

研究題目 神経回路形成、発達障害に寄与するシグナリングネットワークの解明

研究組織

研究代表者：竹本 さやか（名古屋大学環境医学研究所）
共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）
研究分担者：森 大輔（名古屋大学脳とこころの研究センター）
研究分担者：堀金 慎一郎（名古屋大学環境医学研究所）
研究分担者：上田 修平（名古屋大学環境医学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

神経細胞が軸索・樹状突起を適切に発達させ緻密な神経回路が形成されることは、脳が正しく機能するために必要不可欠である。この際、細胞内外のシグナル伝達分子が相互に複雑に作用し、適切な細胞応答が制御される。近年のゲノム解析により、神経回路形成制御に寄与する機能タンパク質に生じる多くの変異が、発達障害のリスクであることが判明し、これまで研究が進められてきた。神経回路形成に寄与する機能分子は、生理現象のみならず病態機序においても重要な役割を果たすことが示唆されている。研究代表者は、これまでにカルシウム依存的なシグナル伝達経路を介した神経回路形成機構や、その破綻により発症する発達障害の分子病態について研究をおこなってきた。本研究ではこれらの遺伝子群に着目し、プロテオーム解析によりシグナリングネットワークを解明し、神経回路形成や発達障害病態の分子機構解明へと繋げることを目的とする。

[1-2]研究の方法・経過

本研究では、研究代表者がこれまで神経回路形成制御の一端を担う機能分子として研究を進めてきたタンパク質の作用原理の解明のため、近位依存性ビオチン標識による相互作用分子の網羅的な同定を目指した。

具体的な方法として、我々が今回注目した神経回路形成に寄与する機能タンパク質のN末端にビオチン化酵素を付加したノックインマウスや過剰発現させたマウスを作出し、ビオチンを投与後、脳組織を用いて、ビオチン化タンパ

ク質の同定を行うことを計画した。また、同時に付加したエピトープタグに対する抗体を用いた免疫沈降法による相互作用タンパク質の同定を行い、比較検討を行った。

本研究の実施において、ビオチン化ペプチドおよびビオチン化タンパク質の精製に加え、高性能質量分析計を用いた、ビオチン化ペプチドの同定が必要であり、共同研究者である小迫教授の開発した技術を活用し研究を推進した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

作出したノックインマウスにビオチンを投与し、標的タンパク質のN末端に付加したビオチン化酵素により、脳内におけるタンパク質ビオチン化が生じることを、蛍光標識ストレプトアビジンにより検出し確認した。その後、同じ方法によりビオチンを投与し、脳内のタンパク質ビオチン化を行い、ノックインマウス全脳からのビオチン化ペプチドの同定を行った。この際、1) ビオチン化ペプチドを Tamavidin 2-REV を用いて精製する方法、2) ビオチン化タンパク質を NeutrAvidin にて精製する方法を比較検証し、両精製によって共通のタンパク質が同定されることを確認した。一方で、N末端にビオチン化酵素とともに付加したエピトープタグを用いて実施した従来の免疫沈降法においては、十分な相互作用タンパク質が同定されず、近位依存性ビオチン標識法の感度が優れていることが示された。

引き続き、1) および2) の方法で同定された近位に存在するタンパク質について、エンリッチメント解析およびネットワーク解析を行ったところ、標的のタンパク質が発現する神経細胞特異

的な膜タンパク質や構造タンパク質が濃縮されていること、また、これらの相互作用タンパク質群はいくつかの特定のネットワークを構成していることが分かった。更に、同定された相互作用タンパク質1例については、多くのスプライシングバリエーションが存在し、機能的にも異なることが知られていたため、同定されたペプチドから、相互作用タンパク質のスプライシングバリエーションについて推定を行った。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今後、相互作用タンパク質として同定されたネットワークが標的タンパク質によりどのように機能調節され、神経回路形成や脳機能の制御に寄与するのか検討を進める計画である。

本研究で用いた手法により、ノックインマウス生体脳内における近位依存性ビオチン標識法を用いることで、相互作用タンパク質の網羅的同定が可能であることが示された。その検出感度は従来用いられてきた免疫沈降法に比べて高く様々な研究に応用可能である。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表
なし

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

神経回路形成や発達障害に寄与する複数のタンパク質について同様の解析を行うことで、複数のネットワーク同士がいかんして協同し、特定の生命現象に関与するのか明らかとなることが期待される。複数のタンパク質に焦点を当てることで、生理的、および、脳内疾患シグナリングネットワークの理解が飛躍的に進むことが期待される。