

## 多次元オミックス脳解剖

Brain anatomy with multidimensional omics

瀬藤 光利 (SETOU MITSUTOSHI)

浜松医科大学・分子イメージング先端研究センター・教授



### 研究の概要

我々が開発した新しい手法、質量顕微鏡法を用い、マウス疾患モデル脳、更にはヒト死後脳を対象とした多次元オミックス（プロテオーム、メタボローム）解析を行う。モデル動物やヒト死後脳サンプルの解析から、これまでに予想されていなかった新しい物質の局在や修飾の変化を発見することを目指し、新たなバイオマーカー創出に繋がる研究になると期待している。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：オミックス、質量顕微鏡、翻訳後修飾、チュブリン、脂質、代謝物

### 1. 研究開始当初の背景

質量分析を用いたメタボロームやプロテオームのポストゲノム研究が世界の医学生物学の研究の一大潮流となりつつある。一方、急速な高齢化社会を迎え医学の進展が社会から期待され、斬新な視点からの統合的な疾患理解が切望されている。とりわけ神経変性疾患や精神疾患の分野では、新しい手法を利用した革新的な研究が求められている。

### 2. 研究の目的

我々自身が開発した質量顕微鏡法を用い、翻訳後修飾酵素 KO マウスなどの疾患モデル動物やヒト病理標本の多次元プロテオーム、メタボローム（オミックス）解析を行い、これまでに予想されていなかった新しい物質の局在や修飾の変化を発見する。さらには病態の新たなバイオマーカーの発見に繋げたい。

### 3. 研究の方法

メタボローム、リピドーム、ペプチドーム、プロテオームなどそれぞれの解析に適した質量顕微鏡法による脳オミックス解析系を用いる。モデルマウスを対象に発達段階、老化、電気刺激などの生理刺激に対する脳の応答の観察解析を行う。アルツハイマー病病理標本の質量顕微鏡による解析を行い、既知変化の同定による手法検証を行う。最終的にはヒト精神疾患病理の解析を行い、物質的病理像を探索する。

### 4. これまでの成果

#### ① 質量顕微鏡法によるオミックス解析系の確立

我々が独自に開発した世界最高性能の質量顕微鏡法を用いて脳内の脂質や糖脂質などのメタボローム解析を行い、細胞種特異的な分布や加齢に伴う変化の検出に成功した (Sugiura et al. PLoS One 2008, Sugiura et al. J Lipid Res 2009)。また、新しいマトリクス開発にも挑戦し、イオン液体を用いた脂質の解析法を確立した (Shrivastava et al. Anal Chem 2010)。さらに質量顕微鏡法を用い、我々が作製した翻訳後修飾酵素、SCRAPPER ノックアウトマウスのプロテオーム解析を行い、野生型マウスとノックアウトマウスの比較により脳内の領域特異的なタンパク質分布の変化を見出した (Yao et al. Proteomics 2008)。

これらの成果は当初計画を上回る早さで進展し、多次元オミックス解剖法の確立が完了した。計画の最終目標の一つに掲げていた世界初となる英文教科書出版を達成した (Setou M. Ed. Imaging Mass Spectrometry, Springer 2010)。国内向けにも内容を簡略化した教科書を出版し、神経科学にとどまらず広く科学全般の分野に我々のノウハウを公開した (瀬藤光利編、イメージングマススペクトロメトリー実験プロトコール、シュプリンガー・ジャパン、2008)。

さらに本研究成果と内外の時空間的生命現象解析の最新技術について紹介する実験医学特集号を企画編集するに至った(瀬藤光利企画、実験医学、2010)。

#### ② チュブリン翻訳後修飾異常モデル動物の解析

脳で最も多いタンパク質、チュブリンをモデルとした解析を進め、チュブリンのチロシン化修飾(酵素 TTL)、グリニン化修飾(酵素 TTLL8、10)、グルタミン酸化修飾(酵素 TTLL1)について多くの知見を得た(Konishi et al. *Nat Neurosci* 2009、Ikegami et al. *FEBS Lett* 2009、Ikegami et al. *PNAS* 2010)。また、新たにモデル動物として線虫を導入し、神経受容におけるチュブリングルタミン酸化の役割に関する重要な発見に成功した(Kimura et al. *JBC* 2010)。

