

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860057

研究課題名(和文)細胞内シグナルを標的とした定量プロテオミクスによる統合失調症の発症機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenic mechanism of schizophrenia focused on intracellular signaling by quantitative proteomics

研究代表者

平山 未央(Hirayama, Mio)

熊本大学・その他の研究科・助教

研究者番号：90706483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高精度な質量分析技術を用いて統合失調症患者脳で発現変動しているタンパク質群を同定した。質量分析データを用いた発現量ネットワーク解析により、患者脳ではGNA13、ERKを中心としたGNA13-ERK-eIF4G2シグナルの発現低下が明らかとなった。発現量を元に分子間相関関係を解析した結果、シグナル上流と下流におけるタンパク質発現量の相関が明らかとなった。統合失調症患者脳では、ERK1を中心としたシグナルの低下が病態と関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified differentially expressed proteins in the brains of schizophrenia patients by high-precision quantitative mass spectrometric analysis. A network analysis based on protein-expression data identified a decrease in "GNA13-ERK-eIF4G2" signaling. A co-expression analysis using the protein expression levels determined by targeted proteomics was performed, whereby the signaling proteins significantly correlated between upstream and downstream proteins. These results suggest a correlation between attenuation of the molecular network involving ERK1 in the prefrontal cortex of schizophrenia patients and schizophrenia pathology.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス ネットワーク解析 統合失調症

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は若年期に発症し、100人に1人という高い罹患率を持つ精神疾患である。症状は幻聴や妄想などの陽性症状と認識障害やうつ状態などの陰性症状である。統合失調症では遺伝的要因とストレス等の環境要因が発症に関与するが、患者脳では物事を正常に把握し認識するための神経系ネットワークの形成不全の関与が示唆されている (Rapoport JL, et al. Mol Psychiatry. 2005;10:434-449)。

統合失調症において変化する神経系ネットワークは近年研究が進んでおり、統合失調症患者における染色体転座点に存在する分子である DISC-1 は、神経突起の伸長への関与や GSK3B シグナルを介した神経前駆細胞の増殖を調節すると報告されている。また患者の前頭葉ではドーパミン D1 シグナルの低下や NMDA 受容体の減弱により神経系細胞の分化に重要な neuregulin1-ErbB4 シグナルが抑制されているとの報告もある。

しかし統合失調症患者脳で変動しているタンパク質の全容はいまだ解明されておらず、複雑な脳の機能を解明するには、1分子の機能だけではなくタンパク質変動を全体的なネットワークとして捉えて評価する必要性が生じている。従来研究で行われてきた統合失調症を対象としたプロテオーム解析は、同定した分子間のつながりから病態を考察しておらず、また病態における候補分子の機能評価も不十分であった。また、本課題で解析した前頭葉は、人の思考や感情を司る部位であり、患者では血流量の減少などの脳内活動の低下が観察されている。統合失調症患者の病態と関連性がある脳の部位におけるタンパク質発現量を網羅的に解析し、分子ネットワークとしてとらえることで統合失調症治療への新たな知見が得られることが考えられた。そこで本研究では、統合失調症脳で特異的に発現変動しているタンパク質プロファイルを明らかにし、複数のタンパク質群の動きから病態を評価することで発症機序解明や治療標的の探索を目指した。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、統合失調症患者の前頭葉で特異的に変動する分子群を独自の質量分析技術による定量解析とネットワーク解析により同定し、機能を検討する事である。

3. 研究の方法

(1) 定量解析のための内部標準ペプチドの作成・最適化

1) 大腸菌を用いた内部標準ペプチドの作製
先行研究の結果抽出したタンパク質のうち、アミノ酸配列の中で特にタンパク質固有でイオン化しやすい配列を選定し、直列に連結した 70 個の標的タンパク質のペプチドをカバーした配列を作製し、この配列の N 末端に精製用の Strept-tag、C 末端に HAT-tag を融

