

[特集：最新の電気泳動技術]

## ラージゲルプロテオミクスを基盤とした神経細胞の軸索形成とガイダンスの解析

馬場 健太郎・浦崎 明宏・稲垣 直之\*

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科神経形態形成学

Large gel proteomics-based analyses of the mechanisms for neuronal axon formation and guidance

Kentarou Baba, Akihiro Urasaki, Naoyuki Inagaki\*

\*Corresponding Author

E-mail: ninagaki@bs.naist.jp

(受付 2014 年 6 月 13 日, 受理 2014 年 6 月 20 日)

### はじめに

神経細胞は 1 本の長い軸索と複数の樹状突起を形成し、高度に発達した細胞極性をもつ。極性化の過程において、神経細胞は複数の未成熟な突起をもつ対称な状態から、急激に 1 本の長い突起を伸ばして対称性を破る。この長い突起はその後も伸長を続けて軸索へと分化し、一方、残りの突起が樹状突起になる<sup>1)</sup>。極性化の重要なステップである軸索形成の分子機構は、これまでのところ十分に理解されていない。また、形成された軸索がいかにして正しい標的細胞にガイダンスされるのか、細胞内における分子のメカニクスも良く解っていない。本稿では、我々の研究室で行われてきた二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析の高感度化について解説する。また、それによって同定された Shootin1 と Singar1 の機能解析、さらに Singar1 と相互作用する分子として同定された Rab33a の機能について概説する。

### 二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析 の高感度化

二次元電気泳動法はポストゲノム時代におけるプロテオーム解析法の基礎技術である<sup>2)</sup>。この方法を用いることにより、組織や細胞に発現する複数のタンパク質を分離し、検出することができる。また、質量分析法と組み合わせることで、タンパク質の同定や発現量の定量的な解析を行うことが可能である。さらに、二次元電気泳動法により分離した同一タンパク質のスポットの位置変化やイムノブロットによるそれらスポットの検出は、リン酸化や糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けたタンパク質を探索するための有効な手段となる。

細胞には数万種類のタンパク質が発現しているが、タン

パク質の種類によって発現量は異なる。細胞内で最も微量に発現するタンパク質は最も大量に発現するタンパク質に比べ、発現量が  $10^6$  倍も低いと考えられている<sup>3)</sup>。一方、従来の二次元電気泳動法で検出可能なタンパク質のダイナミックレンジは  $1 \sim 10^4$  以下である。すなわち、細胞内に発現するタンパク質のうち発現量の少ない分子のスポットは、大量に発現するタンパク質のスポットに覆い隠されてしまい、検出が難しかった。

我々は、二次元電気泳動法の高感度化を行うため、はじめに、二次元電気泳動法におけるタンパク質の分離能の向上を行った。一次元目の泳動で、大きなサイズの pH レンジの異なる固定化 pH 勾配ゲル (pH3.5~4.5, pH4~5, pH4.5~5.5, pH5~6, pH5.5~6.7, pH6~9)<sup>3-6)</sup> を複数枚組み合わせ合わせて行った。二次元目の泳動で低分子量タンパク質 (分子量 40 kDa 以下) を 13.5% ポリアクリルアミドゲル用いて分離し、高分子タンパク質 (分子量 40 kDa 以上) を 7.5% ポリアクリルアミドゲル用いて分離した。最終的には 12 枚のゲルを組み合わせ合わせて 93 cm × 103 cm のラージゲルを作製した<sup>7)</sup>。

次に、タンパク質スポットの検出感度の向上のため 4 つの改善を行った。第 1 に、細胞内で発現するタンパク質を放射性同位体 [<sup>35</sup>S] を用いてラベルし、ラベルされたタンパク質のスポットをオートラジオグラフィーにより検出した。第 2 に、ラベルされた微量タンパク質は自然界に存在する放射能の影響によりシグナルがマスクされるため、放射能が少ない特殊な鉛で覆って外部放射能を遮断した。第 3 に、ゲルを通常の 10 μm の厚さのサララップで包むとシグナルが減弱するため、厚さ 1.5 μm のポリエチレンテレフタレートフィルム (帝人デュボン) で包んだ。最後に、厚さ 10 μm のコーティングがされた通常のイメージングプレートを用いるとシグナルが減弱してしまうため、コーティングの無いイメージングプレートを使用した。図 1 に、ラット海