#### ③ ペプチドーム、メタボローム解析への挑戦

予想以上の計画進展により、リピドーム、プロテオーム以外のオミックス解析に挑戦した。ペプチドーム解析では、水棲節足動物の中樞神経系を材料にし、質量顕微鏡法によるニューロペプチドの局在解析に成功した(Chansela et al. *Peptides in press*)。メタボローム解析では、疾患モデルにおける脂質代謝物(リゾホスファチジルコリン: リゾPC)や低分子代謝物(ATP 代謝物)の定量的質量顕微鏡解析に挑戦した。脳虚血モデルラットの解析から、虚血部における特定の脂肪酸を含有するリゾPCの増加が観察された(Koizumi et al. *Neuroscience* 2010)。一方、カイニン酸投与てんかんモデルマウス脳の質量顕微鏡解析により、てんかん脳におけるATP、ADP、AMP量の海馬内微小領域特異的な変化を可視化し、てんかん時のエネルギー代謝の時空間的可視化に成功した(Sugiura et al. *PLoS One* 2011)。

#### ④ ヒト死後脳の解析

各種オミックス解析系の確立、複数の疾患モデル動物の解析例の蓄積が完了し、当初計画における最重要課題であるヒト死後脳の解析に着手した。アルツハイマー病疾患脳における、脂質の特徴的な分布変化、統合失調症患者脳における脂質代謝変化などについて、新しい知見が蓄積されつつある。また、上記疾患以外にパーキンソン病患者脳の解析準備に取り掛かった。さらに神経変性疾患における低分子代謝物解析に用いるパーキンソン病モデル動物(マウス、マーモセット)のサンプリングを開始した。これらは当初計画通り平成23、24年度に学術雑誌に掲載されるよう更なる解析を続けている。

#### 5. 今後の計画

当初計画通り、ヒト疾患脳の質量顕微鏡観察を推し進める。既にアルツハイマー病疾患脳、統合失調症疾患脳における特徴的な脂質局在変化を見出している。また、パーキンソン病死後脳解析にも着手を開始している。低分子代謝物の解析は死後経過時間のコントロールが最重要であり、これらの解析はモデル動物の脳を用いて解析を行う。さらに、これまでに確立した脂質、糖脂質、低分子代謝物、タンパク質の質量顕微鏡解析法をベースに、今後最も難しい問題である翻訳後修飾の質量顕微鏡解析に挑戦していきたい。

#### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

[代表的な雑誌論文]

①Konishi Y, Setou M. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* 12: 559-567(5), 2009. 査読有。

②Ikegami K, Sato S, Nakamura K, Ostrowski LE, Setou M. Tubulin polyglutamylation is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 10490-10495, 2010. 査読有。

③Kimura Y, Kurabe N, Ikegami K, Tsutsumi K, Konishi Y, Kaplan OI, Kunitomo H, Iino Y, Blacque OE, Setou M. Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *J Biol Chem* 285(30): 22936-22941, 2010. 査読有。

④Shrivastava K, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Sugiura Y, Zaima N, Setou M. Ionic Matrix for Enhanced MALDI Imaging Mass Spectrometry for Identification of Phospholipids in Mouse Liver and Cerebellum Tissue Sections. *Anal Chem*. 82(21): 8800-8806, 2010. 査読有。

⑤Sugiura Y, Shimma S, Konishi Y, Yamada MK, Setou M. Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS One* 3(9): e3232, 2008. 査読有。

[受賞等]

2009年平成21年度日本臨床分子形態学会学会奨励賞

ホームページ等

<http://www.hama-med.ac.jp/mt/setou/ja/index.html>