

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：38005
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2022
課題番号：19K06796
研究課題名（和文）横断的クロスリンクプロテオミクスによるシナプスタンパク複合体の進化的起源の解明

研究課題名（英文）Evolutionary origin of synaptic protein complexes

研究代表者
早川 英介（Hayakawa, Eisuke）

沖縄科学技術大学院大学・進化神経生物学ユニット・グループリーダー

研究者番号：20739809
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：神経系は多細胞動物の進化の過程で獲得された重要で組織であり、多彩なタンパク質の複合体によりシグナル伝達系を制御している。神経機能に関するタンパク質複合体は動物の神経系獲得前後に急速に進化したと考えられているが、その過程はまだ明らかではない。本研究ではシナプス機能に關与するタンパク質の機能的な複合体の進化を組織的に明らかにすることを目指し、質量分析およびシングルセルトランスクリプトームを用いた網羅的な解析を行った。その結果、有節動物のような原始的な生物においてもシナプスの機能に關与するタンパク質群が神経細胞クラスターに共発現し高等動物と同様の分子マシーナリーを持つことを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
動物の組織には数万ものタンパク質が存在しているがほとんどの場合機能的な複合体を形成しそれにより高度な機能が実現している。生命現象を理解するためにはタンパク単体ではなく、タンパク複合体を機能的マシーナリーとして明らかにすることが必要不可欠である。
本研究では最も原始的な神経系を持つと考えられている有節動物において高等動物のシナプスと同様の分子マシーナリーがセットで働いていることを示す結果が得られた。本研究成果は原始的な動物で神経系がどのように獲得され進化してきたかを論ずる上で重要な知見であり、今後の進化生物学における神経系の議論に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Nervous system is a vital and complex tissue acquired during the evolution of multicellular organisms, controlling the signaling pathways using various protein complexes. Protein complexes involved in neural functions are believed to have rapidly evolved before and after the acquisition of the nervous system in animals, although the underlying processes remain unclear. In this study, we aimed to systematically elucidate the evolution of the functional protein complexes as molecular machineries involved in synaptic functions, employing comprehensive analyses using mass spectrometry and single-cell transcriptomics. Our findings revealed the co-expression of protein groups involved in synaptic functions within neural cell clusters, suggesting the presence of molecular machinery similar to that of higher animals, even in the most primitive animal Ctenophora.

研究分野：生化学

キーワード：生化学 進化生物学 質量分析 神経 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

動物の組織には数万ものタンパク質が存在しているが、そのほとんどは機能的な複合体を形成しそれにより高度な機能が実現している。生命現象を理解するためにはタンパク質単体ではなく、タンパク質複合体を機能的な分子マシーナリーとして明らかにすることが必要不可欠である。神経系は多細胞動物の進化の過程で獲得された重要で複雑な組織であり、多彩なタンパク質の複合体によりシグナル伝達系を制御している。神経機能に関するタンパク質複合体は多細胞動物の神経計獲得前後に急速に進化したと考えられているが、その過程はまだ解明されていない。

近年ではゲノム解析が比較的容易になってきたにもかかわらず機能的なタンパク複合体の解明はまだまだ容易ではない。ゲノム解析から明らかになるのはタンパク質単体の構造のみであり、そこから複合体の構成・機能を明らかにすることは不可能である。近年の広範囲なゲノム解析の結果、原始的な単細胞動物や神経を持たない多細胞動物にも神経系の機能に關与するタンパク質のホモログが見つかってきた。つまり、進化の過程におけるシナプスの機能に關与するタンパク質複合体の理解にはゲノム解析では不十分であり、異なったアプローチにより神経組織に存在するタンパク複合体・分子マシーナリーを明らかにすることが求められていた。

2. 研究の目的

本研究では最新の質量分析とインフォマティクスを用いた組織的な解析により、シナプス機能に關与するタンパク質の機能的な複合体の進化を明らかにすることを目指した。従来、シナプスの分子機構については、ゲノム配列から見出したタンパク質個々の保存性に基づいた議論が主流であった。それに対して、本研究では、質量分析によるタンパク質複合体の横断的な解析、さらにシングルセルトランスクリプトームとの連携により神経伝達に關与する機能的な分子マシーナリー・複合体の進化的起源を明らかにすることを目的にした。

2. 研究の方法

本研究では比較的多量に存在する構造タンパク質複合体に関してはプロテインコリレーションプロファイリング (PCP) 法を用いて解析を行った。PCPでは動物組織から抽出したクロスリンクされたタンパク複合体をサイズエクスクルージョンクロマトグラフィー (SEC) で分離し、60ほどのフラクションを得る。各フラクションに関してクロスリンクを解除した後トリプシン処理によりタンパク質をペプチド断片化する。それらのペプチドに関して LC-MS で比較定量解析を行うことで、各フラクションに含まれる量を基にしてタンパク質の SEC での挙動のパターンの相関性から複合体の予測を行った。

