

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650214

研究課題名（和文） プロテインキナーゼ C の生体内での基質の網羅的探索

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of *in vivo* substrates of protein kinase C

研究代表者

饗場 篤 (AIBA ATSU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20271116

研究成果の概要（和文）：

プロテインキナーゼ C (PKC) γ は小脳において運動協調やプルキンエ細胞におけるシナプス除去に重要な役割を担っていることが知られている。しかし、生体内における PKC γ の基質が同定されていないために、その分子メカニズムは不明であった。本研究ではマウス小脳を用いた定量的リン酸化プロテオミクスによって、生体内における PKC γ の基質候補を同定することができた。これらの分子の機能解析によって、PKC γ による小脳機能の制御メカニズムが明らかになると期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Protein kinase C (PKC) γ is involved in cerebellar functions such as motor coordination and elimination of climbing fiber-Purkinje cell synapses. Molecular mechanisms of PKC γ -regulating cerebellar processes are elusive, due to the heretofore undescribed *in vivo* substrates of PKC γ . In this study, a series of candidate molecules for PKC γ substrates in mouse cerebellum was identified by quantitative phospho-proteomic analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：脳分子プロファイリング

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ C (PKC) の *in vivo* での機能は個々のサブタイプのノックアウトマウスの解析等により明らかにされてきた。古典的 PKC の γ サブタイプは中枢神経系の小脳

プルキンエ細胞で強く発現し、申請者は、PKC γ ノックアウトマウスの解析に従事した経験がある [Kano *et al.* Cell 83:1223(1995)]。その解析により、PKC γ は運動協調能や登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達期にお

ける過剰シナプスの除去に関与していることが明らかとなった。一方で、PKC γ がどのようにしてシナプス除去に関与しているかは、PKC γ のプルキンエ細胞での基質が明らかでないこと等から不明であった。そこで、本研究では、野生型マウスとPKC γ ノックアウトマウスの小脳からタンパク質を抽出し、そのリン酸化タンパク質を定量解析することにより、小脳でPKC γ によりリン酸化されるタンパク質の網羅的解析を行い、PKC γ の *in vivo* での機能の分子基盤を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

ヒト・マウス等のゲノム解析が終了した現在、タンパク質リン酸化酵素遺伝子の同定については、ほぼ終了したと考えてよい。一方で、同定された個々のリン酸化酵素の基質の探索は *in vitro* (試験管内) で主に行われており、*in vivo* (種々の臓器) の基質はほとんど明らかになっていないことが実情である。本研究では、プロテインキナーゼ C (PKC) γ の *in vivo* の基質を、PKC γ ノックアウトマウスと質量分析装置によるリン酸化蛋白質の網羅的定量解析の手法を融合させる新手法により同定することを目的とする。

3. 研究の方法

野生型およびPKC γ ノックアウトマウスの小脳から抽出して得たリン酸化ペプチドを濃縮・精製し、質量数の異なる安定同位体試薬を用いラベルする。これらのサンプルを混合し、同時に質量分析することによりリン酸化ペプチドの相対量を比較し、PKC γ ノックアウト小脳で特異的に減少したリン酸化ペプチドを持つPKC γ の生体内基質の候補タンパク質を網羅的に得る。

4. 研究成果

本研究では、上記方法に沿って実験を行い、下記の成果を得た。

(1) PKC γ ノックアウトマウスの作製

既に当研究室において入手済みのPKC γ ノックアウトマウスの凍結胚を、偽妊娠マウスの卵管に移植することによって、マウス個体に復元した。次に、得られたPKC γ ノックアウトマウスの小脳懸濁液のウエスタンブロット解析を行い、PKC γ の発現が消失していることを確認した。

(2) PKC γ ノックアウトマウス小脳のリン酸化プロテオーム解析

7週齢の野生型およびPKC γ ノックアウトマウスそれぞれ2個体(計4個体)の小脳を単離し、ホスファターゼ阻害剤を含むバッファーを用いてタンパク質抽出液を作製した。抽出タンパク質はトリプシンを用いてペプチド消化し、IMAC(固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)によってリン酸化ペプチドの濃縮を行った。得られたリン酸化ペプチドを個体ごとに質量が異なる4種類の安定同位体(iTRAQ)によって標識し、nano-LC タンデム質量分析計によって野生型とPKC γ ノックアウトマウスとの間でペプチドのリン酸化量の相対定量を行った。その結果、3万5千種類を超えるリン酸化ペプチドを同定することができた。これらのデータを解析したところ、野生型と比較してPKC γ ノックアウトマウスにおいてリン酸化量が半分以下に低下したタンパク質を117種類同定し、2倍以上上昇したタンパク質を52種類同定することができた。これらのタンパク質は小脳においてPKC γ によって直接的・間接的にリン酸化を受けている因子であると考えられ、小脳におけるPKC γ の役割を明らかにする上で重要であると考えられる。

