

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

新規シナピン酸誘導体による虚血性脳障害の予防作用：分子メカニズムの解明

研究代表者 廣澤 成美 (医学部 中央研究施設 機能部門)

研究分担者 坂本 安¹⁾, 坂本 武史²⁾, 岡崎 真理²⁾

緒言

脳卒中(脳虚血)は高齢者の寝たきりになる主要原因となっている。脳において虚血性の障害が生じた場合、短期間ではその後に起きると考えられる重篤な虚血性傷害に対する保護作用が誘導される。これはプレコンディショニング(PC)により誘導される神経虚血耐性として知られている。この耐性因子の候補としてVinay K. Dhoddaらは、プロテオミクス解析によりラット脳において虚血耐性前処理により誘導される内因性メディエーターを推測した。この研究結果において、HSP70, HSP27, HSP90, グアニル酸シクラーゼ, muskelin, 血小板活性化因子受容体, および β -Actinの発現増加が認められたとされている¹⁾。また、Patrick Geleらは、脳虚血処置の前にPeroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) アゴニスト(Atorvastatin, Fenofibrate)投与による神経保護療法を行い、虚血処置後の脳のプロテオーム解析を行い、結果として、14-3-3 protein, TUC-4 protein, Protein Disulfide Isomerase A3 (PDI), HSP70がPPARアゴニストAtorvastatinの投与により発現量が増大したことに注目した。特にPDIの過発現がPPARアゴニストであり前投与により顕著に抑制されたことから治療のターゲット因子として重視した²⁾。

ヒドロキシ桂皮酸誘導体の1つであるフェルラ酸(FA)は、抗認知症作用を持つ物質として報告されており³⁾、血管保護作用も期待されている。岡崎、坂本らは、ヒドロキシ桂皮酸類であるシナピン酸(SA)の誘導体を数種類設計・合成し、その1つであるFAD012の連続投与が、両側総頸動脈結紮をした低灌流脳虚血モデルラットの生存率を上昇させ、脳障害を軽減させる作用があることを見出した。今回我々は、これらの脳虚血モデルラットを用いFA投与群、FAD012投与群、非投与群に関して、脳の海馬、大脳皮質、血管等の部位を主としたプロテオーム解析を遂行することにより、将来的に治療目的の基盤となることを目指し

て脳障害の軽減作用の根底にある分子メカニズムを検討した。

プロテオーム解析の結果、FAD012を投与した群に、リン酸化を受けていない可能性のある蛋白質スポットがみとめられ、Glyal fibrillary acidic protein (GFAP)であると同定された。また、FA群、FAD012群におけるHSP70, β -Actin, Actin cytoplasmic 2量の増加がみられ、これは報告されている結果^{1, 2)}と一致していた。

材料と方法

10週齢の雄SDラットを用いて脳虚血実験を行った。ラットはSham群(擬似手術)、2VO群(両側総頸動脈を永久結紮)、FA群(10 mg/kg FA投与)、FAD012群(10 mg/kg FAD012投与)の4群とした。FA、及びFAD012は、0.5% Carboxymethylcellulose (CMC)で溶解し経口投与した。24時間後、イソフルラン麻酔下でラットの両側総頸動脈を永久結紮し、2VOモデルを作製した。Sham群は、総頸動脈結紮以外を同様に処置した。処置後、ラットを解剖し、海馬・皮質を摘出し、液体窒素で凍結後、 -80°C の冷凍庫で保存した。

プロテオーム解析は、各サンプルより可溶性蛋白質を抽出し、二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動装置は、Auto-2D (SHARP社製BM-100)を用いた。1次元目のIEFチップはpH勾配3~10、2次元目のSDS-PAGEチップはゲル濃度12.5% (ゲルサイズ70×45mm)を使用した。泳動条件は装置に設定されている推奨プロトコルを使用した。蛋白発現量の解析にはPDQuest (BIO-RAD社製)を用いた。蛋白スポットの発現差異がみとめられた蛋白スポットについてゲルから切り出し、トリプシンによるインゲル消化を行った。インゲル消化法は、近藤ら(国立がんセンター)のプロトコルを用いた。蛋白スポットの消化物は、飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF-MS, 島津社製:AXIMA-CFR)を用いて分析し、Mascot SearchによりPMF (Peptide Mass Fingerprint) 検索を行って目的スポットの蛋白質の同定を行った。

