

氏 名	しお 塩 ぎさ 崎 あい 愛 こ 子
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2708 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Proteome analysis of brain proteins in Alzheimer's disease: Subproteomics following sequentially extracted protein preparation (アルツハイマー病における脳タンパク質のプロテオーム解析：タンパク質の 連続抽出によるサブプロテオミクス)
論文調査委員	(主 査) 教 授 福 山 秀 直 教 授 金 子 武 嗣 教 授 橋 本 信 夫

論 文 内 容 の 要 旨

アルツハイマー病 (AD) は進行性の神経変性疾患で痴呆の原因として重要である。家族性 AD に特定の遺伝子変異は報告されているが、AD の大多数は孤発性であり、その発症には多くの因子が関与していると考えられている。一度に数千のタンパク質の情報を得られるプロテオーム解析は、こうした孤発性 AD の病態解明に有用である。本研究では二次元電気泳動 (2-DE) を用いた AD 脳のプロテオーム解析を行ない、疾患特異的なタンパク質の変動を検出した。2-DE によって、より多くのタンパク質スポットを分離するために脳タンパク質の溶解液の調整は重要であり、脳タンパク質用に調整した異なる 2 つの溶解液を用いて段階的に抽出した。このようにして、タンパク質を分画化しそれぞれに解析すること (サブプロテオミクス) で、検出されるタンパク質スポットの重なりを避けた。脳サンプルは AD 患者と正常対照者それぞれ 10 名の剖検脳を用いた。尿素と NP-40 を含む溶解液で可溶化した分画 A では約 1300 個のスポットが検出された。画像解析、統計処理を行なった結果、正常対照群に比し AD で 5 個のスポットの発現量が増加しており、10 個のスポットの発現量が減少していた。これらのタンパク質はマスマスプロトメトリー (MS) によって、NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, isocitrate dehydrogenase 3 (NAD⁺) alpha precursor, guanine deaminase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triosephosphate isomerase 1, brain creatine kinase 等の酵素群, glucose-regulated protein 75, heat shock protein 70-2, T-complex protein 1 epsilon subunit 類似タンパク質等の分子シャペロン群, tubulin alpha 6, tubulin beta 5, glial fibrillary acidic protein (GFAP) 等の細胞骨格タンパク質群, その他 synaptotagmin I, mu-crystallin, SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like と同定された。isocitrate dehydrogenase 3 (NAD⁺), guanine deaminase, heat shock protein 70-2, mu-crystallin, SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like はこれまでに AD での変動が報告されていないタンパク質であった。最初の溶解液に溶けなかったタンパク質を疎水性タンパク質の可溶化に有効なチオ尿素, SB3-10, CHAPS を含む溶解液で可溶化し、得られた分画 B についても同様に検討した結果、約 500 個のタンパク質スポットが分離され、この内、3 個のスポットの発現量が AD で増加していた。MS によって 2 個のタンパク質が GFAP と同定された。以上の結果より、タンパク質の溶解度の違いに基づく連続抽出法は 2-DE の高分解能を得るために有用な手法であることが示された。また、発現量が変化していたタンパク質についての更なる検討により AD の病態解明や疾患マーカーの検索に有用な情報が得られると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

プロテオーム解析は一度に数千のタンパク質の情報を得ることが可能で、多因子疾患とされる孤発性アルツハイマー (AD) の病態解明に有用な手法である。二次元電気泳動 (2-DE) を用いた AD 脳のプロテオーム解析を行ない、疾患特異的なタンパク質の変動を検出した。2-DE によって、より多くのタンパク質スポットを分離するために、異なる 2 つの溶解液を用いて脳タンパク質を連続抽出し、得られた 2 つのタンパク質分画のそれぞれを解析した。AD 患者と正常対照者それ

ぞれ10名の剖検脳を、尿素とNP-40を含む溶解液で可溶化した分画Aでは約1300個のスポットが分離され、最初の溶解液に溶解しなかったタンパク質をチオ尿素、SB3-10、CHAPSを含む溶解液で可溶化した分画Bでは約500個のスポットが分離された。画像解析、統計処理を行なった結果、分画Aでは正常対照群に比しAD群で5個のスポットの発現量が増加しており、10個のスポットの発現量が減少していた。分画Bでは3個のスポットの発現量が増加していた。マスマスベクトロメトリーによってタンパク質を同定した結果、この内、5個はADでの変動が報告されていないタンパク質であった。

以上の研究は、アルツハイマー病の病態解明に貢献し、新たな診断方法、治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年1月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。