合させた人工遺伝子を合成した。pET17b ベクターに人工遺伝子を組み込み、大腸菌 (BL21 株) によるタンパク質の発現を行った。発現後は大腸菌を可溶化後、全長を Strept、HAT タグにより精製し、MS 解析に使用した。安定同位体標識は、大腸菌の培養に CHL 培地を用いて 15N 標識のタンパク質を得た。上記の方法で得たタンパク質をトリプシン消化することによって標的ペプチド断片を得たのち、脱塩を行い、MS 解析に使用した。

2) 合成内部標準ペプチドの調整

網羅的発現差異解析の結果、変動していたペプチドに対し、新たに内部標準ペプチドを購入し、解析を行った。(AQUA screen peptide, Sigma-aldrich) ペプチドは 0.1% TFA/50%ACN に溶解し、すべてのペプチドを混合しミクスチャーの調整を行った。

3) ペプチド解析条件の最適化

調整したペプチドを高精度定量解析法である MRM (Multiple Reaction Monitoring) 解析に使用するために transition の最適化を行った。定量ソフトである Skyline にペプチド配列をインポートし、予測される transition をエクスポート後 TripleTOF 5600 (SCIEX) で MRM-HR 解析を行った。解析の結果 Intensity が高い transition から上位 5 つを選択し、最適化を行った。

(2) 質量分析のためのサンプル調整

脳検体は、統合失調症患者、健常者のそれぞれ 10 検体を用いた。統合失調症患者脳は福島県ブレインバンクから、また健常者の死後脳は福祉村病院長寿医学研究所から共同研究先の福島県立医科大学を通じて提供を受けた。また本研究は、検体の提供元の福島県立医科大学及び浜松医科大学と熊本大学の倫理規則に則り、各施設倫理委員会によって承認を受けた実験計画のもと実施した。

統合失調症患者、健常者の脳の前頭葉はホモジナイズ後に細胞膜画分と細胞質画分に画し、トリプシン消化を行った。トリプシン消化ペプチドは脱塩処理後、すべてのサンプルに等量の内部標準ペプチドを添加し、MS 解析を行った。

(3) 網羅的発現差異解析

統合失調症患者と健常者の前頭葉で発現変動しているタンパク質を検出するために、発現差異解析を行った。サンプルはすべての MS/MS スペクトルの取得が可能である SWATH 解析を Triple TOF5600 を用いて行い、LC-MS 解析を行った。得られたデータは Protein Pilot ソフトウェアでタンパク質の同定を行い、Peak View ソフトウェアでピークエリア比較解析を行った。

(4) 内部標準を用いた高精度定量比較解析 (MRM 解析)

網羅的発現差異解析の結果、発現に差異があったペプチドに対し、内部標準ペプチドを用いてMRM解析を行うことでより高精度に定量解析を行った。サンプルは網羅的発現解析を行った時と同じものを用い、脱塩後のペプチドに等量の内部標準を添加し、QT6500 (SCIEX)を用いてMRM解析を行った。データ解析は、MultiQuant3(SCIEX)を用いて行い、得られたMRMスペクトルは内部標準のピークエリアとサンプル中のピークエリア比較することで定量化した。得られた定量データはGraph Pad Prismを用いて統計解析を行った。

(5) ネットワーク解析

高精度定量解析の結果有意に発現変動したタンパク質の定量データを分子ネットワーク解析ソフトであるKeymolnetにインポートし、分子間相互作用解析を行った。

(6) 分子間相互作用解析

ネットワーク解析の結果、抽出したシグナルに対し、各検体の発現量をそれぞれのシグナル分子に対応させ、シグナルの方向性を検討した。方法としては、上流分子の発現量が下流分子に影響を与えているかどうかを調べるために、上流で変化した検体の下流分子における発現量をT検定で検討し、また上流と下流の分子の発現量の相関係数を求めることで検討を行った。

