

平成 18 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 19 年 2 月 27 日提出

ふりがな	やまもりてつお	所属・職	基礎生物学研究所・教授
開発代表者名	山森哲雄		
開発課題名	脳科学におけるプロテオミクス手法の開発と普及		
<p>開発経過及び成果（開発目標に対する成果を計画書に記載した内容に対応させて記載すること）</p> <p>プロテオミクスの手法を脳科学の解析に則して改良発展させる為、プロテオミクスの脳科学への適用技術の開発を進めた</p> <p>1、概要</p> <p>研究評価委員会（梶正幸：委員長、尾藤晴彦、高橋信弘、岩坪威）と研究組織委員会（平成17年度公募により決定；饗場篤、五十嵐道弘、貝淵弘三、長谷川成人、高橋良輔）を設け、プロテオミクスの脳科学プロパーな手法の開発と改良を目指した。具体的には、シナプス後部の受容体複合体（饗場篤：第4領域）、伝達物質の放出複合体（五十嵐道弘：第3領域）、細胞内シグナル伝達複合体（貝淵弘三：第4領域）や脳神経疾患原因分子（長谷川成人、高橋良輔：第5領域）を核として、脳科学に特化したプロテオミクスの手法を開発している。山森は、代表として、これらの開発活動を統括している。平成18年度には、技術支援を公募し、研究評価委員会で検討し、星野幹雄氏（京都大学医学研究科、第4領域公募班員）の提案、「STEF/Tiam1 の神経系における生理機能および制御機構の解析」を採択した。脳科学におけるプロテオミクス技術の普及の為、全国レベルでの講演会を開催した。各研究開発は、順調に進んでおり、2つのプロジェクトについては、既に新聞等でも取り上げられた。具体的研究成果は、以下の通りである。</p> <p>2、研究成果</p> <p>饗場は、運動協調および運動学習に関わる mGluR1 シグナル伝達経路の全貌を明らかにすることを目指し、小脳における mGluR1 相互作用因子をプロテオミクスの手法を用いて網羅的に同定することを試みた。まず、小脳のシナプス膜画分より、モノクローナル抗体を用いて mGluR1 複合体をアフィニティー精製した。次に、得られた mGluR1 複合体の構成因子を nano-flow LC-MS/MS を用いて同定した。その結果、Homer, GluRd2 などの既知の相互作用因子を含む 125 種類のタンパク質を同定することができた。この実験と並行して、プルキンエ細胞特異的に mGluR1a および mGluR1b を発現するトランスジェニックマウスを用いて、mGluR1 アイソタイプ特異的に相互作用する因子を探索した。各アイソタイプの相互作用因子の MALDI-TOF MS 分析の結果、mGluR1a 特異的に結合する 2 種類のタンパク質を同定することができた。</p> <p>貝淵は、統合失調症の脆弱性因子である DISC1 の結合蛋白質の同定を進め、Kinesin-1（分子モーター）、Grb2（シグナルアダプター分子）と NUDEL 複合体（NUDEL, LIS1, 14-3-3epsilon で構成され、神経発達に重要）を同定した。さらに、DISC1 が“積み荷”となる Grb2 や NUDEL 複合体を Kinesin-1 と連結させる“積み荷受容体”として機能することで、“積み荷”の軸索先端への局在化や軸索伸長に寄与することを明らかにした。DISC1 の発現量が低下した場合、“積み荷”の正しい場所への輸送が不十分になり、神経細胞の発達や神経回路の形成に障害が生じると推定される。この成果は、J Neurosci に発表され、新聞でも報じられた。</p> <p>長谷川は、神経変性疾患脳の蓄積する不溶化蛋白質の網羅的解析と前頭側頭型認知症にみられる構成成分不明のユビキチン陽性封入体の解析を行い、正常脳、アルツハイマー病脳、レビー小体型認知症脳、ユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭型認知症 (FTLD) 患者脳から、界面活性剤に溶けない画分を調製し、電気泳動</p>			

