

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689021

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼSCRAPPERによる細胞内輸送制御機構の解明

研究課題名(英文) Roles of the ubiquitin ligase, SCRAPPER, in intracellular transport

研究代表者

矢尾 育子 (Yao, Ikuko)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・准教授

研究者番号：60399681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)： 選択的タンパク質分解は様々な細胞機能の制御に重要であり、細胞内輸送においても重要であることが予想される。本研究では、申請者が発見したユビキチンリガーゼSCRAPPER (Yaoら Cell 2007) を介したモータータンパク質の動態制御に着目して解析を行った。

研究代表者らの解析の結果、SCRAPPERとモーター蛋白質が相互作用することが明らかとなった。また、SCRAPPER依存のユビキチン化及び蛋白質分解によりモーター蛋白質量が調節されることが見出された。さらに、質量分析イメージングにより、Scrapper遺伝子ノックアウトマウスにおいて量的に変動する候補分子が複数得られた。

研究成果の概要(英文)： Selective protein degradation is crucial in regulation of various cellular functions. The degradation machinery is supposed to play important roles in intracellular transport. To address this issue, we studied the regulation of the dynamics of motor protein by the ubiquitin ligase, especially focused on SCRAPPER, which we previously identified (Yao et al., Cell 2007)

We revealed reciprocal interactions between SCRAPPER and the motor protein and found that the amount of the motor protein was regulated by SCRAPPER dependent ubiquitination and the proteasomal degradation.

With mass spectrometry imaging technique, we also identified some candidates of molecules that showed significant modulation in the brain sections of Scrapper gene knockout mice compared with those of wild type mice.

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

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質で合成された蛋白質をはじめとする分子は、機能すべき場所に運ばれることで本来の役割を果たすことが可能となる。分子拡散に加え、合成された分子を機能すべき場所へ輸送するための細胞内輸送機構により、細胞膜や細胞内の成分は均一ではなく特定の場所に偏って存在することになる。この局在の偏りが極性である。特に、神経細胞では、神経突起とそれらのつなぎ目であるシナプスにおいて高度に極性が成立している。

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、神経細胞における輸送機構にも重要であることが予想される。KIF1 は小胞前駆体の輸送を担うモーター蛋白質であることから、多くの神経変性疾患で見られるユビキチン化の異常の1つに KIF1 のユビキチン化が含まれる可能性がある。また、KIF1 は遺伝性末梢神経疾患の Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) の原因遺伝子の一つであることから、これらの関連を明らかにすることは神経難病の医化学的病態理解につながると考えられた。

### 2. 研究の目的

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、細胞内輸送においても重要であることが予想される。そこで本研究では、申請者が発見したユビキチンリガーゼ SCRAPPER (Yao ら Cell 2007) を介した KIF1 を含むモーター蛋白質の動態制御に着目して解析を行い、SCRAPPER とモーター蛋白質の関係を明らかにすることを目的とした。

本研究は、蛋白質分解を介した分子数の調節により生命のダイナミックな情報発現が制御される機構を、神経細胞と輸送に関わる蛋白質分子を可視化し、数理モデル化を行うことで明らかにする。得られた情報から、ユビキチンプロテアソーム系による細胞内輸送・極性の制御機構の統合的な理解をはかり、さらには神経難病の医化学的病態解明へとつなげるものである。

### 3. 研究の方法

(1) ユビキチンリガーゼ SCRAPPER 依存的蛋白質分解により調節されるモーター蛋白質の解析

ユビキチンリガーゼ SCRAPPER とモーター蛋白質の蛋白質相互作用の検出；標的分子の有力候補であるモーター蛋白質をターゲットとして、二次元電気泳動、抗体アレイ、シナプス関連蛋白質に対する抗体を用いたウェスタンブロット法により抽出物に含まれる量を検討、免疫組織化学実験での脳切片観察により脳組織における発現量を検討した。

SCRAPPER 依存的なモーター蛋白質ユビキチン化の試験管内再構成：ユビキチンリ

ガーゼ複合体とモーター蛋白質の組み換え体を、ユビキチン存在下で、ATP、E1、E2 を加えてインキュベートし、標的分子のユビキチン化を観察した。ユビキチン化の検出方法として、ターゲット分子となるモーター蛋白質がユビキチン化により分子量の変化を起こしているかを、モーター蛋白質に対する抗体あるいは抗ユビキチン抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。

