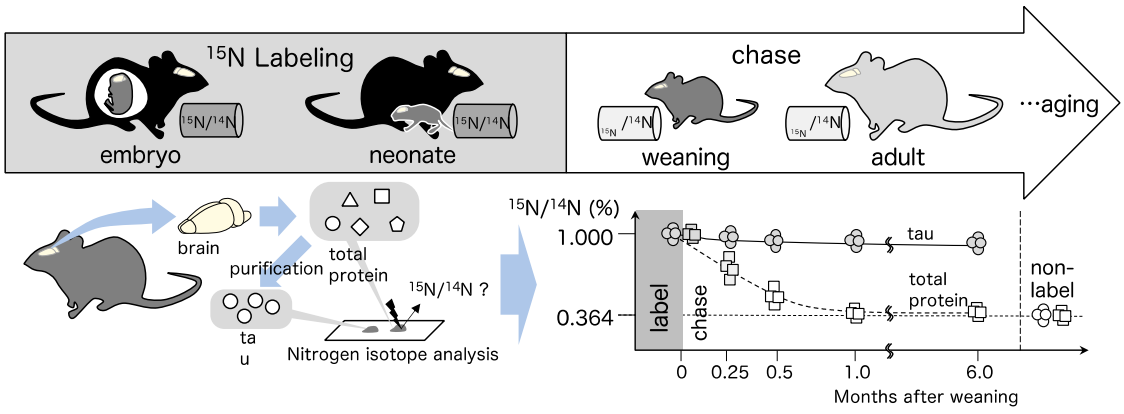
94　生体元素分析技術を用いた脳疾患タンパク質の寿命解析	宮坂　知宏

【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、膣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 μg／spot～1.0 μg／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



94. 生体元素分析技術を用いた脳疾患タンパク質の寿命解析

宮坂　知宏

同志社大学 生命医科学部 神経病理学研究室

Key words：タウ，長寿命タンパク質，半減期，チューブリン，安定同位体

緒　言

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。その速度はタンパク質ごとに異なり、このバランスが個々の発現量を決めている。一般的なタンパク質の半減期は平均すると約 2 日程度とされているが［1］、一部は、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［2］。例えば、核膜孔タンパク質はその半減期が 1 年以上とされ、目の水晶体を構成するクリスタリンは生涯入れ替わらないとされている。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。

タウは神経細胞の軸索に局在する微小管結合タンパク質（Microtubule associated proteins : MAPs）である。一方、アルツハイマー病（Alzheimer's disease）などの認知症脳では、その特徴的な病理変化として細胞体や樹状突起に異常局在したタウの凝集・蓄積が認められる。このようなタウ病変の出現部位及び頻度が認知症症状の進行とよく一致することから、タウの蓄積は神経変性に深く関与すると考えられている［3］。タウ蓄積のメカニズムについては多くの解析がなされているものの、未だ本質的な原因については不明である。

当グループの先行研究により、内在性タウは脳発達初期に盛んに産生され、生後 2 週目以降は脳成熟に伴い顕著に発現低下すること、およびこの発現パターンに反して恒常的に発現させたタウは、細胞体や樹状突起に異常局在し、やがてタウ病変を形成することが明らかとなった［4］。これより、成体脳で正常に軸索局在化するタウは、脳発達初期に産生されたものであり、ほとんど代謝回転されていない可能性が示された。これらの知見から、タウは超長寿タンパク質であり、その発現には厳密な制御が必要である事、さらに成熟脳において異所性にタウが発現・過剰となることで病理形成に至るという仮説を見出した。しかし、これまでにタウの生体内におけるその半減期は明らかとされていない。仮に代謝回転が速く半減期の短いタンパク質であれば、異常蓄積の原因はタウの分解系の異常が疑われる。一方、半減期の長い長寿命タンパク質であれば、異常蓄積の原因はタウの産生異常であると考えられる。したがって、タウ凝集蓄積メカニズムの解明およびタウ関連神経変性疾患の治療法の戦略立案に向けて、生体内におけるタウの半減期を明らかにすることが必要不可欠である。

