

研究題目 神経回路形成、神経発達症病態に寄与するリン酸化シグナリング 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：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）
研究分担者：塩田 竜亮（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

本研究では、神経回路形成、神経発達症病態に寄与するリン酸化酵素に着目した、プロテオーム解析により、シグナル伝達ネットワークを明らかとし、神経回路形成の分子機構解明やその破綻によって生じる神経発達症病態の解明へとつなげることを目的とする。

具体的には、申請者がこれまで研究を進めてきた、神経回路形成や記憶・学習の制御を担うリン酸化酵素 X を中心とするシグナル伝達ネットワークとその破綻を解明する。このリン酸化酵素 X は、神経細胞内で活性化されるリン酸化酵素であり、神経細胞の神経突起伸展において重要な役割を果たすこと、またその欠失は自閉スペクトラム症と関連する行動異常を示すことが分かっている。しかしながら、これらの機能の基盤となる分子機構は全く不明である。

そこで本研究では、*in vivo* BioID 法を活用したプロテオーム解析技術により、生体脳内神経細胞におけるリン酸化酵素を中心としたシグナル伝達ネットワークの解明を行う。ビオチン化酵素を付加したリン酸化酵素（野生型および変異型）のノックインマウスを用いて、近接タンパク質のビオチン化標識を行い同定することより、リン酸化基質の探索とリン酸化部位の同定を行った。

[1-2] 研究の方法・経過

注目するリン酸化酵素 X の N 末端にビオチン化酵素 (TurboID) を付加したノックインマウスを作出し、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およびリン酸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、標的リン酸化酵素 X 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。また、ノックインによりタンパク質の機能が阻害されていないことを示すため、本リン酸化酵素によって制御されるマウス行動実験を行い、ノックインマウスが異常を示さないことを確認した。その後、同じ方法によりビオチンを投与した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い近位に存在するタンパク質の

網羅的な同定を行った。

次に、同定された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、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おり、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。また、同時に実施したリン酸化プロテオーム解析により、多くのタンパク質がリン酸化を受けていることが判明した。

そこで、標的としたリン酸化酵素 X がその近位に存在するリン酸化タンパク質をリン酸化基質とするかどうか、培養細胞を用いた再構築系において検証することとした。リン酸化酵素と同定された候補タンパク質（全長および断片）を培養細胞（HEK293T）に発現させ、薬剤によりリン酸化酵素を活性化させた後に細胞を回収し、候補タンパク質のリン酸化をリン酸化依存的な電気泳動度の違いを利用した Phos-tag SDS-PAGE を用いて検討したところ、いくつかのタンパク質においてシフトが認められリン酸化されることが示された。更に、リン酸化によるシフトが明らかであった 2 つのタンパク質について質量分析によりリン酸化部位の同定を行い、これまで報告のないリン酸化部位を含む複数のリン酸化部位の同定に成功した。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究により、リン酸化酵素 X の近位に存在するタンパク質群とそのリン酸化の状態が明らかとなった。今後は同定された分子ネットワークが標的とするリン酸化酵素によるリン酸化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。

また、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。ノックインマウスを用いるためビオチン化酵素

を付加した遺伝子の発現は、内在性のプロモーター活性に依存しており、発現細胞や発現量を再現できるという利点がある。同時にリン酸化などの翻訳後修飾の状態を計測することで、より詳細なシグナル伝達の変化をとらえることが可能となり、今後様々な生命現象への応用が期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

塩田 竜亮、劉 品吾、上田 修平、西野 耕、田中 帆佳、堀金 慎一郎、森 大輔、小迫 英尊、竹本 さやか、第 47 回日本分子生物学会年会(福岡)

[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

神経回路の形成や神経発達症に関与する複数のタンパク質を同様に解析することで、異なるネットワークがどのように協調し、特定の生命現象に関与するのかを解明することが可能となる。これにより、生理的プロセスや脳内疾患に関連するシグナリングネットワークの理解が進むことが期待される。