

令和元年6月26日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26460388

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼSCRAPPERが調節するシナプス蛋白質の超解像イメージング

研究課題名(英文) Super-resolution imaging of synaptic proteins regulated with ubiquitin ligase SCRAPPER

研究代表者

矢尾 育子 (Yao, Ikuko)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・准教授

研究者番号：60399681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン化の異常は多くの神経変性疾患で見られ、神経伝達物質放出異常もまた多くの神経疾患に關与する。申請者らが同定したユビキチンリガーゼSCRAPPERを介した、蛋白質分解による細胞・個体機能制御を統合的に理解することを試みた。Scrapperノックアウトマウスの脳を用いて、変動している蛋白質の量を検証した結果、ノックアウトマウス脳では大きな変動が起こっていることが明らかとなった。また、複数の神経伝達物質が脳の領域ごとに変化していることが明らかとなった。これらの結果はSCRAPPERの神経組織における役割、すなわち神経伝達物質の放出制御、神経可塑性、恐怖・不安様行動と關連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はユビキチンプロテアソーム系による神経シナプス脱構築および神経伝達制御の分子機構解明を目指すものである。SCRAPPER依存的なユビキチンプロテアソーム系分解が調節するシナプス關連分子の挙動を明らかにすることは、シナプス伝達の場におけるユビキチン化の時空間的な詳細の解明につながり、ひいては神経難病の医化学的病態理解が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Dysfunction of the ubiquitination occurs in many neurodegenerative diseases, and neurotransmitter release abnormalities are also involved in many neurological diseases. We tried to understand integratively the regulation of cell and individual function by protein degradation through ubiquitin ligase SCRAPPER which we previously identified. In this study, we found that the amounts of some kinds of proteins were significantly altered in the knockout mouse brain. Moreover, it has become clear that behaviors of several neurotransmitters have changed in the multiple areas of the knockout mouse brain. These alterations may have deep relationship with the roles of SCRAPPER in neural tissue such as neurotransmitter release control, neural plasticity, and fear / anxiety-like behavior.

研究分野：神経科学、生化学、イメージング

キーワード：シナプス 蛋白質 神経可塑性 ユビキチン SCRAPPER 質量分析 イメージング 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチンプロテアソーム系による選択的蛋白質分解は様々な細胞機能の制御に重要であり、神経系の制御においてもその重要性が近年明らかとなりつつある。ユビキチン化の異常は多くの神経変性疾患で見られ、神経伝達物質放出異常もまた多くの神経疾患に関与する。研究開始当初、プロテアソームでの分解はシナプス終末で起こると想定していたが、蛋白質分解が引き起こされる場所とそのタイミングは明らかにすべき問題として残されている。細胞内の情報がどのように統合されるのか、シナプスにおける分子の挙動を詳細に解析する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

申請者らがこれまでに解明してきた神経シナプス安定化の分子機構(Yao ら JBC 1999, JNS 2002)、ユビキチンプロテアソーム系による神経シナプス脱構築の分子機構(Yao ら Cell 2007)を背景に、ユビキチンリガーゼ SCRAPPER に着目し解析を行う。*Scrapper* 欠損マウスは体が小さい上に寿命が短く(Yao ら, Cell 2007)、LTP/LTD 成立の異常(Takagi ら, Neural Plasticity 2012) 恐怖記憶形成の異常(Yao ら, Plos One 2011)、脳のスポンジ状変性や神経細胞の萎縮(Yao ら, Proteomics 2008)といった異常が見られる。ユビキチンプロテアソーム系による神経シナプス脱構築および神経伝達制御の分子機構解明を目指し SCRAPPER 依存的なユビキチンプロテアソーム系分解が調節するシナプス関連分子の挙動を明らかにする。シナプス伝達の場におけるユビキチン化の時空間的な詳細を明らかにすることは神経難病の医化学的病態理解に役立つと期待される。

3. 研究の方法

ユビキチンリガーゼ SCRAPPER および SCRAPPER 依存的蛋白質分解により調節される標的分子、相互作用分子の免疫染色に用いる抗体の評価、超解像顕微鏡による可視化条件を検討した。同時に GFP 融合蛋白を用いたシナプス蛋白質の分子動態を観察した。生化学的手法も併用し SCRAPPER 依存的蛋白質分解により調節される分子のモデル化・可視化・検証を行った。さらに、*Scrapper* 遺伝子ノックアウトマウス脳における低分子の変動を検出するために、質量顕微鏡法による観察を行った。ユビキチンリガーゼ SCRAPPER を介したユビキチン化およびユビキチンプロテアソーム系分解により制御されるシナプス分子の動態から、分解による細胞・個体機能制御を統合的に理解することを試みる。