(3) リン酸化候補タンパク質の発現解析
プロテオミクスによるリン酸化の変動は、遺伝子発現の変化に起因する場合もあるため、mRNA およびタンパク質の発現解析が必須である。そこで、PKC γ ノックアウトマウスにおいてリン酸化量が大きく低下していた3つのタンパク質 (Protein NDRG4, diacylglycerol kinase zeta, Serine/Threonine kinase Tao1) に注目して、mRNA の発現解析を行った。マウス小脳より total RNA を調製し、oligo-dT プライマーによって逆転写を行った。次に、それぞれの遺伝子についてリアルタイム PCR によって、野生型と PKC γ ノックアウトマウスとの間で mRNA の発現量を比較した。その結果、いずれの遺伝子の発現量に関しても野生型と PKC γ ノックアウトマウスとの間に大きな変化は見られなかった。このことから PKC γ ノックアウトマウスにおけるリン酸化量の低下は遺伝子発現量の変化によるものではないことが明らかとなった。

(4) リン酸化ペプチドに対する抗体の作製
上記3種類のタンパク質についてリン酸化抗体の作製を行った。それぞれのタンパク質に対して、MS/MS によって同定されたアミノ酸残基がリン酸化されたペプチドを合成し、ウサギに接種した。ELISA によって抗体価の上昇したウサギより全採血を行い、抗血清を得た。現在これらの抗血清を用いて、ウェスタンブロットによるリン酸化量の変動解析と、免疫染色によるプルキンエ細胞における局在解析を行っている。

(5) 今後の展望
今後は PKC γ の基質候補タンパク質について網羅的に生理機能解析を行う方針である。具体的には、各基質候補分子に対する shRNA ノックダウンベクターを構築し、*in utero*

electroporation によってプルキンエ細胞に GFP 遺伝子とともに遺伝子導入する。得られたマウスの小脳スライスを作製し、GFP 標識されたプルキンエ細胞における登上線維のシナプス除去を電気生理学的に解析する予定である。次に、リン酸化部位をアラニンに置換した変異体を用いて同様の実験を行い、シナプス除去における基質候補分子のリン酸化の重要性を検証する。この実験と並行して、これらの分子のノックアウトマウスを作製し、運動協調や運動学習といった個体レベルでの機能解析を行う。これらの解析を通して、小脳機能における PKC γ シグナル伝達経路の重要性を明らかにする。

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6件)

- ①Asahara S, Shibutani Y, Teruyama K, Inoue HY, Kawada Y, Etoh H, Matsuda T, Kimura-Koyanagi M, Hashimoto N, Sakahara M, Fujimoto W, Takahashi H, Ueda S, Hosooka T, Satoh T, Inoue H, Matsumoto M, Aiba A, Kasuga M, Kido Y, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin., *Diabetologia*, 2013, 査読有
DOI:10.1007/s00125-013-2849-5
- ②Hirata T, Kumada T, Kawasaki T, Furukawa T, Aiba A, Conquet F, Saga Y, Fukuda A, Guidepost neurons for the lateral olfactory tract: Expression of metabotropic glutamate receptor 1 and innervation by glutamatergic olfactory bulb axons., *Developmental Neurobiology*, 72, 1559-1576, 2012, 査読有
DOI:10.1002/dneu.22030

- ③Kato HK, Kassai H, Watabe AM, Aiba A, Manabe T, Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP₃ receptor and L-type Ca²⁺ channel in mouse CA1 pyramidal cells., *Journal of Physiology*, 590, 3019-3034, 2012, 査読有
DOI:10.1113/jphysiol.2012.232942
- ④Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Iimura T, Kassai H, Harada T, Tsukasaki M, Yamamoto G, Tachikawa T, Nakao K, Yamamoto M, Yamaguchi A, Aiba A, Kamijo R, Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development., *Mechanisms of Development*, 129, 38-50, 2012, 査読有
DOI:10.1016/j.mod.2012.02.002
- ⑤Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich BG, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R, In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling., *Blood*, 119, e45-56, 2012, 査読有
DOI:10.1182/blood-2011-09-381400
- ⑥Yamamoto K, Ueta Y, Wang L, Yamamoto R, Inoue N, Inokuchi K, Aiba A, Yonekura H, Kato N, Suppression of a neocortical potassium channel activity by intracellular amyloid-β and its rescue with Homer1a., *Journal of Neuroscience*, 31, 11100-11109, 2011, 査読有

[学会発表] (計2件)

- ①饗場 篤、中枢神経系において恒常的活性化型 mTOR を発現するマウスの作製と解

析、日本分子生物学会、2012年12月13日、福岡国際会議場 (福岡県)

- ②Aiba A, Genetic dissection of mGluR1 function in cerebellar Purkinje cells, 7th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, 2011年10月3日, Grande Albergo Capotaormina (Italy)

[図書] (計1件)

- 1, 葛西秀俊, 饗場 篤、「mTOR シグナルによる脳機能の調節と破綻」
細胞工学, 学研メディカル秀潤社, 31, 1355-1359, 2012

[その他]

ホームページ等

<http://lar.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

饗場 篤 (AIBA ATSU)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20271116

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：