

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791945

研究課題名(和文)片側内耳破壊ラットの小脳片葉プロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteomic analysis in the rat cerebellar flocculus during vestibular compensation

研究代表者

深澤 雅彦 (fukasawa, masahiko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：70410090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：前庭代償モデルラットのプロテオーム解析を行い、めまいにおける前庭代償のメカニズムの解明を目指した。前庭代償に関するタンパク質としてN-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (Nsf)等10種類のタンパク質を同定した。このうちNSFは、翻訳後修飾が前庭代償急性期に関与している可能性が示唆され、その翻訳後修飾がリン酸化修飾されていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Unilateral labyrinthectomy (UL) in rats is used as a human vertigo model. In this model, spontaneous nystagmus and dysequilibrium caused by UL are ameliorated within 48-72 hours. This amelioration, named vestibular compensation (VC), is long lasting. Although cerebellar flocculi have been reported to be involved in VC, the molecular mechanism behind VC is still unknown. Here, we used 2D-DIGE to depict protein changes in flocculi that contribute to acute (48 hours) and chronic (1 week) stages of VC. As a result, we found that 99 out of 967 protein spots showed significant changes in their intensities. Using MALDI-TOF MS, we successfully identified 10 proteins, such as N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (Nsf). Among these, a possibility that posttranslational modification was participating in the acute stage of VC was suggested, and NSF was able to consider that phosphorylation of the posttranslational modification was carried out.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：前庭代償 プロテオミクス Nsf 翻訳後修飾 ニトロシル化修飾 リン酸化修飾

## 1. 研究開始当初の背景

臨床の場において、難治性めまい患者は我々医療関係者を悩ますことが多い。また高齢化社会になるにしたがい、病院受診する患者の転倒に伴う合併症の報告も多くされるようになってきている。加齢に伴う筋力低下もさることながら、めまいの本体である前庭機能障害によるふらつきは、患者のADLを著しく低下させる問題のひとつであり、その前庭機能障害を残さないためには、前庭代償機構が重要な役割を担っている。多くの難治性めまい患者は、その前庭代償機構が速やかに機能しておらず、そのため症状が遷延化していると考えられている。

また研究の場においては、ヒトめまいのモデル動物として片側内耳破壊術 (unilateral labyrinthectomy: UL) 施行ラットが使用されている(1)。UL 施行により前庭神経核の活動性に左右差が生じ、その結果、前庭 - 動眼反射を介する眼振と前庭 - 脊髄反射を介する平衡障害が出現する。これらの症状は時間の経過とともに自然寛解する。この過程を前庭代償と呼ぶ。前庭代償には、前庭神経核を中心とした、小脳及び脊髄を含む中枢前庭系における神経ネットワークの再構築が関与していると考えられている。そのなかで、小脳片葉も重要な働きをしている(1, 2, 3, 4)と推定されるが、その詳細は未だ解明されていない。近年、c-fos等のmRNAレベルでの発現が報告されている(1, 2)が、あくまでも遺伝子の発現しか見ていない。神経伝達物質は核より産生され、シナプス前終末を経て放出されるため、遺伝子の発現のみを確認するだけではその部位で放出されるタンパク質は検出できない。しかし、プロテオミクスを用いると当該部位でのタンパク質の相互作用を系統的かつ網羅的に解析することが可能である。

また、下記の研究業績にあるように耳鼻咽喉科領域におけるプロテオミクスを率先して行った実績があり他研究者よりも優位な状況にある。さらに二次元電気泳動装置、質量解析器計、解析ソフトなど充実した機材が用意されている点も他研究施設と比べて極めて有利な環境にある。

## 2. 研究の目的

上記より、前庭代償過程における小脳片葉タンパク質の変化をプロテオミクスの手法を用いて網羅的に解析し、めまいの治療標的となりうるタンパク質の探索を目的とした。また、現段階では前庭代償の機序は未だ確立されておらず、その解明は急務であると考えている。

期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか：

プロテオミクスを用いた片側内耳破壊後の前庭代償における小脳片葉に発現を認めるタンパク質の解析を行い、一連の脳内物質の変化を解明し、めまいに対する病因論的意義をもつ脳内物質を同定することを目的と設定した。