1) 埼玉医科大学 医学部 中央研究施設 機能部門

2) 城西大学 薬学部

結果

各群より抽出した海馬の可溶性蛋白質の2次元電気泳動画像(図1)により、蛋白質のPIが塩基性側にシフトしたSpot 5が見られた。Spot 5について蛋白質の同定解析を行った結果、Glial fibrillary acidic protein(GFAP)と同定された。今回の実験結果ではFAD012を投与した群(図1. E)のSpot 5は4群のゲルで最も塩基性側に位置し、リン酸化を受けていない可能性がある。また、Sham群、2VO群と比較し、FA群、FAD012群は、HSP70(Spot 1)、 β -Actin(Spot 6)、Actin

cytoplasmic 2 (Spot 4) の量的増加がみとめられた(図1. B, C, D, E)。同定した蛋白スポットの結果は、表1に示した。量的変動が見られなかった蛋白スポットも含め、21スポット(17種)の蛋白質を同定した。

いくつかのスポットは泳動ゲル上と、データベース検索によりハイスコアで同定された蛋白質の分子量とPI値に差がみられたが、同定されたアミノ酸の全配列を調べると、蛋白質の一部が欠落しており、そのため分子量やPI値が変動したと考えられた。

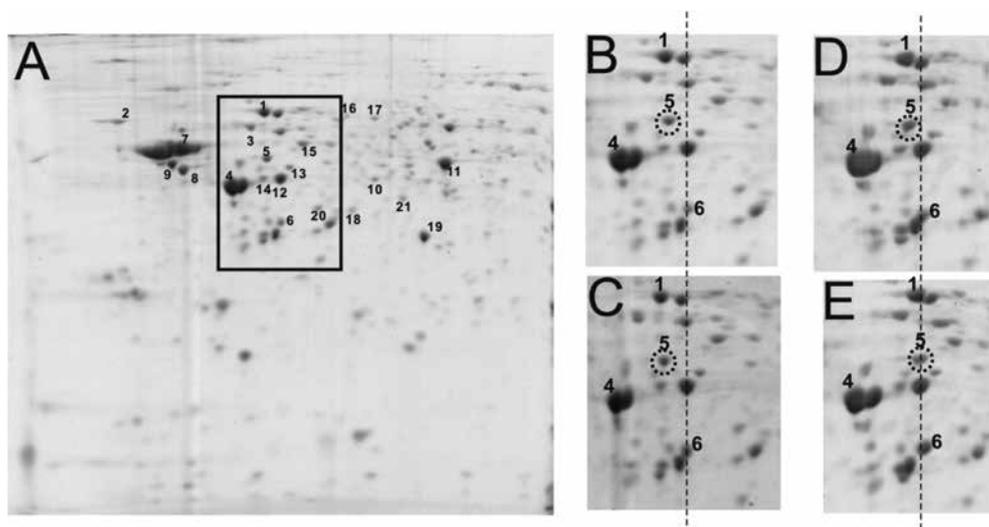


図1. 海馬より抽出されたタンパクの2D-PAGE画像 A: Sham群, pI3-10, 12.5%ゲルの全体像 B~E: Aの四角に相当する部分の各群の拡大 B: Sham群 C: VO2投与群 D: FA投与群 E: FAD012投与群.

表1. 海馬より抽出された2D-PAGEゲルより同定された蛋白

Spot.No	Identity	Mr	PI
1	Heat shock cognate 71 kDa protein	71055	5.37
2	Nurofilament light polypeptide	61355	4.63
3	Alpha-internexin	56253	5.17
4	Actin cytoplasmic 2	420525	5.29
5	Glial fibrillary acidic protein	49970	5.35
6	Beta-actin	39446	5.24
7	Enolase 1	46830	6.16
8	Gamma-enolase	47510	5.03
9	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	56318	4.92
10	Mbip protein, partial	38524	7.27
11	alpha-enolase isoform X1	47627	7.90
12	Creatine kinase-B, partial	40883	5.32
13	Guanine deaminase, isoform CRA a	42638	5.32
14	Serine/threonine-protein kinase N3 isoform X1	99545	9.08
15	V-type proton ATPase subunit B	56857	5.57
16~19	Highly divergent homebox isoform X1	87424	5.98
20, 21	Highly divergent homebox isoform 1	77669	5.42

