

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(A)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19209007  
 研究課題名(和文) プロテオゲノミックスの創成  
 研究課題名(英文) Establishment of Proteogenomics  
 研究代表者  
 三品 昌美(MISHINA MASAYOSHI)  
 東京大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：80144351

## 研究成果の概要：

本研究では、神経細胞がシナプスを形成する過程を *in vivo* で可視化し観察出来るゼブラフィッシュを用いて、精神遅滞の原因遺伝子の一つである IL1RAPL1 が嗅神経細胞軸索の終末におけるシナプス小胞の集積と形態変化を制御していることを明らかにした。さらに、IL1RAPL1 と結合する蛋白質をプロテオミクス解析で同定した。ゼブラフィッシュ機能解析系との組み合わせによるプロテオゲノミクス分野の開拓は、創薬の標的となる機能分子を提示することにより脳の機能障害や脳の発達障害などの克服に貢献するものと思われる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,300,000	5,490,000	23,790,000
2008年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
年度			
年度			
年度			
総計	32,500,000	9,750,000	42,250,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・薬理学一般

キーワード： (1) 軸索終末分化 (2) シナプス小胞 (3) 形態変化 (4) 可視化  
 (5) 精神遅滞 (6) プロテオミクス (7) ゼブラフィッシュ (8) 嗅神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳の特徴は、ハードがあり、ソフトが外から与えられるコンピューターと異なり、構造が機能を生み、機能が構造に影響を及ぼすハードとソフトが渾然一体となったシステムであることにある。このような脳の構造と機

能のダイナミクスが、臨界期に代表される遺伝子プログラミングと環境との相互作用に基づく脳の機能発達や成熟した脳が新たな情報を記憶・学習する基本的なメカニズムと考えられる。記憶障害などの脳の機能障害や脳の発達障害などの克服には創薬の標的となる機能分子の解明が必須である。同時に、

ヒトをヒトたらしめている脳を理解し、脳から心へ、心からヒトへ、ヒトから社会への人間統合科学への足場を築くものである。

## 2. 研究の目的

本研究は、プロテオミクス解析による中枢シナプス分子の探索とゼブラフィッシュを用いる *in vivo* シナプス機能解析系を組み合わせたプロテオゲノミクス分野を開拓することを目的とする。

## 3. 研究の方法

我々が開発した脊椎動物ゼブラフィッシュの神経回路可視化系と神経特異的遺伝子操作系は、中枢シナプス分子がシナプス形成に及ぼす機能を解析し、シナプス形成の鍵分子を絞り込むのに極めて有用である。脊椎動物のモデル生物としてのゼブラフィッシュの有用性は広く認知されるようになってきたが、多くの研究は初期発生に集中しており、中枢シナプスに焦点を当て開発した機能解析系はユニークである。プロテオミクス解析や燐酸化プロテオミクス解析による網羅的スクリーニングから得られる中枢シナプスを構成する多数の分子群が、神経情報の入力からシナプス再編に至る過程で如何なる役割を果たすのかを迅速に *in vivo* で解析する重要な系を提供する。シナプス機能の解析に、ノックアウトマウス作成による解析は有用であるが、時間と労力を必要とし、特に神経細胞特異的ノックアウトマウス作成は、多数の候補分子からスクリーニング的に機能を解析するには有効ではない。一方、培養細胞を用いた *in vitro* 解析系は迅速であるが、ノックアウトマウスによる *in vivo* の解析結果と必ずしも一致せず、問題が多い。シナプス形成の科学において一番のネックは生体内における適切な機能解析系がないことで、多数のシナプス分子が神経情報の入力からシナプス再編に至る過程で如何なる役割を *in vivo* で果たすのかは不明なままに留まっている現状を打ち破ることが出来る。

## 4. 研究成果

プロテオミクス解析による中枢シナプス分子の探索とゼブラフィッシュを用いる *in vivo* シナプス機能解析系を組み合わせたプロテオゲノミクス分野を開拓することを目的に以下の成果を上げることが出来た。