本研究計画の学術的な特色、独創的な点及び予想される結果と意義：

学術的な特色：

めまいはストレス社会、高齢化社会において代表的な疾患の一つである。その発現タンパク質の解析による前庭代償の機序の解明は当該分野の最重要課題の一つである。

独創的な点：

我々は、今まで技術的な問題から進んでいなかった前庭代償過程の小脳片葉におけるタンパク質の変化を網羅的に解析することにより、めまいの治療標的となりうるタンパク質を探索することを目的としている。前庭代償に關与するタンパク質の同定を、昨今急激に進歩したプロテオミクス関連技術を用いてこれに挑む。本研究計画における独創的着想はプロテオミクスを用いて網羅的に検出する点であり、いままでの当該分野においては、候補蛋白を設定し個別に検索していく方法と比べ、スクリーニングできる規模と速度が格段に優れている。

予想される結果と意義：

前庭代償における未知の脳内物質、およびメカニズムが明らかとされる可能性がある。また、本研究によって得られるデータは、めまい回復期における現行の対症的治療を凌駕することができる根本的治療法の開発につながる可能性もあり、患者へのメリットが十分にある医学研究で、難治性めまいの治療法にもつながると考えている。

国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ：

国内外において片側内耳破壊ラットの脳片葉に対するプロテオミクスを手がけている研究は乏しい限り無く、また前述の通りタンパク質解析の実績がある。今これを推進することで、国際的に高水準の研究を日本から発信することができる。

参考文献

(1) Cirelli C, Pompeiano M, D'Ascanio P, Arrighi P, Pompeiano O. c-fos Expression in the rat brain after unilateral labyrinthectomy and its relation to the uncompensated and compensated stages.

Neuroscience. 1996 Jan;70(2):515-46.

(2) Kitahara T, Takeda N, Saika T, Kubo T, Kiyama H. Role of the flocculus in the development of vestibular compensation: immunohistochemical studies with retrograde tracing and flocculectomy using Fos expression as a marker in the rat brainstem. Neuroscience. 1997 Jan;76(2):571-80.

(3) Johnston AR, Seckl JR, Dutia MB. Role of the flocculus in mediating vestibular nucleus neuron plasticity during vestibular compensation in the rat. J Physiol. 2002 Dec 15;545(Pt 3):903-11.

(4) Horii A, Smith PF, Darlington CL. Quantitative changes in gene expression of glutamate receptor subunits/subtypes in the vestibular nucleus, inferior olive and flocculus before and following unilateral labyrinthectomy in the rat: real-time quantitative PCR method. Exp Brain Res. 2001 Jul;139(2):188-200. 前庭代償過程における小脳片葉タンパク質の変化をプロテオミクス的手法を用いて網羅的に解析し、めまいの治療標的となりうるタンパク質の探索を目的とした。めまいモデルラットにおける小脳片葉タンパク質を、プロテオーム解析を用いて網羅的に検出し、めまいの病態に関与するタンパク質を同定することを目的とした。また、現段階では前庭代償の機序は未だ確立されておらず、その解明は急務であると考えている。

### 3. 研究の方法

Sprague Dawley ラットに片側内耳破壊 (unilateral labyrinthectomy: UL) を施行し、前庭代償モデルを作成し、小脳片葉を摘出する。小脳より抽出したタンパク質を抽出し 2 次元電気泳動にて分離、タンパク質スポットを解析し、これらの変動するタンパク質スポットについて MALDI-TOFMS を用いて同定を行う。

#### 【発現タンパク質の解析】

同定されたタンパク質の発現を免疫染色にて確認、発現部位の同定を行いさらなる解析を行う。

ラットの内耳を破壊する (前庭代償モデル) の前庭代償急性期 (48 時間後) と慢性期 (1 週間後) に小脳片葉 (破壊側、対側) を摘出し、タンパク質を抽出。抽出したタンパク質を IPGstrip に膨潤し、等電点電気泳動を行い、SDS-PAGE にて二次元目電気泳動を行い、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム (2D DIGE) を用いスポットの発現を確認。コントロールと比較しタンパク質発現量のことなるスポットをゲルより切り出し、MALDI-TOF mass spectrometer にて質量分析を行う。質量分析器によって得ら

れたデータを解析ソフト Mascot (Matrix Science Ltd.) を用い NCBI protein データベースより検索しタンパク質の同定を行う。

