

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：82611
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22700406
 研究課題名（和文） プロテオミクス解析を用いた小脳発達制御因子 P t f 1 a の機能解析

研究課題名（英文） Functional analyses of Ptf1a by Proteomic approach
 研究代表者 田谷 真一郎（TAYA SHINICHIRO）
 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・
 病態生化学研究部・室長

研究者番号：60362232

研究成果の概要（和文）：マウス小脳をモデル系として、転写因子Atoh1を発現する領域が全種類の興奮性神経細胞を、転写因子Ptf1aを発現する領域が全種類の抑制性神経細胞を生み出すことが報告されている。本研究は、転写因子Ptf1aの結合分子をプロテオーム解析により網羅的に同定することで、異なる種類の神経細胞が産み出される分子機構の解明を遂行する。研究成果として、Ptf1a結合候補分子を542分子同定することに成功した。候補分子を8分子に絞り込み、Ptf1aに直接結合する分子として6分子同定した。さらに、複数の分子が抑制性神経細胞の中でもプルキンエ細胞の細胞系譜でのみ発現するということが明らかになった。また、Ptf1aノックアウトマウスでその発現が失われるということから、Ptf1a遺伝子の下流で働く分子でも同定することができた。さらに、興奮性神経細胞の産生についても解析するためにAtoh1結合分子についても解析を行った。その結果、Atoh1ノックアウトマウスでその発現が失われる分子を同定できた。以上の結果から、プロテオミクス解析により複数の分子がAtoh1/Ptf1aの下流で興奮性/抑制性神経細胞の形質獲得に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The cerebellum contains a relatively small variety of neurons, however, the molecular machinery governing neuronal generation and/or subtype specification is still poorly understood. Our groups report that Ptf1a is involved in cerebellar GABAergic neuron production. However, it remains unknown how the cascade of Ptf1a determines the fate of neuronal subtype in the cerebellum. To understand the molecular mechanisms underlying neuronal development by Ptf1a signaling, I identified Ptf1a-interacting proteins by proteomic approach. Here, I have examined that Atoh1 or Ptf1a interacts with its interacting candidate proteins in vitro. Furthermore, I analyzed expression of these molecules in the developmental cerebellum. Several molecules were expressed in Ptf1a- or Atoh1-lineage cells, and expression pattern of these molecules were changed in Ptf1a or Atoh1 KO mouse. These results suggested that proteomic analyses were useful for identification of molecules associated with Ptf1a or Atoh1 in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

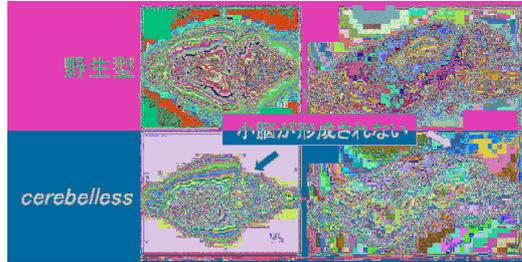
研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学

キーワード：神経科学、プロテオミクス、転写因子

1. 研究開始当初の背景

私共の所属する研究室では、小脳皮質を完全に欠損するマウス突然変異体 (*cerebellless* と命名) を単離し、その原因遺伝子として *Pancreas transcription factor 1a* (*Ptf1a*) を同定している (図1)。



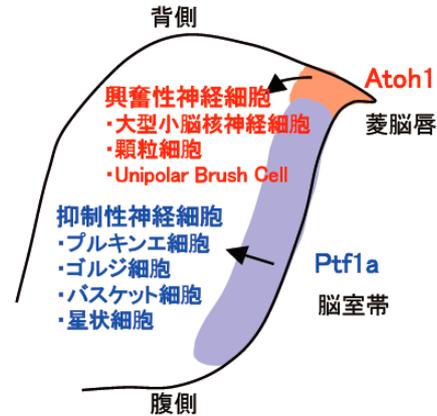
(図1) 小脳皮質を完全に欠損するマウス突然変異体 (*cerebellless*)

また、*Ptf1a* ノックアウトマウスの表現系は、小脳発達阻害であることも確認している。さらに、小脳脳室帯で *Ptf1a* が GABA 作動性神経細胞の誕生を司っていることを明らかにしている (Hoshino et al., *Neuron*, 2005)。*Ptf1a* は bHLH 型転写因子であることから、*Ptf1a* に転写調節を受けている分子が小脳の発達・形成に必須であることが予想される。他のグループの報告として、*LIM homeobox protein 1/5* (*Lhx1/5*) のダブルノックアウトマウスや *Lhx1/5* の co-factor である *LIM domain-binding protein 1* (*Ldb1*) の conditional ノックアウトマウスの表現系が、小脳発達阻害であることも報告されている (Zhao, et al., *PNAS*, 2007)。また、homeobox protein である *Dlx2* や *Dlx5* を過剰発現させると異所的に GABA 作動性神経細胞を生み出すことも報告されている (Stuhmer et al., *Development*, 2002)。従って、*Ptf1a* を含む複数の分子により小脳の発達は制御されている可能性が非常に高いと考えられる。しかしながら、個々の分子の遺伝学的相互作用や *in vivo* での効果は検討されているが、それらの分子間の検討はあまりなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