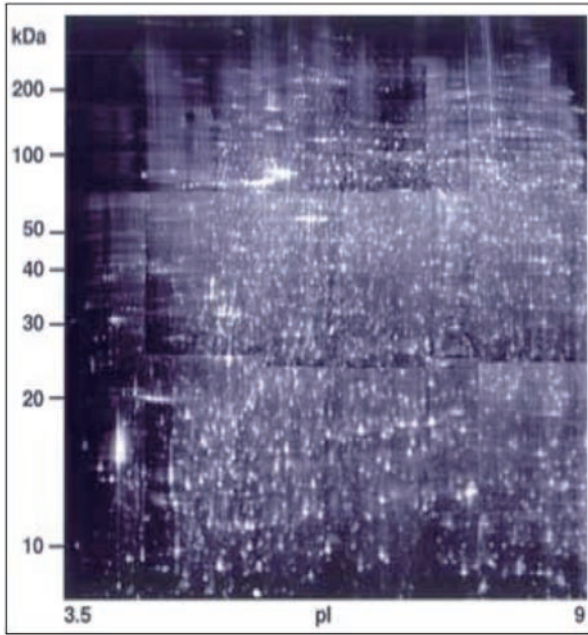


図1 93 cm × 103 cm ラージゲルを用いたラット海馬培養神経細胞のタンパク質の分離(文献7を引用)

馬の培養神経細胞のタンパク質を分離した 93 cm × 103 cm の合成二次元ゲルの結果を示した<sup>7)</sup>。ゲル上のタンパク質の分離能と検出感度を向上させたことで、ゲル上のスポット数は市販の 18 cm × 20 cm ゲルを用いた場合の 10 倍以上に上がり、約 11,000 個のタンパク質のスポットが検出された。

さらに、タンパク質を同定するために質量分析を行った。質量分析の試料調製のために行うゲル内消化の際に、sodium 3-[(2-methyl-2-undecyl-1,3-dioxolan-4-yl) methoxy]-1-propanesulfonate (ALS) 処理を行った。ALS は溶液中のトリプシンによるタンパク質の消化効率を改善し、酸性条件下で分解され、それ自身は質量分析に影響を与えないという利点がある。[<sup>35</sup>S]でラベルされたタンパク質を ALS 処理してトリプシン消化を行い、得られたペプチドの放射活性を MALDI-TOF MS を用いて解析したところ、ペプチドのピーク数とアミノ酸配列を読み取る効率がともに著しく改善した<sup>8)</sup>。以上のように、二次元電気泳動法と質量分析法の高感度化を行い、従来の方法では検出することができ

なかったタンパク質を同定することが可能となった。

我々は、本法を利用して極性形成過程で発現量が上昇するタンパク質と、軸索に濃縮するタンパク質のスクリーニングを試みた。その結果、極性形成に伴い発現量が上昇する 277 個のタンパク質、および軸索に濃縮する 200 個のタンパク質を検出した<sup>9)</sup>。さらに、これらに共通する約 23 個のタンパク質から新規分子 Shootin1 と Singar1 を同定した<sup>9,10)</sup>。

**神経細胞の極性化・軸索形成を担う分子:  
Shootin1, Singar1, Rab33a**

Shootin1 はプロテオーム解析により極性形成過程で発現量が上昇し、軸索に濃縮するタンパク質として同定された<sup>9)</sup>。そこで、培養神経細胞の極性形成過程における Shootin1 のライブイメージングを行った。その結果、非対称性を獲得する前では、Shootin1 は複数の未成熟な突起の先端で濃縮と消失をゆらぐように繰り返し、これに対応して未成熟な突起が伸長と退縮を繰り返した。その後、ある 1 本の突起先端に Shootin1 が強く濃縮すると、その突起は急速に伸長して軸索となり神経細胞の対称性が破れた<sup>11)</sup> (図 2)。Shootin1 を過剰発現させると、神経細胞に複数の軸索が形成され、発現抑制させると軸索の形成が抑えられた。このことから、Shootin1 は神経細胞の軸索形成を促進することが明らかとなった<sup>9)</sup>。

Singar1 は、極性形成過程で発現量が上昇する神経特異的なタンパク質として同定された<sup>10)</sup>。Singar1 の発現を抑制させると神経細胞に複数の軸索が形成された。一方、Singar1 を単独で過剰発現させても神経細胞の形態に影響を与えないように見えるが、Singar1 の過剰発現下では Shootin1 の過剰発現による複数の軸索形成が抑えられ、軸索が 1 本となった。このことから、Singar1 は、神経細胞の過剰軸索の形成を抑制し極性を安定化させる役割があると考えられた<sup>10)</sup>(図 3)。