平成 19 年よりすでに研究チームを立ち上げ、実験を施行し、前庭代償に関するタンパク質として N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (Nsf) 等 10 種類のタンパク質を同定した。また NSF はその翻訳後修飾が前庭代償急性期に関与している可能性が示唆された。NSF はゴルジ体層板間の小胞輸送において小胞の膜融合に関与する因子 (5) であり大変興味深い結果であると考えている。その途中経過を H21 年 9 月に国際学会 (WHUPO) にて報告しており、またその結果について Journal of Vestibular Research 2009;19:83-94 で論文として掲載した。同定されたタンパク質に対し個々に機能解析をおこなった。

### 4. 研究成果

前庭代償モデルラットの前庭代償急性期 (48 時間後) と慢性期 (1 週間後) に小脳片葉 (破壊側、対側) を摘出、タンパク質を抽出。蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム (2D DIGE) を用いスポットの発現を確認。コントロールと比較し、MALDI-TOF mass spectrometer (MS) にて質量分析を行った。得られたデータを解析しタンパク質の同定を行った。UL 施行ラットの小脳片葉のタンパク質を 2D-DIGE で分離することにより、967 個のスポットが得られた。それらを sham 手術群と比較し、有意な変化を示した 99 個のスポットのうち、12 スポットから前庭代償に関与するタンパク質として N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (Nsf) 等 10 種類のタンパク質を同定した。このうち NSF は、同じ分子量で等電点の異なる 4 つのスポットからそのタンパク名が同定され、そのうちの 1 箇所で差異を認めため、NSF の翻訳後修飾が前庭代償急性期に関与している可能性が示唆された。NSF はゴルジ体層板間の小胞輸送において小胞の膜融合に関与する因子である。

まず Nsf の翻訳後修飾の解析を、ETD (Electron Transfer Dissociation)-Ion Trap MS を用いた LC-MS/MS により、解明しようと試みたが、翻訳後修飾の同定にまでは至らなかった。次に、全スポット中の NSF を、NSF 抗体を用いて 2 次元電気泳動ゲルでの、Western-Blotting 法 (WB) により明らかにしたところ、MS で同定された箇所以外には NSF は検出されなかった。

NSF の翻訳後修飾として報告があるものとして、リン酸化、ニトロシル化があることから、まずラット小脳片葉における NSF およびニトロシル化タンパク質の検出を、N-ニトロシル化抗体を用い WB にて同定を試みた。ラット小脳片葉タンパク質を 1 次元電気泳動法、2

次元電気泳動法を用い、SYPRO Ruby 染色し、N-ニトロシル化抗体を用いて WB を行った。結果は、1 次元電気泳動、2 次元電気泳動ともに NSF がニトロシル化修飾していることは証明されなかった。N-ニトロシル化抗体はシステイン残基への認識抗体なので、システイン CyDye は使用できなかったため、SYPRO Ruby 染色を用いたが、NSF のスポット位置が確定できなかった。SYPRO で NSF が染まりにくい可能性はあったが、ニトロシル化はないものと考え、一度ペンディングとし、リン酸化修飾について検討した。タンパク質はリン酸化によりマイナスチャージされるため、スポットが酸性側にシフトし、逆に脱リン酸化によりアルカリ性側にシフトする。このシフトの幅はタンパク質の種類などによりばらつきがあるが、一般に pH 0.05 ~pH 1.0 というレンジでシフトすると考えられている。Pro-Q Diamond 染色はセリン、スレオニン、チロシンのすべてのタイプのリン酸化を高感度で検出できる蛍光色素であり、電気泳動後のゲルを直接染色することによって、リン酸化タンパク質の全体像を簡単にプロファイリングできる。これを用いてリン酸化タンパク質の検出を試みたが NSF は染まらなかった。NSF のリン酸化修飾は Pro-Q ゲル染色では検出できなかった。Pro-Q の検出感度以下であることも考え、アルカリフォスファターゼ処理を行い、リン酸基を外すことで脱リン酸化し、何らかの差が生じるか実験した。脱リン酸化処理をした 2 次元電気泳動ゲルとしないものを、それぞれ NSF 抗体を用いた WB でその発現部位の違いを確認した。脱リン酸化すると NSF タンパクに等電点の移動が見られたことから、NSF はリン酸化修飾されていることが考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)  
〔学会発表〕(計 0 件)  
〔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〕

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

深澤 雅彦 (Fukasawa, Masahiko)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70410090

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：