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として、従来のタンパク質半減期測定法は、窒素同位体^{15}N からなる飼料によりマウス体内のタンパク質を^{15}N 標識あるいはその後、通常飼料に切り替えて飼育した際の体内タンパク質に含まれる^{15}N／^{14}N 比を質量分析法により検出し、その比の変化からタンパク質代謝速度を算出するというものである［5］。しかし、質量分析計の性能から高い同位体標識が求められ、100%^{15}N 含有飼料（約 200 万円／kg）を数世代にわたり与えてマウス体内の窒素をほぼ^{15}N に置き換える必要があり、非常に高コストかつ低精度であった。特定のタンパク質についての解析を想定すると、標識後の脳から対象とするタンパク質を精製し同位体解析する必要があり、タウの半減期決定への応用を考えると従来法は現実的な実験手法とは言えない。そこで本研究では、探査機はやぶさ 2 の試料分析にも用いられた高性能な元素分析法である二次イオン質量分析を用いることとした。これにより、従来の手法よりもごく微量なタンパク質窒素同位体検出を可能とし、より安価でかつ汎用性の高い脳内タンパク質半減期測定法の開発を行うことを目的とした。

方　法

1. マウス 0N4R リコンビナントタウの精製

マウス 0N4R 大腸菌発現プラスミド（pRK172-mouse 0N4R）をコンピテントセル（BL21（DE3）pLysS）に形質転換し、50μg／mL のアンピシリンを添加した LB 培地（LB／amp）で 37℃、18 時間振とう培養した。培養液全量を 500 mL LB/amp に添加し、OD600≒0.6 になるまで 37℃で振とう培養した。0.5 mM IPTG を加え、さらに 37℃で 2 時間振とう、タンパク質を誘導発現させた。得られた大腸菌を回収し、protease inhibitors（0.1 mM PMSF、10μg／mL leupeptin）を添加した Homogenize Buffer（50 mM PIPES、1 mM EGTA、1 mM DTT）中で超音波破砕した。遠心分離（15,000 rpm、4℃、15 分）し、上清を 15 ml チューブに移し、Minisart 0.8μm でろ過した。得られた可溶性画分について Phosphocellulose column（Whatmann P11）を用いて精製した。0.1～0.3 M NaCl で溶出される画分を回収し、SDS-PAGE／CBB 染色によりタウの回収を確認した。さらに、得られた溶出画分を飽和硫酸アンモニウムで透析し、生じた沈殿を含む透析内容物を超遠心（TLA100.4、70,000×g、2℃、15 分）で回収した。得られた沈殿について再懸濁後、さらに 50%飽和硫酸アンモニウムで沈殿させたのち、0.5 M NaCl、1% 2-メルカプトエタノールを含む Homogenize Buffer で溶解した。時折攪拌しながら 100℃で 5 分加熱した後に遠心分離（15,000 rpm、2℃、15 分）を行い、可溶性画分得た。得られた精製タウについて、さらに逆相 HPLC で精製を行い、OD215 および SDS-PAGE／CBB 染色によりタウ陽性フラクションを選択、回収した。必要なフラクションを統合、限外濾過膜による濃縮を行ない、チューブに分注後 speed vac で乾燥させた。得られたリコンビナントタウタンパク質について、既知の標準タウを検量線に用いた SDS-PAGE／CBB 染色を行ない、濃度決定した。

2. SDS-PAGE／CBB 染色

ゲルには 10% acrylamide gel を用い、Running buffer（0.1 M Tris、0.1 M Glycine、0.003 M SDS）を用いて電気泳動した。分子量マーカーおよびサンプルをアプライし、ゲル一枚あたり 5.5 W の条件で 60 分間電気泳動した。電気泳動終了後、ゲルを固定液（10%酢酸、50%メタノール）で 10 分間浸透させる作業を 2 回行い、CBB（富士フィルム和光純薬株式会社）で染色した。染色後は精製水で一晩脱色し、LAS4000（FUJIFILM）で撮影した。

3. スピルリナ総タンパク質画分の調製

^{15}N スピルリナ沫（Spirulina whole cells（U-15N、98%＋）: Cambridge Isotope Laboratories、Inc）と Unlabeled スピルリナ沫（Spirulina whole cells（unlabeled）: Cambridge Isotope Laboratories、Inc）各 5 mg に 70% ギ酸 300μL を加え超音波破砕した後、超遠心（TLA 55、100,000×g、4℃、20 分）した。上清を回収し、原液とした。原液を別のチューブにとり、精製水で 20 倍希釈したのち、BCA 法でタンパク質量を定量した。さらに SDS-PAGE、CBB 染色により ^{15}N スピルリナ、^{14}N スピルリナの原液中の正確なタンパク質濃度を決定した。