(7) SHSY5Y細胞を用いたモデル細胞の作製
神経系モデル細胞であるSHSY5Y細胞を用いてシグナルを検討するために、RNAi法による標的分子のノックダウンを試みた。siRNAはリポフェクション法で導入し、導入後24時間で10 μMレチノイン酸処理を行い、細胞を神経系細胞様へと分化誘導を行った。RA処理後48時間で細胞を回収し、ウエスタンブロットと質量分析でノックダウンの確認と下流分子への影響を行った。

4. 研究成果

(1) 網羅的発現差異解析結果

統合失調症患者脳で特異的に発現変動しているタンパク質を抽出するために、統合失調症患者前頭葉と健常者前頭葉の検体をトリプシン消化したペプチドを用いてLC-MS解析を行った。解析の結果得られたピークエリアを健常者と比較した結果、統合失調症患者では有意に82タンパク質が発現増加(>1.2倍)、83タンパク質が発現減少(<0.83倍)していることがわかった(T-test, p<0.05)。この網羅的解析で用いたタンパク質同定方法は、shotgun解析と呼ばれる方法で、定性には優れているが定量性が低い。したがって網羅的解析の結果、有意に変動していたタンパク質の中で、質量分析に適している配列を選択し、高精度な定量解析を行うことでより定量性の向上を試みた。

(2) 高精度定量解析(MRM解析)

候補タンパク質群の定量解析を行うために、タンパク質の一部が安定同位体標識された内部標準ペプチドを作成/購入し、解析に用いた。網羅的発現差異解析に用いたものと同じペプチド断片を用い、脱塩後のサンプルに等量の内部標準ペプチドを加え、定量解析(MRM法)を行った。MRM法は標的のペプチドの質量のみをスキャンし、フラグメントを検出するため、定量性が高いことが特徴である。定量解析の結果、細胞質画分においては5個のタンパク質が発現増加し、19個のタンパク質が減少していることがわかった。一方細胞膜画分では、10個のタンパク質が増加し、14個のタンパク質が有意に減少していることがわかった。図1には、各画分で発現変動したタンパク質の上位2つを示してある。アルコール脱水素酵素の一つであるALDH2は細胞膜画分と細胞質画分において統合失調症で発現増加した分子として検出された。MAP2K2はリン酸化酵素の一種で患者脳において減少していることがわかった。これらの発現変動した分子群に関して、分子機能に関連した特徴づけを行うために、Gene ontology解析とネットワーク解析を行った。

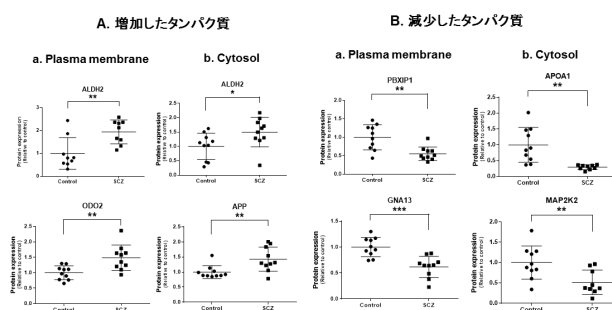


図1 発現変動したタンパク質

(3) Gene ontology(GO)解析

内部標準を用いた高精度定量解析の結果より発現変動したタンパク質群(>1.2, <0.83)の発現量の比(患者/健常者)をネットワーク解析ソフトであるkeymolnetにインポートし、pathway-based Gene ontology解析を行った。その結果、増加したタンパク質群では、細胞質画分では代謝に関連する経路が、細胞膜画分ではRhoやRabファミリータンパク質などの細胞運動に関与する経路が抽出された。一方減少したタンパク質群では、細胞質画分、細胞膜画分ともにセロトニンシグナル経路が有意に抽出された。したがって、神経系細胞の分化や維持に必要な経路に属しているタンパク質が統合失調症では減少していることが示唆された。