4. 研究成果

1) 超解像顕微鏡による解析

ユビキチンリガーゼ SCRAPPER および SCRAPPER 依存的蛋白質分解により調節される標的分子、相互作用分子の免疫染色に用いる抗体の評価、超解像顕微鏡によるシナプス蛋白質の可視化条件を検討した。超解像顕微鏡は構造化照明顕微鏡法を採用した SIM 顕微鏡と、ローカライゼーション法を採用した STORM 顕微鏡を用いた。STORM 顕微鏡は従来の光学顕微鏡の約 10 倍、約 20nm の超高分解能で分子レベルの理解が可能である。正確な位置情報検出のためには、間接的に蛍光標識された分子から効率よくシグナルを取り出す必要がある。これまで用いた方法では STORM の多重染色像では波長の重なりがあることが判明したため、新たな蛍光二次抗体を検討し、シグナルが分離できることを確認した。今後さらに条件を最適化し分子分布データを取得する。

2) *Scrapper* ノックアウトマウス脳における発現変化解析

Scrapper ノックアウトマウスの脳を用いて、変動している標的蛋白質の量を検証した。抗体アレイおよび定量プロテオーム解析によりノックアウトマウスと野生型マウス脳における発現蛋白質を同定し、発現量を比較することにより変動している蛋白質を見出した。これまでに特定した標的分子の変化が再現するとともに、他の分子においても *Scrapper* ノックアウトマウス脳では大きな量的変動が起こっていることが明らかとなった。

3) 質量分析イメージングによる解析

質量分析イメージングにより *Scrapper* ノックアウトマウス脳における低分子物質の局在変化を観察した結果、複数の神経伝達物質が脳の領域ごとに変化していることが明らかとなった。この結果はこれまで我々が明らかにしてきた SCRAPPER の神経組織における役割、すなわち神経伝達物質の放出制御、神経可塑性、恐怖および不安様行動との関連が示唆された。得られた結果から、ユビキチンリガーゼ SCRAPPER を介した脳機能制御を理解することを試み、研究結果と考察をまとめ、学術論文として投稿した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件、すべて査読有)

Saito Y, Eto F, Take S, Yao I, Setou M.

Imaging mass spectrometry reveals sodium lauryl sulfate-induced changes in skin lipoquality, principally affecting sphingomyelin. *Medical Mass Spectrometry*. in press
doi: 10.24508/mms.2019.06.004

Aizawa F, Sato S, Yamazaki F, Yao I, Yamashita T, Nakamoto K, Kasuya F, Setou M, Tokuyama S.

N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity. *Brain Res*. in press
doi: 10.1016/j.brainres.2019.03.001.

Mihara Y, Horikawa M, Sato S, Eto F, Hanada M, Banno T, Arima H, Ushirozako H, Yamada T, Xu D, Okamoto A, Yamazaki F, Takei S, Omura T, Yao I, Matsuyama Y, Setou M.

Lysophosphatidic acid precursor levels decrease and an arachidonic acid-containing phosphatidylcholine level increases in the dorsal root ganglion of mice after peripheral nerve injury. *Neurosci Lett*. (2019) 698:69-75

doi: 10.1016/j.neulet.2018.12.035.

Sugiyama E, Yao I, Setou M.

Visualization of local phosphatidylcholine synthesis within hippocampal neurons using a compartmentalized culture system and imaging mass spectrometry.

Biochem Biophys Res Commun. (2018) 495(1):1048-1054

doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.108.

Miyagi M, Fukano H, Atsumi R, Suzuki H, Setou M, Yao I.

Distinct spatial localization of three types of phosphatidyl choline in rat buccal mucosa identified by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry *Medical Mass Spectrometry* (2017) 1:2-9.

doi: 10.24508/mms.2017.06.002

Koga K, Yao I, Setou M, Zhuo M. (co-first author)

SCRAPPER Selectively Contributes to Spontaneous Release and Presynaptic Long-Term Potentiation in the Anterior Cingulate Cortex.

J Neurosci. (2017) 37(14):3887-3895.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0023-16.2017.

Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H.

Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry.

J Neurochem. (2017) 140(3):435-450.

doi: 10.1111/jnc.13897.

Taniguchi H, Katano T, Nishida K, Yao I, Morimoto Y, Matsuda T, Ito S.

Expression of hOvol2 in the XY body of human spermatocytes.

Andrologia. (2017) 49(1).

doi: 10.1111/and.12599.

Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata H, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S.

Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury.

eNeuro (2016) (5). pii: ENEURO.0110-16.2016. eCollection 2016 Sep-Oct.

Konno A, Ikegami K, Konishi Y, Yang HJ, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Yao I, Shiba K, Inaba K, Setou M.

Ttll9^{-/-} mice sperm flagella show shortening of doublet 7, reduction of doublet 5 polyglutamylation and a stall in beating.