Rab33a は Singar1 と相互作用する分子として同定された。Rab33a は神経特異的なタンパク質で、過剰発現させると神経細胞に複数の軸索が形成され、発現を抑制させると軸索の形成が抑えられた。このことから、Rab33a は神経軸索の形成に重要な役割を果たすと考えられた<sup>12)</sup>。

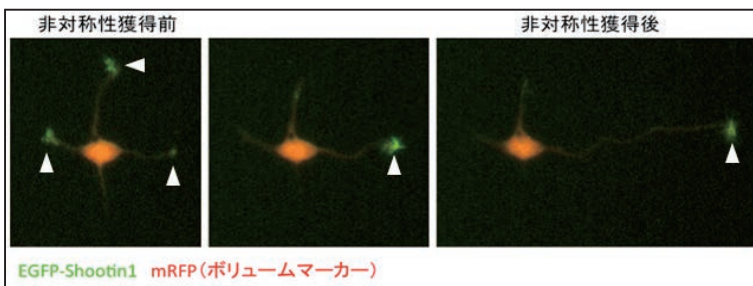


図2 極性形成時における神経細胞の形態変化と Shootin1 のライブイメージング。矢頭は Shootin1 を示す。(文献10を引用・改変)

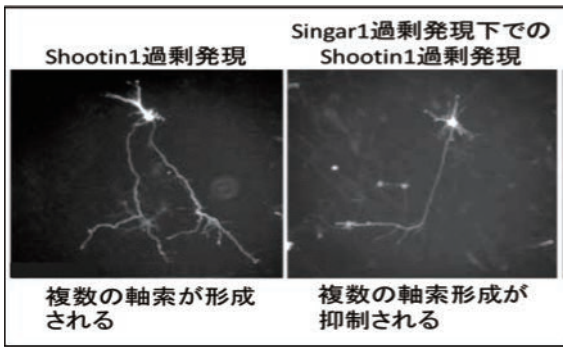


図3 Singar1は過剰軸索の形成を抑制する(文献10を引用・改変)

### 神経細胞の軸索伸長とガイダンスの分子機構

神経細胞が軸索を伸長させるためには、軸索先端にある成長円錐を前進させる力を生み出す必要がある。その力を生み出すメカニズムとしてクラッチモデルが提唱されている<sup>13-15</sup>。クラッチモデルは、成長円錐において重合・脱重合(トレッドミリング)を繰り返すアクチン線維が、クラッチ分子を介して細胞接着分子と連結することで成長円錐を前進させるための牽引力を生み出すという仮説である。しかしながら、クラッチ分子の実体はよくわかっていなかった。我々は、Shootin1がトレッドミルするアクチン線維と細胞接着分子L1を連結するクラッチ分子として機能することを明らかにした<sup>16</sup>。また、成長円錐は軸索ガイダンスにおいても重要な役割を果たしている。成長円錐が軸索ガイダンス因子Netrin-1で刺激されると、軸索が刺激された方向に向かって伸長することが知られている。そこで、Netrin-1刺激による軸索伸長の促進にShootin1が関与するのかを検証した。その結果、成長円錐をNetrin-1で刺激すると、Shootin1はリン酸化酵素Pak1によりリン酸化され、牽引力を増加させ、軸索伸長を促進させた。このことから、Shootin1がNetrin-1によって引き起こされる細胞内シグナル伝達を軸索伸長のための牽引力へ変換すると考えられた<sup>17</sup>(図4)。

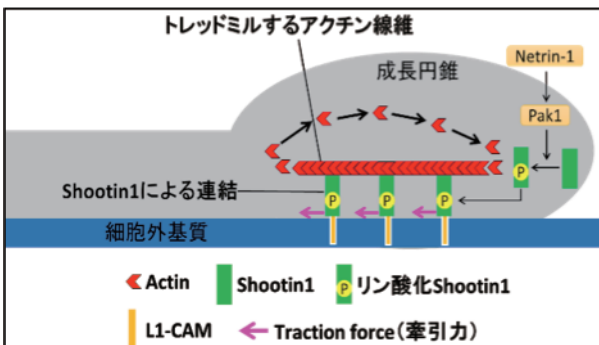


図4 Shootin1がNetrin-1によるシグナル伝達を軸索伸長のための牽引力へ変換する仕組み(文献17を引用・改変)