シナプス形成に伴い軸索終末が成熟する際にはシナプス小胞の軸索終末への集積や、形態変化が伴うことが知られている。シナプスの成熟期のゼブラフィッシュ嗅神経細胞軸索の終末では、Vesicle-associated

membrane protein 2 (VAMP2)-EGFP 融合タンパク質によって可視化したシナプス小胞が集積し、GAP43-EGFP によって可視化した軸索終末の形態が複雑な形から単純な形へリモデリングする。すでに、軸索終末へのシナプス小胞の集積は A キナーゼ/CREB シグナルによって調節され、軸索終末分化に伴う形態変化(リモデリング)はカルシニューリン/NFAT シグナルによって制御されることを明らかにしたが、これらを統御するシグナルを探索した。嗅神経細胞内でカルモジュリン阻害ペプチドを発現させるとシナプス小胞の集積とリモデリングの双方が阻害されることを見いだした。さらに内向き整流性カリウムチャンネルを発現させ神経細胞の発火を抑えたりリモデリングが抑制された。一方、イノシトール3リン酸5ホスファターゼを発現させ、小胞体からのカルシウム放出を抑制すると、シナプス小胞の集積が選択的に抑制されることがわかった。これらのことから、神経細胞の発火に伴う電位依存性カルシウムチャンネルを介したカルシウムシグナルがリモデリングを調節し、イノシトール3リン酸受容体を介した小胞体からのカルシウムシグナルがシナプス小胞の集積を調節することが示唆された。

さらに、精神遅滞の原因遺伝子である Interleukin 1 receptor accessory protein like 1 (IL1RAPL1)のゼブラフィッシュ相同遺伝子 IL1RAPL1b を単離し、モルフォリーノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて IL1RAPL1b の翻訳を抑制するとシナプス小胞の集積と軸索終末の形態変化が共に阻害されることを見いだした。さらに、TIR ドメインからのシグナル伝達を阻害する点変異を導入した IL1RAPL1b(IL1RAPL1 P455H)を発現させると軸索終末の形態変化は阻害されたが、シナプス小胞の集積は阻害されなかった。野生型 IL1RAPL1b の発現はシナプス小胞の集積を顕著に増加させたが、IL1RAPL1 P455H 変異を導入してもシナプス小胞の集積の増加は影響されなかった。一方ドメイン構造のよく似た Interleukin 1 receptor accessory protein (IL1RacP)と C 末端ドメインをスワップした変異体は IL1RAPL1b によるシナプス小胞の集積を増加させる効果を消失した。これらのことから、IL1RAPL1 は TIR ドメインを介して軸索終末の形態変化を、一方 C 末端ドメインを介してシナプス小胞の集積を調節することが示唆された。さらに、IL1RAPL1 と結合する蛋白質を単離し、質量分析系を用いて解析することにより 10 数個の結合分子を同定し、機能解析を進めている。したがって、プロテオミクス解析とゼブラフィッシュ機能解析の組み合わせるプロテオゲノミクス分野が有効であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Hashimoto, K., Yoshida, T., Sakimura, K., Mishina, M., Watanabe, M., and Kano, M. Influence of parallel fiber-purkinje cell synapse formation on postnatal development of climbing fiber-Purkinje cell synapses in the cerebellum. *Neuroscience*, in press, 2009, 査読有.

Uemura, T., and Mishina, M. The amino-terminal domain of glutamate receptor  $\delta 2$  triggers presynaptic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1315-1319, 2008, 査読有.

Yoshida, T. and Mishina, M. Zebrafish orthologue of mental retardation protein IL1RAPL1 regulates presynaptic differentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 218-228, 2008, 査読有.

Yasumura, M., Uemura, T., Yamasaki, M., Sakimura, K., Watanabe, M. and Mishina, M. Role of the internal Shank binding segment of glutamate receptor  $\delta 2$  in synaptic localization and cerebellar functions. *Neurosci. Lett.* 433, 146-151, 2008, 査読有.

Watanabe, F., Miyazaki, T., Takeuchi, T., Fukaya, M., Nomura, T., Noguchi, S., Mori, H., Sakimura, K., Watanabe, M. and Mishina, M. Effects of FAK ablation on cerebellar foliation, Bergmann glia positioning and climbing fiber territory on Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 27, 836-854, 2008, 査読有.

Kimura, M., Taniguchi, M., Mikami, Y., Masuda, T., Yoshida, T., Mishina, M. and Shimizu, T. Identification and characterization of zebrafish semaphoring 6D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 762-768, 2007, 査読有.

Uemura, T., Kakizawa, S., Yamasaki, M., Sakimura, K., Watanabe, M., Iino, M. and Mishina, M. Regulation of long-term depression and climbing fiber territory by glutamate receptor  $\delta 2$  at parallel fiber synapses through its C-terminal domain in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 27, 12096-12108, 2007, 査読有.

Tian, L., Stefanidakis, M., Ning, L., Lint, P. V., Nyman-Huttunen, H., Libert, C., Itoharu, S., Mishina, M., Rauvala, H. and Gahmberg, C. G. Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage. *J. Cell Biol.* 178, 687-700, 2007, 査読有.

Takemoto Kimura, S., Ishihara Ageta, N., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Mano, T., Okamura, M., Fujii, H., Fuse, T., Hoshino, M., Suzuki, S., Kojima, M., Mishina, M., Okuno, H. and Bito, H. Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI $\gamma$ . *Neuron* 54, 755-770, 2007, 査読有.

[学会発表](計 8 件)

F. Watanabe, T. Miyazaki, T. Takeuchi, K. Sakimura, M. Watanabe and M. Mishina. The ectopic location of Bergmann glia and altered climbing fiber territory on Purkinje cells by FAK ablation. The 31th Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (July 10, 2008, Tokyo International Forum, Japan).

T. Yoshida and M. Mishina. Zebrafish orthologue of mental retardation protein IL1RAPL1 regulates axon terminal differentiation. The 31th Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (July 10, 2008, Tokyo International Forum, Japan).

T. Uemura, S. Kakizawa, M. Yamasaki, K. Sakimura, M. Watanabe, M. Iino and M. Mishina. Role of the C-terminal PDZ binding domain of glutamate receptor  $\delta 2$  in synaptic plasticity and climbing fiber wiring. The 31th Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (July 11, 2008, Tokyo International Forum, Japan).

M. Yasumura, T. Uemura, M. Yamasaki, K. Sakimura, M. Watanabe and M. Mishina. Role of the internal Shank-binding segment of GluR $\delta 2$  in cerebellar

functions. The 31th Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (July 11, 2008, Tokyo International Forum, Japan).

T. Yoshida, A. Uotsu, S. Uchida and M. Mishina. Distinct calcium signaling for synaptic vesicle accumulation and morphological remodeling during axon terminal differentiation of zebrafish olfactory sensory neurons. The 81st Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (March 19, 2008, Yokohama, Japan).

M. Yasumura, T. Uemura, M. Yamasaki, K. Sakimura, M. Watanabe and M. Mishina. Roles of the internal PDZ-binding domain of GluR $\delta$ 2 in synaptic localization and cerebellar functions. The 81st Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (March 17, 2008, Pacifico Yokohama, Japan).

X. Chen, T. Yoshida, Y. Mikami, H. Sagara and M. Mishina. Receptor protein tyrosine phosphatase s regulates synaptic vesicle accumulation in axon terminals of zebrafish olfactory sensory neurons. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting (November 6, 2007, San Diego, USA).

M. Taniguchi, Y. Mikami, T. Masuda, M. Kimura, T. Yoshida, M. Mishina and T. Shimizu. Identification of a novel zebrafish semaphorin. The 30th Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (September 10-12, 2007, Pacifico Yokohama, Japan).

(3)連携研究者  
なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

三品 昌美 (MISHINA MASAYOSHI)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80144351

### (2)研究分担者

吉田 知之 (YOSHIDA TOMOYUKI)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90372367