J Cell Sci. (2016) 129(14):2757-2766.

doi: 10.1242/jcs.185983.

Shimma S, Kumada HO, Taniguchi H, Konno A, Yao I, Furuta K, Matsuda T, Ito S.

Microscopic visualization of testosterone in mouse testis by use of imaging mass spectrometry.

Anal Bioanal Chem. (2016) 408(27):7607-7615.

doi: 10.1007/s00216-016-9594-9

矢尾育子

アセチルコリンの質量分析イメージング Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan (2016) 64 (1) 31-34

doi: 10.5702/massspec.S16-07

Hossen MA, Nagata Y, Waki M, Ide Y, Takei S, Fukano H, Romero-Perez GA, Tajima S, Yao I, Ohnishi K, Setou M.

Decreased level of phosphatidylcholine (16:0/20:4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: a single-cell MALDI-IMS approach.

Anal Bioanal Chem. (2015) 407(18):5273-5280.

doi: 10.1007/s00216-015-8741-z.

Romero GA, Takei S, Yao I.

Imaging Mass Spectrometric Analysis of Neurotransmitters: A Review.

Mass Spectrometry (Tokyo) (2015) 3(3):S0049.

doi: 10.5702/massspectrometry.S0049

Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, Takei S, Yao I, Maesako M, Kinoshita A, Yamamoto T, Kon R, Sugiyama K, Setou M.

DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer's disease.

Sci Rep. (2014) 4:7130.

doi: 10.1038/srep07130.

Lu J, Yao I, Shimojo M, Katano T, Uchida H, Setou M, Ito S.

Identification of nitrated tyrosine residues of protein kinase G-I α by mass spectrometry.

Anal Bioanal Chem. (2014) 406(5):1387-1396.

doi: 10.1007/s00216-013-7535-4.

[学会発表](計 28件)

Eto F, Matsuda T, Setou M, Yao I

Imaging mass spectrometry revealed the alteration of amine neurotransmitters in Scrapper-knockout mice brain

the 50th annual meeting of the Society for Neuroscience 2018/11/7San Diego (USA)

Suetani H, Eto F, Yao I A manifold learning approach to imaging mass spectrometry analysis in mice brain

the 50th annual meeting of the Society for Neuroscience 2018/11/7San Diego (USA)

Aizawa F, Yao I, Sato S, Yamazaki F, Yamashita T, Nakamoto K, Hirasawa A, Kurihara T, Kasuya F, Miyata A, Setou M, Tokuyama S

The breakdown of free fatty acids-GPR40/FFAR1 signaling in the brain induce development of chronic pain after social defeat stress in mice

the 50th annual meeting of the Society for Neuroscience 2018/11/7San Diego (USA)

松田 孟士, 鈴木 勇三, 藤澤 朋幸, 齊藤 伸幸, 菅 裕徳, 須田 隆文, 矢尾 育子

喘息モデルマウス肺組織におけるアセチルコリン過剰分泌の質量分析イメージングによる可視化

第 43 回日本医用マススペクトル学会年

2018/9/6 北海道大学 学術交流会館(札幌市)

衛藤史博, 松田孟士, 瀬藤光利, 矢尾育子

質量分析イメージングで可視化された Scrapper ノックアウトマウス脳における神経伝達変化

第 41 回日本神経科学大会

2018/7/28 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

松田 孟士, 深野 華, 久恒 辰博, 矢尾 育子

質量分析イメージングを用いた APP/PS1 アルツハイマー病モデルマウス脳組織におけるアセチルコリン分泌減少の可視化

第 41 回日本神経科学大会

2018/7/28 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

Matsuda T, Fukano H, Eto F, Yao I.

“Analysis of rivastigmine distribution in the brain by imaging mass spectrometry”

第 36 回日本認知症学会学術集会

2017/11/24 ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市)

Matsuda T, Fukano H, Waki M, Takei S, Eto F, Setou M, Maki T, Yao I

“Brain amine neurotransmitters are comprehensively visualized by matrix-free laser desorption/ionization imaging mass spectrometry using a unique photocleavable derivatizing agent”

the 47th annual meeting of the Society for Neuroscience 2017/11/14 Washington, DC (USA)

Eto F, Matsuda T, Setou M, Yao I

“Alteration of amine neurotransmitters in Scrapper-knockout mice brain visualized by imaging mass spectrometry”

the 47th annual meeting of the Society for Neuroscience

2017/11/12 Washington, DC (USA)

衛藤史博、松田孟土、瀬藤光利、矢尾育子

「MALDI-IMS を用いた Scrapper ノックアウトマウス脳組織における神経伝達物質局在分布の可視化」

第 42 回日本医用マススペクトル学会年会

2017/9/14 一橋講堂 (東京都千代田区)