また、軸索伸長のためには軸索先端にある成長円錐の細胞膜表面を拡大させなければならない<sup>18</sup>。細胞内の膜輸送にはRabファミリータンパク質が関与することが知られており、これまでの研究でRab5, Rab8, Rab11がエンドサイトーシスにより取り込まれた膜成分を、軸索先端の膜へリサイクルすることが報告されている<sup>11</sup>。しかし、細胞体で新たに作られた膜成分を軸索先端に輸送するメカニズムはよくわかっていなかった。そこで、Rab33aの局在を調べたところ、膜成分を新たに合成する細胞体のゴルジ装置から軸索先端に至るまでの輸送経路にそって局在することが解った。また、SypHyという膜融合の際に光るタンパク質と全反射顕微鏡を用いて、成長円錐における膜融合の頻度を解析したところ、Rab33aの発現抑制により成長円錐における膜融合の頻度が減少することがわかった。また、それに応じて、軸索の伸長が抑制された。以上の結果から、Rab33aは細胞体で新たに合成された膜成分を軸索先端へと輸送し、成長円錐の膜表面を拡大させ、軸索伸長をひきおこすと考えられた<sup>12</sup>(図5)。

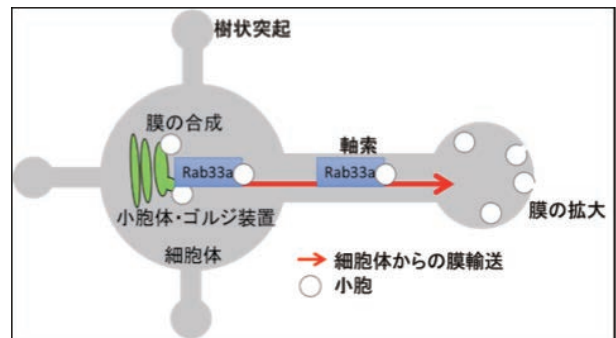


図5 Rab33aによる細胞体から軸索先端への膜輸送機構

### おわりに

本稿では、二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析の高感度化と、本法を用いて同定された、Shootin1, Singar1, Rab33aによる神経極性形成や軸索形成・ガイダンスの仕組みについて述べてきた。二次元電気泳動法は、手間はかかるが強力で大変魅力的な研究手法である。今後のさらなる改良と応用が期待される。

### 文献

- 1) 稲垣直之. ニューロンの極性を担う細胞内シグナル経路. 宮田卓樹, 山本亘彦 編. 脳の発生学. 化学同人. 2013. 72-89.
- 2) Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with

- immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000;21: 1037-1053.
- 3) Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*. 2002;2:3-10.
  - 4) Tonella L, Hoogland C, Binz PA, *et al.* New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation. *Proteomics*. 2001;1:409-423.
  - 5) O'Neill EE, Brock CJ, von Kriegsheim AF, *et al.* Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics*. 2002;2: 288-305.
  - 6) Oguri T, Takahata I, Katsuta K, *et al.* Proteome analysis of rat hippocampal neurons by multiple large gel two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*. 2002;2: 666-672.
  - 7) Inagaki N, Katsuta K. Large gel two-dimensional electrophoresis: improving recovery of cellular proteome. *Curr Proteomics*. 2004;1: 35-39.
  - 8) Nomura E, Katsuta K, Ueda T, *et al.* Acid-labile surfactant improves in-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel protein digestion for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping. *J Mass Spectrom*. 2004; 39:202-207.
  - 9) Toriyama M, Shimada T, Kim KB, *et al.* Shootin1: A protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *J Cell Biol*. 2006;175: 147-157.
  - 10) Mori T, Wada T, Suzuki T, *et al.* Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity. *J Biol Chem*. 2007 ; 282 :19884-93.
  - 11) Toriyama M, Sakumura Y, Shimada T, *et al.* A diffusion-based neurite length-sensing mechanism involved in neuronal symmetry breaking. *Mol Syst Biol*. 2010;6:394.
  - 12) Nakazawa H, Sada T, Toriyama M, *et al.* Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. *J Neurosci*, 2012 ; 32 : 12712-25.
  - 13) Lowery LA, Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 ; 10 : 332-43.
  - 14) Suter DM, Forscher P. Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol*. 2000 ; 44 : 97-113.
  - 15) Mitchison T, Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1988;1: 761-772.
  - 16) Shimada T, Toriyama M, Uemura K, *et al.* Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *J Cell Biol*. 2008;181;817-829.
  - 17) Toriyama M, Kozawa S, Sakumura Y, *et al.* Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through Pak1-mediated shootin1 phosphorylation. *Curr Biol*. 2013 ; 23 : 529-34.
  - 18) Pfenninger KH. Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat Rev Neurosci*. 2009 ; 10 : 251-261.