(3) ネットワーク解析

内部標準を用いた高精度定量解析の結果より発現変動したタンパク質群(>1.2, <0.83)の発現量の比(患者/健常者)をkeymolnetにインポートし、各分子間に存在するrelationを抽出するために、相互作用解析を

行った。その結果、Src をハブにした GNA13, ERK, PBXIP1, eIF4G2 を含む統合失調症で減少するネットワークを抽出することができた(図 2)。

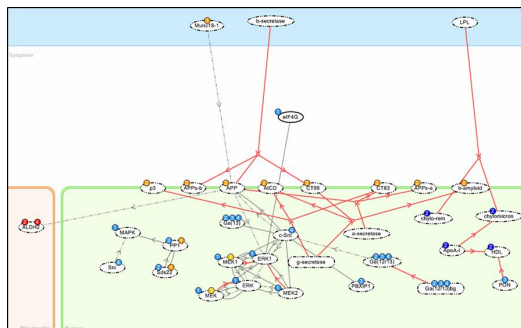


図 2 抽出されたネットワーク図

(4) 分子間相互作用解析

図 2 より、Src と関連がある分子として GNA13, PBXIP1, APP が挙げられたが、実際どの分子と相互作用があるのか、また直前のシグナルの影響を受けているのかを調べるために、上流分子の発現量が全検体数 (N=20) のうち、上位または下位 5 つを選択し、その検体での発現量が下流分子の発現量へ影響を及ぼしているかどうかを pearson の相関係数と unpaired T-Test を行うことで検討した。

その結果、GNA13 の発現量を High/Low で選択した検体において下流の Src の発現量と相関性がある ($R=0.789$, $p=0.012$) ことがわかった。Src と関係があると抽出された PBXIP1 と APP に関しては相関係数、unpaired T-Test と共に有意な結果が得られなかったため、PBXIP と APP に関しては Src の発現に影響を与えていないことが示唆された。

抽出されたネットワーク分子の中で、Src から MEK2, MEK1/2 から ERK1, ERK1 から eIF4G2 に関してはいずれも有意に 0.69 以上の高い相関性を持ち、さらに unpaired T-Test の結果も有意に差があることから、上流分子の発現量の変動が下流分子の発現に影響を与えていることがわかった。さらに keymolnet を用いて抽出したシグナルの下流 eIF4G2 の下流分子の検索を行った結果、eIF4G2 の直下の下流では該当分子は存在しなかったが、eIF4G2 と複合体を形成する eIF4E の下流で網羅的発現変動解析結果より統合失調症で発現減少していた CYFIP1 が存在することがわかった。CYFIP1 は統合失調症で 0.7 倍減少しており、抽出したシグナル分子へ関与する可能性が考えられた。

(5) プロテオーム解析考察

本研究では、統合失調症患者死後の前頭葉を健常と定量的に比較することで統合失調症において有意に変動していたタンパク質を同定することができた。さらに、定量的な発現量を基にしたネットワーク解析結果より患者で低下する新たなネットワークを見出すことができた。

発現減少した分子の一つである ERK1 は細胞の増殖や分化に必須のシグナル分子であり、統合失調症を含む精神疾患で発現の低下が報告されている。クロザピンは ERK1 の誘導を介して効果を発揮していることや ERK1 の活性は EGF レセプターの活性化に影響することから、統合失調症前頭葉での発現低下が疾患に関与することが示唆された。

疾患で発現増加した分子の一つである APP はアルツハイマー病の関連因子であるが、軸索中の APP 蓄積と軸索障害の関連が報告されている。したがって統合失調症脳では、APP 発現増加による軸索障害の可能性が考えられた。