松田孟土、矢尾育子

「MALDI-IMS を用いたマウス肺組織におけるアセチルコリン局在分布の可視化」

第 42 回日本医用マススペクトル学会年会

2017/9/14 一橋講堂 (東京都千代田区)

矢尾育子、深野華、脇紀彦、瀬藤光利、真木俊英

「光開裂分子を用いたアミノ酸神経伝達物質の質量分析イメージング」

第 40 回日本神経科学大会

2017/7/22 幕張メッセ (千葉県千葉市)

松田孟土、久恒辰博、矢尾育子

「記憶障害を有する A PPswE/PSEN1dE9 アルツハイマー病モデルマウス脳組織におけるアセチルコリンの質量分析イメージング」

第 40 回日本神経科学大会

2017/7/22 幕張メッセ (千葉県千葉市)

深野華、脇紀彦、武井史郎、瀬藤光利、真木俊英、矢尾育子

「光開裂分子を用いた神経伝達物質のイメージング」

第 65 回質量分析総合討論会

2017/5/19 つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

Yao I

“Mass spectrometry imaging for transitional condition of drug to the mouse brain”

第 1 回国際マスイメージングセンターミーティング

2016/10/6 浜松医科大学 (静岡県浜松市)

矢尾育子

「超解像イメージングによるシナプス伝達制御機構の解析」

第 94 回日本生理学会大会

2016/3/29 アクティシティ浜松 (静岡県浜松市)

矢尾育子

「質量分析イメージングで何が見えるか」

第 42 回 BMS コンファレンス

2015/7/6 岐阜グランドホテル (岐阜県岐阜市)

矢尾育子

「質量分析イメージングの実際」

第 56 回日本組織細胞化学学会総会

2015/10/3 関西医科大学 (大阪府枚方市)

矢尾育子

「コピキチンリガーゼ SCRAPPER によるシナプス可塑性の調節」

第 93 回日本生理学会大会

2016/3/22 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

矢尾育子

「質量顕微鏡法による神経疾患モデル動物解析に向けて」

第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会

- 2016/3/28 ビッグパレットふくしま (福島県郡山市)
- 21 Yao I
“Imaging mass spectrometry of acetylcholine for the nerve tissue sections.”
The 14th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium Hamamatsu Meeting
2014/9/25 "浜松医科大学 (静岡県浜松市)
- 22 Yao I
“Mass spectrometry application for tissue imaging”
The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014 - The 30th
Anniversary of ANP (Atrial Natriuretic Peptide) Discovery
2014/9/12 "Kyoto (JAP) ホテルグランヴィア京都 (京都府京都市)
- 23 矢尾育子
“Synaptic localization of CaMKII in the spinal dorsal horn of kinase-dead knock-in
mouse in the neuropathic pain model.”
第 37 回日本神経科学大会 2014/9/11 "パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 24 Matsuda T, Shibahara M, Yao I, Hisatsune T
A type of cholinergic dysfunction involves cognitive deficit in a mouse model of Type 2
Diabetes Mellitus/Alzheimer ' s disease.
第 26 回国際アルツハイマー病会議 (AAIC 2014) 2014/7/13 Copenhagen (DNK)
- 25 矢尾育子
「脳内物質を対象とした質量分析イメージングの取り組みとその課題について」
第 28 回日本医用マススペクトル学会東海支部講演会
2014/6/28 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- 26 矢尾育子
「臨床化学への応用に向けたイメージング質量分析の取り組み」
第 67 回日本臨床化学会近畿支部例会 2014/6/14 神戸薬科大学 (兵庫県神戸市)
- 27 矢尾育子
「質量分析イメージングで可視化される生体分子情報」
バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ (BIIWS) 2014
2014/6/9 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
- 28 矢尾育子
「脳情報の解読に向けた質量分析イメージングの取り組み」
第 62 回質量分析総合討論会
2014/5/15 ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)

〔図書〕(計 3 件)

矢尾育子 (高橋良輔, 漆谷真, 山中宏二, 樋口真人編)、メディカルドゥ (大阪) 質量分
析イメージングによる脳内環境の可視化、遺伝子医学 MOOK 26 号 2014、207-211

Yao I, Romero GA, Nicolaescu D, Setou M. (T Yokomizo ed)

Springer Japan (Tokyo), Lipid machinery investigation using MALDI imaging mass
spectrometry. Bioactive Lipid Mediators:Current Reviews and Protocols 2015;371-391
doi:10.1007/978-4-431-55669-5

武井史郎, 矢尾育子

質量分析イメージングの最新動向 - 質量顕微鏡法について .
インナービジョン (2014) 29(7) 53-57.

〔その他〕

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26460388/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。