4. スピルリナ配合飼料の作製と飼料由来総タンパク質画分の調製

0.5% w／w スピルリナ配合飼料は日本クレアにて作製した。スピルリナ沫を通常飼料 CE-2 末と配合し、ペレット状に形成したのちに滅菌した。コントロールとして unlabeled スピルリナを用いて同様に作製した飼料を用いた。特殊飼料：CE- 2（日本クレア）99.5%、Spirulina whole cells（U-15 N、98%＋）0.5%と標準飼料：CE- 2（日本クレア）99.5%、Spirulina whole cells（unlabeled）0.5%をそれぞれ－80℃で一晩保存した後、乳鉢ですりつぶし、粉末状にした。粉末状の飼料 5 mg に 70%ギ酸 300μL 加え、超音波破砕してタンパク質を抽出した。超遠心（TLA 55、100,000×g、4℃、20 分）後、上清を回収し、原液とした。原液を別のチューブにとり、精製水で 20 倍希釈したのち、BCA 法でタンパク質量を定量した。

5. スピルリナ配合飼料によるマウスの飼育および生体タンパク質の標識

C57BL/6 雌マウスを同系統雄マウスと飼育し、膣プラグ形成の確認をもって交配成立と判断した。交配確認とともに特殊飼料群（Labeled group : LA 群）と標準飼料群（Unlabeled group : UN 群）に分け、プラグ確認から産仔（F1）が 28 日齢に至るまで LA 群は特殊飼料、UN 群は標準飼料を与えて飼育した（ラベル）。生後 28 日の時点で離乳、母子および雌雄分離するとともに通常飼料に変更し、継続飼育（チェイス）した。

6. マウス組織中タンパク質の抽出

三種混合麻酔薬により麻酔したマウスを解剖台に背位固定し、腹腔を切開、下大静脈から EDTA を先端にためたシリンジを用いて採血した。採血後断頭し、大脳皮質を回収し、秤量後液体窒素で瞬間冷凍した。血液は、採血後遠心分離（5,000 rpm、4℃、10 分）し、血漿と血球に分離した。それぞれ秤量し、液体窒素で瞬間冷凍した。得られた組織サンプルはいずれも−80℃で保存した。血漿に×9 vol の PBS を加えて懸濁し、全量に対しクロロホルム／メタノール混液（2：1）を×5 vol 加えよく攪拌した後、氷上で 30 分静置した。さらにメタノールを×4 vol 加え、ボルテックスした後、氷上で静置した。その後、15,000 rpm、4℃、15 分遠心し、上清を除去して風乾させた。得られた沈殿に 70%ギ酸を 100 μL 加えて超音波破砕（output control 30 times）により可溶化した。大脳皮質については組織湿重量の×9 vol の 0.1 M PMSF、0.1 M DIFP を添加した PBS を加えホモジナイズした。ホモジネートをチューブに 100 mL ずつ分注し、×5 vol のクロロホルム／メタノール混液（2：1）を加え、よく攪拌したのち氷上で 30 分静置した。さらにメタノールを×4 vol 加えてボルテックスした後、氷上で静置した。15,000 rpm、4℃、15 分遠心し、上清を除去して風乾させた。得られた沈殿について、70%ギ酸を 100 μL 加えて超音波破砕により沈殿を可溶化し、総タンパク質画分原液とした。得られた原液について BCA 法および SDS-PAGE／CBB 染色によりサンプル中の総タンパク質量を求めた。

7. 同位体分析

原液を精製水で希釈し、1 μg/μL の溶液を調製した。タウ溶液、スピルリナ溶液については適宜希釈調製した。各種溶液について 1 μL ずつシリコンウェハにのせ、乾燥させた後、投影型二次イオン質量分析計：Cameca ims-1270E7 を用いて同位体分析を行った。各サンプルにつき 3 か所にイオンビームを照射し、試料表面からスパッタされるイオンを質量分離することで得られる ^{15}N、^{14}N 由来のシグナルを分析した。