考 察

今回の結果により, Spot 5 として同定された, GFAP はグリア細胞にMajorに発現し, アレキサンダー病等の神経系の病気の原因蛋白であることが知られている。また, 低酸素による脳障害時にGFAPのリン酸化が生じ細胞死に至るとの報告が近年されているが, そのメカニズムは不明である⁴⁾。今回, 血管保護作用が期待されているFA群よりも, さらに, FAD012 群はリン酸化を受けていないことから, 脳障害時の細胞死を防いでいる可能性が見いだされた。これは, 岡崎, 坂本らが見出した脳障害を軽減させる作用のメカニズムの解明につながるものと期待された。同様に, FA群, FAD012 群におけるHSP70, β -Actin, Actin cytoplasmic 2 の量的増加がみとめられ, これまでに研究報告^{1,2)}と同様の結果が得られた。

従来のプロテオーム解析は, ラージゲル (240 × 180 mm) を用い, ゲル 1 枚あたり, 1 mg の蛋白を用い, 泳動には数日を要していたが, 本研究で使用した 2 次元電気泳動装置 Auto-2D (SHARP 社製 BM-100) は, ミニゲルに対応しており, 従来の 1/20 ~ 1/10 と少ない蛋白量で検出でき, 泳動時間は 2 時間 30 分である。また, CBB 染色 (蛋白量: 100 μ g/gel) で識別可能な蛋白スポットに関しては, 通常のサンプルプレートを用いた PMF 解析による蛋白同定が可能であった。

今回 CBB 染色に用いたサンプルを, より微量の蛋白量で染色可能な蛍光染色 (SYPRO Ruby) を行い, ディフュゼンシャル解析を行ったところ, より多くの蛋白スポットが検出され, 量的変動のみられるスポットも確認された。しかし, 蛍光染色 (蛋白量: 10 μ g/gel) のゲルスポットは, 1 スポットあたりの蛋白も微量であるために, MALDI-TOF-MS 解析を行うためには, 濃縮サンプルプレート使用や, 高感度検出に利用可能な, マトリックス物質 (CHCA-Cl)⁵⁾ の選択などの分析手法の検討が必要と思われ, 現在, 複数のマトリックス物質についても検討を加えている。今後, さらに発現差異のみられた微量蛋白の解析を遂行し, FAD012 投与による脳障害の軽減作用の分子メカニズムの解明を進める。

謝 辞

本研究は平成 28 年度学内グラントの助成を受けて行われたものであり, ここに深謝いたします。

参考文献

- 1) Dhodda VK, Sailor KA, Bowen KK, Vemuganti R. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J Neurochem* 2004 Apr; 89(1): 73-89.
- 2) Gelé P, Vingtdoux V, Potey C, Drobecq H, Ghestem A, et al. Recovery of brain biomarkers following peroxisome proliferator-activated receptor agonist neuroprotective treatment before ischemic stroke. *Proteome Sci* 2014 May 6; 12: 24.
- 3) Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, et al. Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br J Pharmacol* 2001 May; 133(1): 89-96.
- 4) Sullivan SM, Sullivan RK, Miller SM, Ireland Z, Björkman ST, et al. Phosphorylation of GFAP is associated with injury in the neonatal pig hypoxic-ischemic brain. *Neurochem Res* 2012 Nov; 37(11): 2364-78.
- 5) Leszyk JD. Evaluation of the new MALDI matrix 4-chloro-alpha-cyanocinnamic acid. *Journal of Biomolecular Techniques* 2010; 21: 81-91.

研究成果リスト

学会発表

(国際学会)

- 1) Kato Y, Hirosawa N, Takayama J, Xuan M, Okazaki M, et al. Use of halogenated derivatives of the ferulic acid as matrices in proteomic analysis with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *Protein Society 31nd Annual Symposium 2017 Montreal, Canada*

(国内学会)

- 2) 加藤洋介, 廣澤成美, 坂本武史, 松田千代子, 辻村和博, 他. 新規フェルラ酸誘導体: PMF 解析用 Matrix としての性能の違い及びプロテオーム解析への応用 日本プロテオーム学会 2016 年会 東京
- 3) 加藤洋介, 松田千代子, 辻村和博, 玄美燕, 廣澤成美, 他. 新規フェルラ酸誘導体の MALDI マトリックスとしての評価とプロテオーム解析への応用 日本薬学会第 136 年会 2016 横浜