

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791040  
 研究課題名 (和文) プロテオミクスアプローチによる末梢神経再生に関与する因子の探索  
 研究課題名 (英文) Proteomics of peripheral nerve injury  
 研究代表者  
 相木 比古乃 ( AIKI HIKONO )  
 札幌医科大学・医学部・研究員  
 研究者番号：10438004

研究成果の概要：プロテオミクスの技術を用いて末梢神経損傷後におけるタンパク質発現の変化を探索した。末梢神経損傷後には時期、部位特異的に発現が増減するタンパク質があり、そのうちのいくつかは神経再生に関わるものであった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：神経発生・神経発達・神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷は中枢神経損傷と比較し、より優れた再生能力があるとされている。現在、末梢神経損傷の再生メカニズムに関して様々なアプローチ法で研究が行われている。タンパク質を扱うプロテオミクスという比較的新しい分野でも、中枢神経や脊髄神経、末梢神経に対する研究が近年多くみられるようになってきた。特に末梢神経の基本をなす軸索には核がなく、核酸改正の有効性が疑問視されており、プロテオミクスは非常に有用であると思われる。我々はこのプロテオミクスという分野から末梢神経損傷後の発現タンパク質の変化を探索しようと試みた。

## 2. 研究の目的

プロテオミクスアプローチにより末梢神経損傷後に神経内に発現するタンパク質を経時的、包括的に探索し、その変化を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ラットを用いて坐骨神経を中央部で切断した切断群と坐骨神経の展開のみを行ったシャム群を作成する。

(2) 切断群は術後 5, 10, 35 日後に坐骨神経を切断近位、遠位を各々断端を含めて 1cm 摘出する。シャム群は術後 5 日で 1cm の坐骨神経

を抽出する。

(3) 神経を抽出バッファーに溶解し、超遠心分離器で可溶性画分と不溶性画分に分離する。不可溶部はさらにドデシル硫酸ナトリウムに溶解させ、可溶部、不可溶部ともに1次元電気泳動を行う。

(4) 泳動したゲルを10分割し、さらに1mm角に切離してin gel digestionを行う。

(5) in gel digestionで得た溶出液をクロマトグラフィーで流し、質量分析器で解析を行う。

(6) 質量分析器で得たデータを元にデータベース探索し、タンパク質を同定する。

(7) 半定量化を示すemPAIという数式を用いて発現タンパク質の増減を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 1cmの坐骨神経からシャムでは約900種、切断群では約1000種のタンパク質が同定された。今回の研究で同定したタンパク質の総数は2353種であった。これは過去の研究報告と比較し、非常に多いものである。

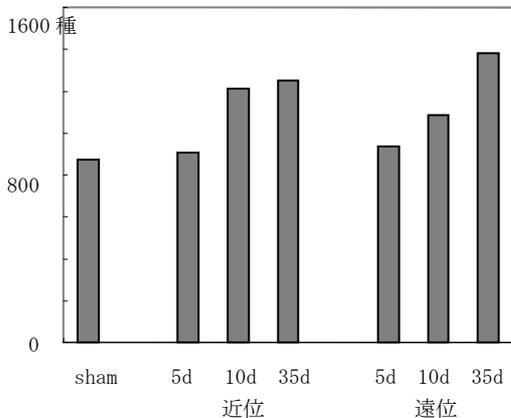


図1 同定タンパク質数

(2) 坐骨神経切断後5, 10, 35日に切断近位、遠位で発現するタンパク質を分子機能や生物学的プロセスに沿って分類した。しかし際立った変化はみられなかった。末梢神経切断後にある特定のグループのタンパク質が増減するという事はなかった。

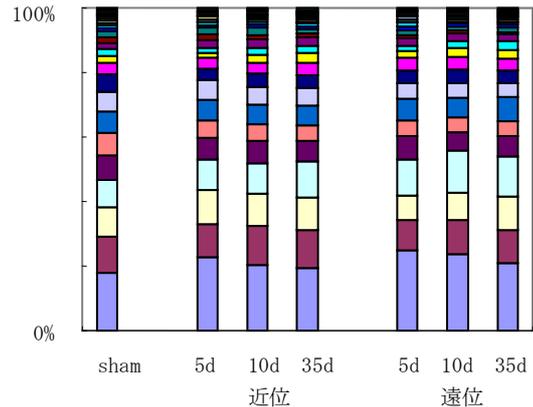


図2 発現タンパク質の分子機能別分類

(3) 神経切断後に時期および部位特異的に発現が増加するタンパク質を複数同定できた。また、いくつかの分子に対しては抗体を用いて神経組織内での発現を検証した。

#### ①近位で増加

5日：同定なし

10日：a-FGF, GAP-43

35日：Lin-7-Ba, laminin  $\beta$ 3, chromatin modifying protein 6

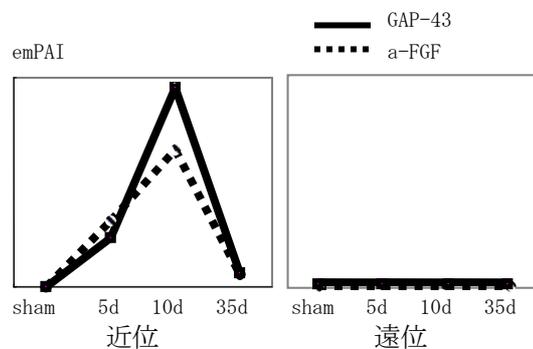


図3 切断後10日の近位で増加するタンパク質

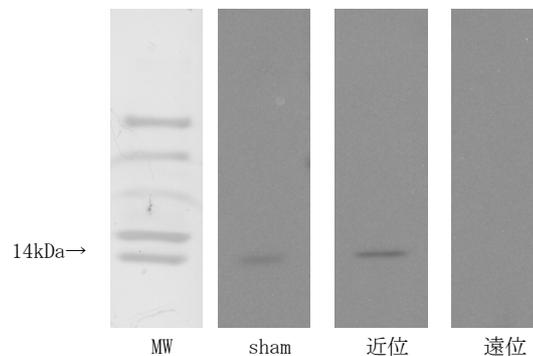


図4 シャムおよび切断後10日の末梢神経におけるa-FGFのウエスタンブロット

## ②遠位で増加

5日: PN-1, ribosomal protein L9, prosaposin

10日: 同定なし

35日: HMGI-C, apolipoprotein M, mesoderm specific transcript, attractin, plasma kallikrein, ribosomal protein L38, laminin  $\alpha$ 5, KDEL receptor

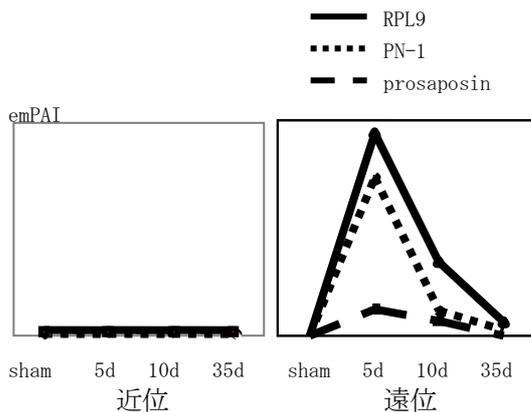


図5 切断後5日の遠位で増加するタンパク質

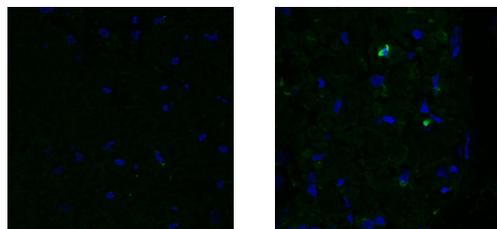


図6 切断後5日におけるPN-1の免疫染色

(4) 時期および部位特異的に発現が増減するタンパク質のうち、切断後10日の近位で増加する  $\alpha$ -FGF は末梢神経再生を促進する働きがあり、GAP-43 は軸索伸張、シナプス形成、神経発芽に関与している。また切断後5日の遠位で増加する PN-1, prosaposin はいずれも神経再生を促進する働きを持っている。このように、ある特異的な発現様式を示すタンパク質には神経再生に関わる分子が含まれていることが分かった。

(5) 前述した神経再生に関与している分子である  $\alpha$ -FGF, GAP-43, PN-1, prosaposin の分子間のネットワーク検索を行った。

KeyMolnet というソフトウェアを用いた。これら4分子を含むネットワークの中心には STAT (signal transducers and activators of transcription) があつた。末梢神経が維持モードから再生モードに切り替わる際の調節機構として STAT が関わっている可能性があるという報告がある。我々の結果もこの変化に関連しているのかもしれない。

(6) 本研究から、末梢神経切断後において時期および部位特異的に様々なパターンで発現するタンパク質が同定された。そのうち末梢神経再生促進作用があるものは過去の論文報告と合わせて検討すると、切断後10日の近位と切断後5日の遠位で発現が増加したタンパク質であった。今後、このパターンで増加するタンパク質をより多く同定することにより、時期、部位特異的な神経再生促進因子を探索することを展望とする。

## 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3件)

① 相木比古乃、末梢神経損傷における部位、時期特異的発現タンパク質のプロテオミクス、日本手の外科学会雑誌、査読無し、第26巻、2009年3月5日、S88

② 相木比古乃、末梢神経損傷における発現タンパク質のプロテオミクス、日本整形外科雑誌、査読無し、第82巻、2008年8月25日、S1075

③ 相木比古乃、末梢神経損傷における発現タンパク質のプロテオミクス解析、日本整形外科雑誌、査読無し、第81巻、2007年8月25日、S921

[学会発表] (計4件)

① 相木比古乃、末梢神経損傷における部位、時期特異的発現タンパク質のプロテオミクス、日本手の外科学会、2009年4月16日、於：東京

② 相木比古乃、末梢神経損傷における発現タンパク質のプロテオミクス、日本整形外科学会基礎学術集会、2008年10月24日、於：京都市

③相木比古乃、末梢神経損傷における発現タンパク質のプロテオミクス解析、日本整形外科学会基礎学術集会、2007年10月25日、於：浜松市

④相木比古乃、末梢神経損傷における発現タンパク質のプロテオミクス解析、北海道整形災害外科学会、2007年6月24日、於：札幌市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相木 比古乃 (AIKI HIKONO)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：10438004

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：