加えて、比較的微量に存在する・または PCP では検出できないタンパク質に関してはシングルセルトランスクリプトームを活用した複合体予測を行った。質量分析で同定した神経伝達物質 (神経ペプチド) に関してシングルセルトランスクリプトームにおいて特異的に発現する細胞クラスターを特定した。このクラスターにおける特異的な共発現にもとづいてシナプス機能に関連するタンパク質の機能的な連携の予測を行った。

4. 研究成果

PCPによるタンパク質複合体解析のためのハイスループット・高感度な LC-MS 分析環境の設定およびフラグメントスペクトルライブラリを構築した。さらに、SEC フラクシオンの比較定量解析結果から各タンパク質の SEC 溶出パターンのピーク検出およびタンパク質同士のピーク形状の相似性計算を総当たりで行うデータ解析パイプラインを構築した。この分析・データ解析システムを用いることで、*N. vectensis* から高等動物で知られていた多数のタンパク複合体 (神経活動に必須な複合体を含む) が推定され、これらのタンパク複合体が進化上保存されていることが示唆された。

一方で、推定されたタンパク複合体は比較的多量に存在する構造タンパク質から構成されるものに限られ、当初想定していたシナプス機能に直接関連するタンパク質 (酵素・輸送タンパク等) の複合体は PCP で見出すことはできなかった。その原因として、SEC により調整した試料ではフラクシオネーションにより各タンパク質が希釈されることで LC-MS によるタンパク質検出の感度が著しく低くなるという問題があった。この技術的課題は今後も改善に取り組む必要がある。

そこで補完的な取り組みとして、シングルセルトランスクリプトームを利用した細胞クラス

ターにおけるタンパク質群の共発現解析を行った。有節動物 *B. mikado* および刺胞動物 *N. vectensis* に関して、同定した神経ペプチドを発現する細胞クラスターにおいて神経伝達物質に関連した合成・プロセッシング・アミド化酵素群や、神経伝達物質輸送系の機能的タンパク質群、Neurexin を含むシナプス特有の複合体を形成するタンパク質が特異的に共発現していることを明らかにした。これによりシナプス機能に関与し、複合体を形成する機能的タンパク質群の機能的な関連性が最も原始的な神経様細胞を有する有節動物まで保存されていることが分かった。

本研究はこれまで明らかでなかったシナプス機能に関わるタンパク質複合体の機能的な起源・保存性を明らかにし、それら機能的な分子マシーナリーが最も原始的な神経系である有節動物からすでに存在していたことを強く示唆するものである。本研究成果は進化生物学における神経系の起源と進化に関する議論に大きく貢献する重要な知見と言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayakawa E, Guzman C, Horiguchi O, Kawano C, Shiraiishi A, Mohri K, Lin MF, Nakamura R, Nakamura R, Kawai E, Kawai E, Komoto S, Jokura K, Shiba K, Shigenobu S, Satake H, Inaba K, Watanabe H	4. 巻 6
2. 論文標題 Mass spectrometry of short peptides reveals common features of metazoan peptidergic neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 1438-1448.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41559-022-01835-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa Eisuke, Watanabe Hiroshi, Menschaert Gerben, Holstein Thomas W., Baggerman Geert, Schoofs Liliane	4. 巻 14
2. 論文標題 A combined strategy of neuropeptide prediction and tandem mass spectrometry identifies evolutionarily conserved ancient neuropeptides in the sea anemone Nematostella vectensis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Eisuke Hayakawa, Christine Guzman, Osamu Horiguchi, Chihiro Kawano, Ryotaro Nakamura, Kazuo Inaba & Hiroshi Watanabe
2. 発表標題 Peptidomics and single cell transcriptome reveal the evolutionary origin of nervous system
3. 学会等名 第70回質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eisuke Hayakawa, Christine Guzman, Osamu Horiguchi, Chihiro Kawano, Ryotaro Nakamura, Kazuo Inaba & Hiroshi Watanabe
2. 発表標題 ペプチドミクスとシングルセルトランスクリプトミクスが解き明かすペプチド作動性神経の進化的起源
3. 学会等名 第16回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 HAYAKAWA, E., HORIGUCHI, O., KAWANO, C., JOKURA, K., SHIBA, K., INABA, K. SHIGENOBU, S. AND WATANABE, H
2. 発表標題 MASS SPECTROMETRY-BASED NEUROPEPTIDOMICS TO DISSECT CTENOPHORE NERVOUS SYSTEM
3. 学会等名 International Workshop “At the roots of bilaterian complexity: insights from early emerging metazoans” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川英介
2. 発表標題 ゲノムから読み取れない生物進化：質量分析インフォマティクスからのアプローチ
3. 学会等名 日本バイオインフォマティクス学会2020年年会 第9回生命医薬情報学連合大会 IIBMP2020 BOFセッション (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 早川英介：質量分析インフォマティクスによる未知化合物の構造推定 (馬場 健史、平山 明由、松田 史生、津川 裕司 編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 334
3. 書名 メタボロミクス実践ガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 寛 (Watanabe Hiroshi) (80356261)	沖縄科学技術大学院大学・進化神経生物学ユニット・准教授 (38005)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------