後、ある一定間隔の分子量でゲルを細切し、ゲル内消化後、ナノフローHPLC を接続したイオンスプレー質量分析装置で消化ペプチドを解析した。その結果、アルツハイマー病脳、レビー小体型認知症脳から、それぞれの脳に特徴的に蓄積するタウや α シヌクレインのペプチドが同定された。すなわちこの方法が患者脳に蓄積する異常タンパク質を感度よく同定することができることがわかった。そこで前頭側頭型認知症に検出されるペプチドを注意深く解析したところ、TDP-43 という RNA 結合タンパク質が対照脳や他の疾患脳よりも前頭側頭型認知症脳の低分子領域において頻度が高く検出されることを見出した。2種類の抗 TDP-43 抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、いずれの抗体も FTLD 脳ユビキチン陽性異常構造物を濃染した。また不溶性画分のイムノブロット解析では、正常分子と思われる 43kDa の TDP-43 の他に、FTLD 脳には 45kDa の異常バンドや分解物と思われるバンド、レーン全体がスメア状に染まる反応が特徴的に検出された。45kDa バンドは脱リン酸化により移動度が変化したことから高リン酸化 TDP-43 と考えられた。以上のことから、FTLD 脳に蓄積するユビキチン陽性構造物の主要構成成分は TDP-43 であると考えられた。今回、変性疾患患者剖検脳の不溶性画分のプロテオミクス解析から、患者剖検脳に蓄積する異常タンパク質を感度よく検出する方法を確立しただけでなく、それまで構成成分が不明であった異常タンパク質の同定に成功した。この TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症の患者脳にも蓄積が確認され、いくつかの疾患が今後 TDP-43 proteinopathy としてまとめられる可能性がある。この研究成果は日経産業新聞にも掲載された。

五十嵐は、まず、平成17年度にプロテオミクスで明らかにした蛋白質の免疫染色により、ほとんど偽陽性がないことが証明され、プロテオミクス解析の信頼性が保証されることを確認した。次に、成長円錐のプロテオミクスで見出された蛋白質の結合分子を、結合プロテオミクスの手法(linkage analysis)で解析し、神経細胞の極性に関与する分子が新たな複合体を作ることを見出した。特に成長円錐に濃縮度の高い蛋白質の網羅的 RNAi によって、その約3割程度の分子が神経成長に強く関与することを見出した。

高橋は、これまで、アルツハイマー病患者剖検脳を用い、脳プロテオーム解析を行ってきた。しかしながら、ヒト患者脳を用いた解析では、アルツハイマー病という疾患自体の多様性、年齢などの個体の違い、罹病期間、凍結までの死後変化、サンプルの採取部位など様々な要因により、二次元電気泳動によるスポット(その多くはグリオーシスの程度により大きく変動する細胞骨格系のタンパク質である)解析には多くの困難が伴い、その解釈を難しくしていた。そこで、トランスジェニックマウスを用いることで、そのような個体差を回避し、プロテオーム解析が有効な手段となりうる、作業仮説に基づいた実験系の構築をめざし、アルツハイマー病の発症機序として、プレセニリンの機能障害が N-カドヘリンを含むシナプス制御機構に破綻をきたす可能性に注目した。家族性アルツハイマー病の原因遺伝子がコードしているプレセニリン1は γ シクレターゼの必須構成要素であり、アミロイド前駆体タンパクのほか、シナプス結合に必須の接着分子である N-カドヘリンの切断も行うことが知られている。またプレセニリン1はその C 末端断片のリン酸化によって、N-カドヘリンとの結合活性を喪失する。さらに実際に家族性アルツハイマー病の変異プレセニリン1の中には、プレセニリン1と N-カドヘリン結合が減弱するものがあることが知られているので、N-カドヘリンとプレセニリン1の相互作用の変化がアルツハイマー病発症に関与しているとの作業仮説のもと、in vivo 実験系を構築することにした。具体的には GSK3 β によりリン酸化されるプレセニリン1のセリン残基(353、357番)をアスパラギン酸に置換したプレセニリン1リン酸化モデルマウスの作成を行った。このリン酸化類似プレセニリン1(S353D, S357D)はN-カドヘリンとの結合活性が減弱しており、モデルマウスの表現型や病理学的解析と共に、神経組織プロテオームの加齢変化を網羅的に検索し、シナプス変性に関与するタンパクの同定を試み、幾つかのスポットの変動を確認し、MALDI-TOF 型質量分析を行いタンパク質の同定を行っているが、ATP synthase subunit alpha (gi416677)の C 末端部、通常のスポットとは MW が異なる SH3-domain GRB2-like 2 (gi31560792)などに、変動を確認している。

開発成果を踏まえた今後の展開

19年度開発計画の欄に詳述するが、以下の4点を中心に展開することを考えている。

- 1、現在の研究開発の更なる進展を図る。
- 2、統合脳班員への技術支援の強化。
- 3、統合脳班員へのプロテオミクス技術の普及の為の公開講演会。
- 4、統合脳プロテオミクス研究組織体制の整備。