結果および考察

1. 安定した同位体分析のためのサンプルタンパク質量の決定

本研究手法では生体由来のタウタンパク質を精製し、シリコンウウェハ上にスポットさせて窒素同位体解析を行うものである。この目的を達成するためには、可能な限り少量のタンパク質で安定した同位体解析を行う必要が有る。はじめに、安定した $^{15}N/^{14}N$ 解析のために必要なタンパク質量について精製タウを用いて検討した。精製リコンビナントタウを 10 mg/mL、1 mg/mL、0.1 mg/mL 含むタウ溶液を同位体分析した結果、10 μg／spot では ^{15}N シグナル強度が 296.9±4.4、1 μg／spot では 522.0±42.2、0.1 μg／spot では 35.5±13.6 であった。$^{15}N/^{14}N$ 比についてはそれぞれ 0.00377、0.00384、0.00371 であり天然の $^{15}N/^{14}N$ 同位体比（0.00365）と相違なかった。これより、解析に供するタンパク質濃度を増やすことでシグナルが増強するとともに C.V.値は小さくなるものの、1 μg／spot 以上では頭打ちになることが分かった。これまでの経験から、1 μg／spot であれば 1 匹のマウス脳より精製したタウで解析可能と考えている。これより、窒素同位体解析に供するタンパク質濃度は 1 μg／spot とした。

2. 特殊飼料への 15N スピルリナ末混和量の決定

生体を用いたタンパク質寿命解析では、ラベル直後に最大値となる $^{15}N/^{14}N$ 比からの経時的な低下を評価する。したがって、用いる分析系の感度および精度が飼料に混入させるべきラベル量（最大 $^{15}N/^{14}N$ 比）の決定根拠となる。^{15}N スピルリナ、および unlabeled スピルリナ沫より調製した総タンパク質を任意の比で混和し、窒素同位体解析を行った。その結果、天然 $^{15}N/^{14}N$ 存在比である 0.00365 に対し、^{15}N スピルリナ 0%含有サンプルの $^{15}N/^{14}N$ 比は 0.00382±0.000060407 であった。Unlabeled 由来タンパク質に 0.1%の ^{15}N 由来タンパク質を含有させたサンプルでは、予測値 0.00459 に対し測定値は 0.00474±0.000098292、同じく 1.0%含有サンプルでは予測値 0.01314 に対し、測定値は 0.01324±0.000400580 であった。また、0%含有試料と 1.0%含有試料の間で有意差が認められた（図 1）。この結果から、タンパク質濃度として 1.0%程度の混入で正確に $^{15}N/^{14}N$ の変動を解析出来ると判断した。また、スピルリナおよび通常飼料中のタンパク質濃度をもとに算定した結果、飼料中 0.5% w／w のスピルリナ沫の混和で本研究の目的が達成出来ると判断した。

3. 特殊飼料への 15N スピルリナ沫混和量の決定

はじめに、生後 28 日齢の離乳時におけるマウス血漿由来及び大脳皮質由来タンパク質中の$^{15}N/^{14}N$ 比について分析した。その結果、LA 群では血漿タンパク質で 0.01484±0.00065、大脳皮質タンパク質で 0.01579±0.00035 であった。一方、UN 群は血漿タンパク質で 0.00412±0.00004、大脳タンパク質で 0.00379±0.00008 であった。特殊飼料および標準飼料の$^{15}N/^{14}N$ 比は、それぞれ 0.01544、0.00390 であった（図 2）。この結果から、プラグ確認から生後 28 日齢までの混餌投与条件で投与に用いた飼料由来タンパク質と同等な$^{15}N/^{14}N$ ベルを達成出来る事がわかった。また、LA 群は UN 群に比べて血漿タンパク質で 1.07%、大脳タンパク質で 1.20%増加した。また、いずれの群においても、血漿と大脳皮質タンパク質の$^{15}N/^{14}N$ 比に有意差は認められなかった（図 2）。

さらに、離乳後通常飼料による飼育 5 週後（生後 9 週齢）におけるマウス血漿由来及び大脳皮質由来タンパク質中の$^{15}N/^{14}N$ 比について分析した。その結果、血漿では 0.003436、大脳皮質では 0.006650（いずれも 2 例）であった（図 2）。これより、一度ラベル化されたタンパク質中の$^{15}N/^{14}N$ 比は、通常飼料によるチェイス後、速やかに入れ替わること、その速度は血漿に比べて脳では遅いことが確認出来た。

以上、本研究より（1）0.5% w／w という低用量での^{15}N ラベルで充分解析が可能であること、(2) プラグ確認から離乳までの混餌投与で充分解析に耐えうる感度、精度でタンパク質の^{15}N ラベルが可能であること、(3) 一定期間のチェイスによる減少が確認出来たことを確認した。これは、本研究で目指した窒素安定同位体ラベル／チェイスによる生体タンパク質代謝回転解析法についての概念実証とともに非常に高い精度で解析が可能であることを示しており、タウの代謝回転速度の決定に大いに期待が持てるものである。本研究成果をもとにラベル化法、各種組織のサンプリング法、タウ精製法、タンパク質調製法、同位体解析法等において最終的なプロトコールを改訂し、現在多数例を用いた本解析をスタートさせたところで有る。