GNA13 は G タンパク質ファミリーの一員であり、細胞の運動や分化に影響を与える Rho と協調してケモカインによる応答、血管新生に関与しているとの報告がある。神経系の細胞に対する影響では、軸索伸長に影響を与える報告もある。ネットワークの最下流である eIF4G2 は翻訳開始因子であり eIF4 family と複合体を形成し、翻訳を開始する。他の eIF4 family のうち eIF4G と eIF4E の発現量低下は神経細胞の軸索伸長を抑制するとの報告から、eIF4G2 の発現変動は神経細胞の軸索形成や前頭葉の機能障害に影響があることが示唆された。

従って G タンパク質である GNA13 の発現低下が ERK シグナルの低下を引き起こし、軸索形成に関与する分子である eIF4G2 の低下を引き起こすことで神経細胞同士のシナプスやスパイン形成不全を引き起こし、神経細胞ネットワークに影響することで認知症状に代表されるような統合失調症の病態を引き起こしている可能性が示唆された。

本研究によって統合失調症患者脳で抽出されたシグナル分子の発現低下がネットワーク自体の減弱化に関与しシナプス形成不全や可塑性に影響を及ぼすことで、認知障害などの統合失調症の症状に関与している可能性が考えられた。

(6) ノックダウン細胞の作製

プロテオーム解析によって抽出されたシグナルネットワークが細胞内でも機能しているかどうかを調べるために、神経系モデル細胞である SHSY5Y 細胞を用いて評価を試みた。本実験では、GNA13 タンパク質を RNAi 法で発現抑制を行い、下流の分子の発現量を検討するためのノックダウン細胞を作成した。ウエスタンブロット法で評価した結果、siRNA 処理細胞で GNA13 細胞の発現減少が確認された。

(7) ノックダウン細胞の質量分析結果

SHSY5Y 細胞に siRNA を導入した細胞に RA 処理を行い、分化過程における GNA13 発現抑制によるタンパク質発現変動を MRM 法で解析した。その結果、ERK1 などの下流分子はコントロール細胞と比較して有意な差はなかった。この原因としては解析に用いた細胞の GNA13

ノックダウン効率が 20%程度だったため、発現変動を与えるまでの影響がなかったこと、RA 刺激により分化が誘導される中での ERK 経路の減弱が見えにくくなってしまった可能性が考えられる。今後の対応としては、先に RA 処理を行い分化させた状態でのノックダウンが必要であると考えられる。

(8)結論

本研究では、統合失調症患者と健常者の死後脳のタンパク質発現量を比較することにより、疾患で発現増加・減少する分子群と減弱するネットワークを検出した。今後は抽出したネットワーク分子を詳しく解析することで創薬への応用や統合失調症発症のメカニズム解明へとつながることが期待される。

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 1 件)

Ohtsuki S, Hirayama M, Ito S, Uchida Y, Tachikawa M, Terasaki T. Quantitative targeted proteomics for understanding the blood-brain barrier: towards pharmacoproteomics. Expert Rev Proteomics. 2014 Jun; 11(3):303-13

[学会発表](計 3 件)

1. 平山 未央 SWATH acquisition を用いた網羅的定量プロテオーム解析の実際 JHUP0 第 13 回大会 (2015 年 8/23-24, 熊本)
2. 平山 未央、國井 泰人、松本 純弥、和田 明、日野 瑞城、矢部 博興、丹羽 真一、近藤 豪、瀬藤 光利、大槻 純男 定量プロテオミクスを用いた統合失調症患者脳で発現変動する細胞内ネットワークの同定 第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2015 年 11/19-20, 熊本)
3. 平山 未央、國井 泰人、松本 純弥、和田 明、日野 瑞城、矢部 博興、丹羽 真一、近藤 豪、瀬藤 光利、大槻 純男 統合失調症患者の前頭葉におけるタンパク質プロファイリングと変動する分子ネットワークの同定 BMB2015 (2015 年 12/1-4, 神戸)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.ohtsuki-lab.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 未央 (MIO HIRAYAMA)
熊本大学・生命科学研究部(薬学系)
助教

研究者番号：
90706483

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし