

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16120

研究課題名（和文）神経細胞の樹状突起スパインにおける小胞体の膜動態の解析

研究課題名（英文）Study on dynamics of the endoplasmic reticulum in dendritic spine

研究代表者

持田 啓佑（Mochida, Keisuke）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：40837176

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体の動態や機能を局所的に制御するような小胞体上マイクロドメインのタンパク質を網羅的に決定する新しいプロテオーム解析手法を確立した。プロテオーム解析から、神経変性疾患などとの関連が報告されているタンパク質複合体を見出し、このタンパク質複合体が神経細胞などの小胞体膜上でマイクロドメインを形成するという新しい側面を明らかにした。さらにこのマイクロドメインの形成メカニズムや生理機能の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて開発されたプロテオーム解析手法は、様々な生命現象に関わるマイクロドメインの研究に応用することができ、将来的には幅広い分野の生命科学研究へと波及していくことが期待される。また同定された神経変性疾患などに関わるタンパク質複合体の持つ新しい側面を明らかにしたことは、該当疾患の発症機構を理解する上でのひとつの重要な足掛かりとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have developed a method for proteome analysis of microdomains on the endoplasmic reticulum (ER) that locally regulates dynamics and functions of the ER. We identified a protein complex reported to be involved in neurodegenerative diseases and found that this protein complex forms a microdomain on the ER. We have revealed a part of mechanisms for the formation and functions of this microdomain.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 神経細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

小胞体はタンパク質や脂質の合成・輸送、カルシウムイオンの貯蔵と放出など、多岐にわたる役割を担う膜オルガネラであり、連続した構造体として細胞内に張り巡らされている。神経細胞では、核を有する細胞体から、軸索や樹状突起などの神経突起の末端まで小胞体のネットワークが広がっており (Wu et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017)、小胞体の局在・分布を制御する仕組みが重要になる。神経細胞の樹状突起上に存在するスパインと呼ばれる瘤状の構造体は、他の神経細胞からの信号を受信する役割を持ち、その異常は発達障害・精神疾患発症の主要な要因となる。スパインの内部にも小胞体は侵入しており、小胞体内に貯蔵されたカルシウムイオンの放出を介して記憶や学習の基盤となる現象であるシナプスの可塑的变化を誘導することが報告されており (Miyata et al, *Neuron*, 2000) こうした小胞体輸送の異常は発達障害・精神疾患などの発症につながる可能性がある。一方ですべてのスパインの内部に小胞体が存在するわけではなく、一部のスパインにのみ、樹状突起内の小胞体からその一部が伸びて輸送されると考えられている (Spacek and Harris, *J Neurosci*, 1997; Holbro et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009)。こうした小胞体の輸送はアクチン細胞骨格やミオシンモータータンパク質を介して行われるとされているが (Wagner, *Nat Cell Biol*, 2011) スパイン近傍で局所的に行われる輸送を直接的に制御する小胞体膜上の因子は未発見であった。また近年、オルガネラの機能や動態を局所的に制御する様々なオルガネラ上マイクロドメインの存在が報告されてきたが、神経細胞におけるこうした小胞体の動態を局所的に制御するような小胞体上のマイクロドメインの存在は不明であり、また既存的手法ではこうした小胞体膜上マイクロドメインのタンパク質を正確に決定することは困難であると予想された。

2. 研究の目的

まず小胞体膜上の特定のマイクロドメインに存在するタンパク質を同定するためのプロテオーム解析手法の確立を目指した。神経細胞、特に樹状突起スパインにおける小胞体の動態や機能を局所的に制御するようなマイクロドメインとそれを構成するタンパク質を同定し、その制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではまず小胞体の膜動態を制御するサブドメインなど、小胞体上のマイクロドメインに存在するタンパク質を同定するためのプロテオーム解析手法の開発を進めた。複数の手法を組み合わせた定量的なプロテオーム解析手法を確立し、タンパク質の網羅的な同定を行った。同定されたタンパク質の中から特に精神疾患や神経変性疾患などの発症に関連するタンパク質に注目し、共焦点顕微鏡を用いた蛍光イメージングや標的とする遺伝子の発現操作などにより、これらのタンパク質がマイクロドメインを形成することで、小胞体のスパイン局在化など、小胞体の動態や機能を局所的に制御している可能性を検証した。さらにそれらのタンパク質がどのようにしてマイクロドメインを形成して局所的に小胞体の動態や機能を制御するのか、生化学的な解析や蛍光イメージングにより分子メカニズムの解析を進めた。

4. 研究成果

まず培養細胞を用いて、小胞体上マイクロドメインに存在するタンパク質を網羅的に決定するためのプロテオーム解析手法の確立を試みた。様々な実験条件を検討し、近接依存ラベリングや生化学的な分画を組み合わせるなどして、小胞体上マイクロドメインのプロテオーム解析手法を確立することが出来た。SILAC法を用いた定量的なプロテオーム解析により、小胞体膜上でマイクロドメイン形成する可能性のあるタンパク質を複数同定した。また、開発したプロテオーム解析手法をマウス胎児脳由来の初代培養神経細胞に応用した。これら一連の解析の結果、興味深いことに神経変性疾患・精神疾患との関連が報告されているタンパク質複合体が同定された。蛍光イメージングや生化学的な解析を進めた結果、同定されたタンパク質が小胞体膜上でマイクロドメインを形成することが強く示唆され、該当の神経変性疾患関連タンパク質の持つ新しい側面が明らかになってきた。このタンパク質の機能阻害では、スパイン内部への小胞体侵入などの小胞体の細胞内分布への影響は確認できなかったものの、小胞体の品質管理に関わるドメインとして機能することが示唆された。また研究開始後、他の研究グループからカルシウムイオン

濃度の上昇を感知してスパインへの小胞体輸送を制御するタンパク質とその制御メカニズムが報告されてしまったことなどから (Konietzny et al, *bioRxiv*, 2020)、計画を修正し、同定した神経変性疾患・精神疾患に関わるタンパク質複合体が小胞体膜上でマイクロドメイン形成するメカニズムや、小胞体機能や該当疾患発症との関連性をさらに解析していくこととした。同定したタンパク質と相互作用するタンパク質の中から、マイクロドメイン形成に重要な因子を見出し、マイクロドメイン形成メカニズムの一端が明らかとなった。さらにマイクロドメイン形成を亢進させる薬剤処理条件を見出し、このマイクロドメイン形成が動的に制御されていることが示唆された。

また並行して、長期増強を誘導するような神経刺激やストレス条件に神経細胞をさらすなどして、マイクロドメイン形成の変動を定量的プロテオーム解析により調べた。これらの刺激やストレスに応じて、タンパク質合成に関わるタンパク質など、特定のタンパク質群のプロテオームに変動が見られた。すなわち、神経刺激やストレスに応じた神経細胞内構造の再編成のために、これらのタンパク質を含むマイクロドメインの形成が動的にコントロールされている可能性が示唆された。

本研究で確立したプロテオーム解析技術は様々な細胞内構造体に応用することが可能であり、今後幅広い生命科学研究への応用・展開が期待できる。また本研究を通じて明らかになってきた神経変性疾患関連タンパク質複合体の持つ新たな一面は、将来的に該当疾患の発症機構の理解に向けた重要な足掛かりとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 持田 啓佑、田中 元雅	4. 巻 39
2. 論文標題 膜性オルガネラと非膜性コンパートメントのクロストーク	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学増刊 -相分離 メカニズムと疾患-	6. 最初と最後の頁 116-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 持田 啓佑、田中 元雅
2. 発表標題 プロテオーム解析に基づく膜オルガネラ上非膜コンパートメントの解析
3. 学会等名 AMED-CREST Kick Off Meeting, アミロイドの生成・脱凝集過程に着目した神経変性疾患の病態解明と医療応用
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 持田 啓佑、田中 元雅
2. 発表標題 小胞体膜上の非膜コンパートメントのプロテオーム解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Mochida, Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Proteomics-based analysis of membraneless compartments associated with ER membranes
3. 学会等名 学術変革領域(A)クロススケール新生物学 第一回領域会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Mochida, Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Proteomics-based analysis of membraneless compartments associated with ER membranes
3. 学会等名 RIKEN CBS ONLINE RETREAT 2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関