小脳原基の神経上皮細胞は、性質の異なる 8-9 種類の神経細胞を生み出す。やがて、個々の神経細胞は特異性を獲得し、複雑な神経回路網を構築することで、小脳形成に至る。しかしながら、その分子機構は最近までほとんど未解明であった。近年、私共の研究室を含む複数のグループが、ノックアウトマウスを用いた解析等から、小脳発達を制御する複数の分子を報告した (図2)。しかし、個々の分子の重要性は十分に示されているが、小脳発達制御に関する分子機構は未だ不明な点が多い。

本研究の目的は、小脳の神経細胞の発生に関与する転写因子 *Ptf1a* を研究題材にし、小脳発達の分子メカニズムを解明することである。その結果、本研究が脊髄小脳変性症をはじめとする小脳神経疾患の病態解明の足がかりになることも目的としている。



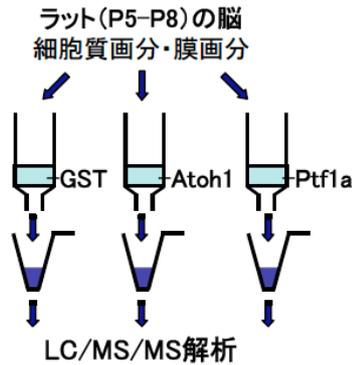
(図2) 小脳原基における興奮性・抑制性神経細胞産出の領域化

3. 研究の方法

小脳発達制御因子 *Ptf1a* の生理機能を生化学的・細胞生物学的・発生学的に明らかにする。まず、生化学的に *Ptf1a* 結合分子を網羅的に同定する。次に、*Ptf1a* と結合分子がいかんして小脳発達に関与するのかを細胞生物学的に解明する。最終的には、*Ptf1a* ノックアウトマウスやノックインマウスを用いて、発生学的・行動学的に個体レベルでの検証を行う。

(1) *Ptf1a* 新規結合分子のプロテオミクス解析

Ptf1a 新規結合分子の同定には、アフィニティカラムクロマトグラフィー法による結合蛋白質の調製、液体クロマトグラフィーと質量分析 (LC/MS/MS) による同定 (ショットガン解析) を試みる (図3)。この手法を用いることで、極微量な分子の同定も可能になる。また、カラムにかかるサンプルには、ラットやマウスの脳抽出物を用いる。時期・領域特異的な結合蛋白質を同定する為に、異なる発生段階の脳や様々な領域のサンプルを調整し時間的・空間的に結合する分子を同定する。さらに、DNA 結合分子は DNA を介して非特異的な結合をする可能性が高い。そこで、精製した bait (複数のタグを用いる) となる蛋白質やラット脳抽出物を DNase や RNase 等で処理し、核酸を介さない直接結合する分子の同定も試みる。



(図3) ショットガン解析

(2) 小脳発達形成時における Ptf1a の機能解析

上記のショットガン解析はスクリーニングであるため、さらに、同定した Ptf1a 結合候補分子の選別を行う。Ptf1a の脳での発現は発生初期の小脳に限定している。従って、相互作用する分子であるためには時間的・空間的にオーバーラップしていなければならない。そこで、公開されているデータベースや文献を利用して、条件の適合する分子を選別する。データの信憑性の低い或は報告のない場合は、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて検討する。分子の選別が終わった後に、精製した蛋白質を用いて in vitro の結合実験や免疫沈降法による in vivo での結合実験を行う。可能なら特定の分子と相互作用できない Ptf1a のポイントミュータントを作製する。また、免疫染色を行うことで時間的・空間的に同じ細胞に発現していることを確認する。

(3) Ptf1a ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの解析

すでに私共の研究室では、Ptf1a ノックアウトマウスを作製済みである。そこで、上記(2)で得られた結果が個体レベルで反映されるか検討する。Ptf1a ノックアウトマウスでの発現レベル・局在等の変化を mRNA/蛋白質レベルで検討する。また、クロマチン免疫沈降により同定することができた転写制御を受けている分子の発現レベルも詳細に検討する。さらに、Ptf1a の結合分子として in vitro, in vivo でもポジティブな結果が得られた分子に関しては、ノックアウトマウスの作製に着手する。

(4) 小脳発達形成時における Ptf1a 結合分子の機能解析

スクリーニングの結果を鑑みて、さらに結合分子との相関関係を調べる。結合分子を子宮内遺伝子導入法で強制発現させ、あるいは shRNA を導入することでノックダウンの効果を検討する。小脳発達には多くの分子が関与

していると考えられるので、研究期間内にできるだけ多くの分子の解析を行い、小脳発達の分子機構を包括的に解明したいと考えている。

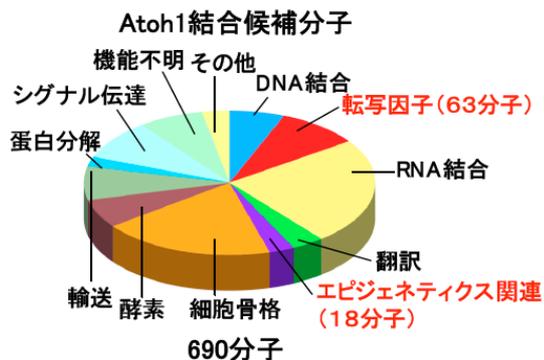
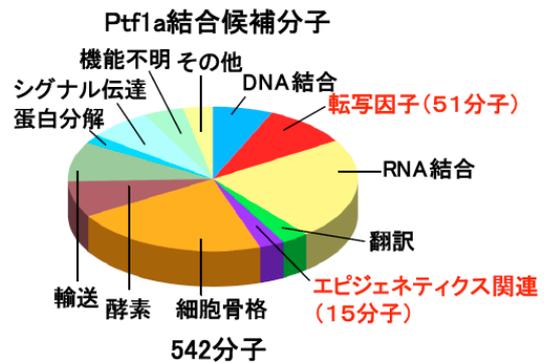
(5) Atoh1 新規結合分子のプロテオミクス解析

Ptf1a の発生制御機能とは正反対の発生制御機能を有する Atoh1 新規結合分子の同定を Ptf1a と同様に行う。

4. 研究成果

(1) ショットガン解析による Ptf1a/Atoh1 新規結合蛋白質の同定

Ptf1a の結合分子を同定するために、アフィニティカラムクロマトグラフィーによる結合蛋白質の調製、液体クロマトグラフィーと質量分析 (Lc/Ms/Ms) による同定 (ショットガン解析) を試みた。Bait となる融合蛋白質には 2 種類のタグ (Gluthatione-S-transferase (GST) と Maltose binding protein (MBP)) を用いることで、実験の整合性を検討した。用いた細胞抽出液は、部位の大きさの利点からラットの生後 5-8 日の脳を採用した。その結果、多数の Atoh1 結合候補分子 (GST タグから 403 種、MBP タグから 458 種、全 690 種)、Ptf1a



(図4) Ptf1a/Atoh1 結合候補分子の分類

結合候補分子 (GST タグから 342 種、MBP タグから 324 種、全 542 種) を同定することに

成功した。

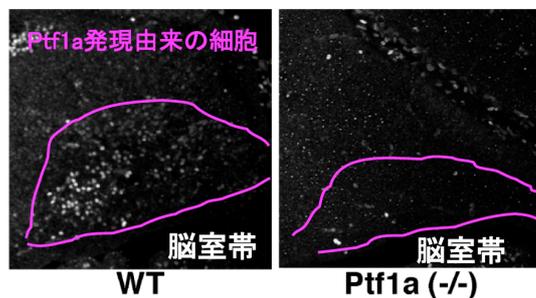
Atoh1 特異的分子としては 307 種、Ptf1a 特異的分子としては 159 種の分子を同定した。すべての分子を解析する訳にはいかないのので、文献や予測される機能ドメインからカテゴリ別に分類した (図 4)。

(2) Ptf1a/Atoh1 結合蛋白質の選定

ショットガン解析の問題点としては、同定した分子が直接結合するのか、あるいは複合体の一部の分子として間接結合するのかが不明である。そこで、精製した蛋白質を用いて *in vitro* の結合実験を行う。また、結合する意味合いを明確にするため、ある分子に対し結合できなくなるような特異的なポイントミュータントを作製する。まず、文献的に神経発生に関与し小脳での発現が確認できている 8 分子を選別した。そのうち、7 分子が Atoh1 と 6 分子が Ptf1a と直接結合することを確認した。

(3) Ptf1a 結合蛋白質の機能解析

Ptf1a 結合分子として Myocyte enhancer factor 2C (Mef2C) を同定した。筋組織で、bHLH 型転写因子 MyoD が Mef2C のプロモーターに結合し転写の引き金になり、合成された Mef2C が MyoD と結合することで自身の転写を増幅させることが報告されている (Wang, et al., Development, 2001)。さらに、Mef2C が抑制性神経細胞の産出に関与している Dlx2/5 の転写を調節していることが報告されている (Verzi, et al., Dev. Cell, 2007)。以上の報告から、Ptf1a→Mef2C→Dlx2/5 といった分子機構が考えられる。Ptf1a の下流に Mef2C が存在しているのか、小脳において Mef2C あるいは Dlx2/5 がどの種類の抑制性神経細胞を誘導するのかを検討する。以上のような仮説に基づき本研究では、Ptf1a 由来の細胞に Mef2C が発現していること、そしてその発現が Ptf1a ノックアウトマウスで消失することを確認した (図 5)。



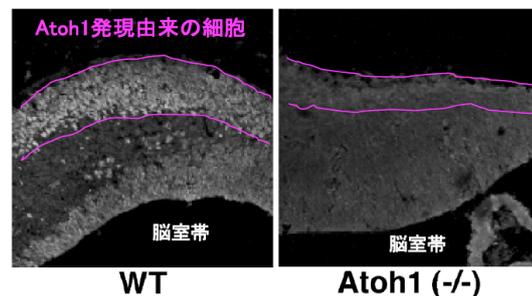
(図 5) 小脳での Mef2C の発現

Mef2C は、Ptf1a ノックアウトマウスでその発現が失われるということから、Ptf1a 遺伝子の下流で働く分子であることが推測される。以上のことから、Mef2C が Ptf1a の下

流でプルキンエ細胞の形質獲得に関与している可能性が示唆された。

(4) Atoh1 結合蛋白質の機能解析

また、Atoh1 結合分子として Meis homeobox 1/2 (Meis1/2) を同定した。Meis1/2 を視神経に過剰発現させると Pax6 の転写調節を直接制御し、Pax6 の発現を誘導することが報告されている (Zhang, et al., Genes Dev., 2002)。小脳において、Pax6 は顆粒細胞 (興奮性神経細胞) のマーカー分子として認知されている。すでに、顆粒細胞を産み出さない領域 (脳室帯) に Atoh1 を異所的に発現させると、そこから Pax6 陽性の顆粒細胞を生み出すということを見出している。従って、Atoh1 の下流に Pax6 の存在が示唆される。以上の結果から、Atoh1 と Meis family が複合体を形成した際に Pax6 の発現量に変化を与える可能性を考えている。また、Meis family の中で、どの分子が顆粒細胞産生に関与するのかを検討する。もし、Atoh1 が Meis family の転写を直接制御するようであれば、Atoh1→Meis family→Pax6 とシンプルな分子機構が明らかになる。以上のような仮説に基づき本研究では、Atoh1 由来の細胞に Meis1 が発現していること、そしてその発現が Atoh1 ノックアウトマウスで消失することを確認した (図 6)。



(図 6) 小脳での Meis1 の発現

以上のことから、複数の分子が Atoh1/Ptf1a の下流で興奮性/抑制性神経細胞の形質獲得に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件) 査読有り

1. Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Hikita T, Taya S, Kaibuchi K, Ozaki N. Immunohistochemical study of vesicle monoamine transporter 2 in the hippocampal region of genetic animal model of schizophrenia. *Synapse*, 64, 948-953, 2010
DOI: 10.1002/syn.20846
2. Nagai T, Kitahara Y, Shiraki A, Hikita T, Taya S, Kaibuchi K, Yamada K. Dysfunction of dopamine release in the prefrontal cortex of dysbindin deficient sandy mice: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett.*, 470, 134-138, 2010
DOI: 10.1016/j.neulet.2009.12.071

[学会発表] (計4件)

1. 田谷真一郎、大輪智雄、西岡朋生、貝淵弘三、星野幹雄：小脳発達制御因子 Atoh1 および Ptfla に結合する分子のプロテオミクス解析 第33回日本分子生物学会、神戸、2010年12月10日
2. Yamada M, Taya S, Owa T, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M: Spatial specification of cerebellar neuroepithelium by bHLH transcription factors, Ptfla and Atoh1, during development. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011
3. Owa T, Taya S, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M: Searching for novel binding partners of Atoh1 and Ptfla, cerebellar development-related proteins using Proteomic analyse. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011
4. Owa T, Taya S, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M: Proteomic analyses of novel binding partners of Atoh1 and Ptfla, cerebellar development-related proteins. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月14-17日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田谷 真一郎 (TAYA SHINICHIRO)

独立行政法人 国立精神・神経センター・
神経研究所・病態生化学研究部・室長
研究者番号：60362232