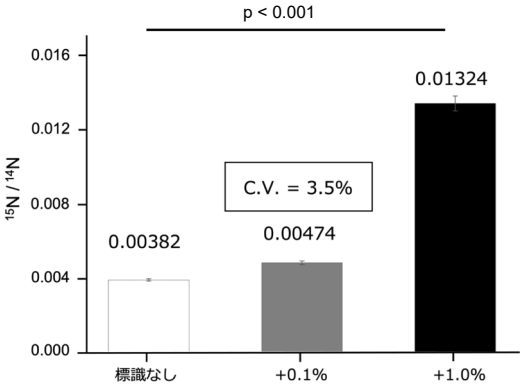


図 1. ^{15}N 含有率の異なるサンプルをもちいた窒素安定同位体解析の精度検証
^{15}N スピルリナ由来タンパク質を含有率 0%、0.1%、1.0%添加した unlabeled スピルリナ由来タンパク質を調製し、$^{15}N/^{14}N$ 比について分析を行った。Means±S.E. (n=3)、Tukey HSD。

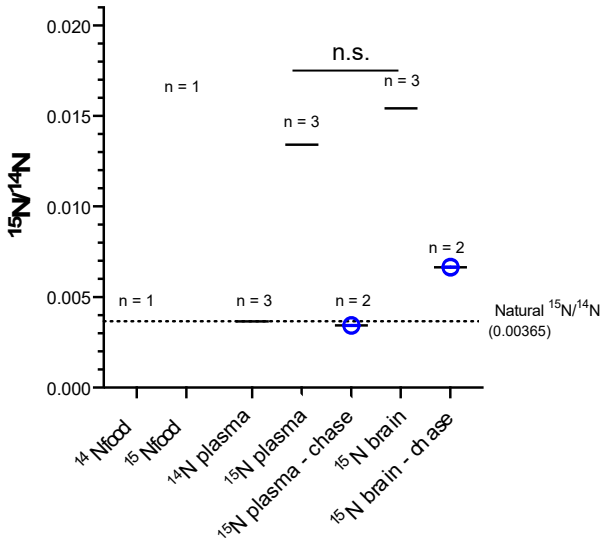


図 2. ^{15}N 飼料ラベル化マウス由来タンパク質中の窒素安定同位体解析
Unlabeled (^{14}N food) および^{15}N 添加 (^{15}N food) 飼料で飼育したマウスの血漿 (plasma) 及び大脳皮質 (brain) より総タンパク質を調製し、^{15}N／^{14}N 比について分析を行った。また、天然中の^{15}N／^{14}N 比である 0.00365 を図示した。Tukey HSD（n＝3）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、同志社大学大学院脳科学研究科チャネル病態生理部門の御園生裕明教授である。また、同位体解析における投影型二次イオン質量分析計を用いた解析については北海道大学創成研究機構の坂本直哉助教による技術供与により達成できたものである。

文　献

1) Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. Nature. 2011 May 19;473(7347):337-42. PMID: 21593866 DOI: 10.1038/nature10098.

2) Brandon H Toyama, Martin W Hetzer. Protein homeostasis: live long, won't prosper. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Jan;14(1):55-61. PMID: 23258296 DOI: 10.1038/nrm3496.

3) Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Wattez A, Vermersch P, Ghozali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. Neurology. 1999 Apr 12;52(6):1158-65. PMID: 10214737 DOI: 10.1212/wnl.52.6.1158.

4) Kubo A, Ueda S, Yamane A, Wada-Kakuda S, Narita M, Matsuyama M, Nomori A, Takashima A, Kato T, Onodera O, Goto M, Ito M, Tomiyama T, Mori H, Murayama S, Ihara Y, Misonou H, Miyasaka T. Ectopic Expression Induces Abnormal Somatodendritic Distribution of Tau in the Mouse Brain. J Neurosci. 2019 Aug 21;39(34):6781-6797. PMID: 31235644 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2845-18.2019.

5) Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Matthews DE, Yates JR 3rd. Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis. Anal Chem. 2004 Sep 1;76(17):4951-9. PMID: 15373428 DOI: 10.1021/ac049208j.