SCRAPPER の量により調節されるモーター蛋白質量の検討：SCRAPPER ノックアウトあるいは過剰発現マウスの脳を用いて、変動しているモーター蛋白質の量を検証した。具体的には、シナプス関連蛋白質に対する抗体を用いたウェスタンブロット法により抽出物に含まれる量を検討した。

(2) SCRAPPER 依存的蛋白質分解により調節されるモーター蛋白質のモデル化・可視化・検証

SCRAPPER 依存的蛋白質分解を数理モデル化；神経細胞と機能分子、その相互作用について数理モデル化し、分子動態のシミュレーションを行った。

GFP 融合蛋白質を用いた神経細胞における KIF1 の分子動態の観察：GFP タグを付した組み換えモーター蛋白質を作成し、神経細胞に発現させてリアルタイム観察を行った。プロテアソーム阻害剤を作用させて分解を阻害し、発現させた蛋白質が分解されずに蓄積していく様子を経時的に観察した。観察時にはインキュベータで顕微鏡のステージを温め、ステージ上に保温チャンバーを置いて安定した温度環境のもとで観察を行った。

質量顕微鏡による SCRAPPER 依存的な分解とその下流で変動する分子の検出；野性型マウス及び *Scrapper* ノックアウトマウス脳の凍結切片を作製し、質量顕微鏡による観察で切片上にある分子の局在変化を検出した。このモデルで予想された各分子の動態と比較し、仮説を検証した。

### 4. 研究成果

ユビキチンリガーゼ SCRAPPER とモーター蛋白質が相互作用し、SCRAPPER 依存的ユビキチン化及び蛋白質分解により、モーター蛋白質量が調節されることが明らかとなった。GFP 融合モーター蛋白質を細胞に発現させ、その動態を観察した結果、SCRAPPER の発現に応じて GFP-モーター蛋白質の発現量が変動する様子が観察された。さらに、質量分析イメージングにより *Scrapper* 遺伝子ノックアウトマウスにおいて量的に変動する候補分子が複数得られた。これらの成果をまとめて学術論文として投稿予定である。

*Scrapper* 遺伝子ノックアウトマウスの海馬スライスでは、Long-term potentiation に異常があることが分かった。この結果を論文として報告し、第 34 回日本神経科学大会、第 41 回北米神経科学学会で発表を行った。

また、*Scrapper* 遺伝子の一部欠損により、恐怖記憶の形成に異常が起きることを明らかにしている。この結果を第 84 回日本生化学会大会で発表した。また、質量顕微鏡による *Scrapper* 遺伝子ノックアウトマウス脳の解析を第 43 回日本臨床分子形態学会・学術集会、The 1st NIBB - Princeton Symposium で発表した。SCRAPPER 分子の解析については、新潟脳神経研究会特別例会等で紹介した。

#### 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 14 件)

1. Hossen A, 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, in press (査読有) doi: 10.1007/s00216-015-8741-z
2. 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 (査読有) doi: 10.1038/srep07130
3. Setou M, Yao I, Alisa G. Woods and Costel C. Darie (Eds.): Advancements of mass spectrometry in biomedical research, Anal Bioanal Chem, 407, 1283-84, 2015 (査読有) doi: 10.1007/s00216-014-8372-9
4. 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 29, 53-57, 2014 (査読無)
5. Lu J, Yao I, Shimojo M, Katano T, Uchida H, Setou M, Ito S, Identification of nitrated tyrosine residues of protein kinase G-Ia by mass spectrometry, Anal Bioanal Chem, 406, 1387-96, 2014 (査読有) doi: 10.1007/s00216-013-7535-4
6. Romero GA, Takei S, Yao I, Imaging Mass Spectrometric Analysis of Neurotransmitters, A Review, Mass Spectrometry (Tokyo) 3 S0049, 2014 (査読有) doi: 10.5702/massspectrometry.S0049
7. Eriksson C, Masaki N, Yao I, Hayasaka T, Setou M, MALDI Imaging Mass Spectrometry-A Mini Review of Methods and Recent Developments, Mass Spectrom (Tokyo), 2, S0022, 2013 (査読有) doi: 10.5702/massspectrometry.S0022
8. 矢尾育子, 脳内物質のイメージング質量分析, JSBMS Letters 38 41-46, 2013 (査読無)
9. 矢尾育子, 伊藤誠二, 神経科学領域における質量分析イメージング, 臨床化学 42 332-337, 2013 (査読無)
10. Takagi H, Setou M, Ito S, Yao I, SCRAPPER Regulates the Thresholds of Long-Term Potentiation/Depression, the Bidirectional Synaptic Plasticity in Hippocampal CA3-CA1 Synapses, Neural Plasticity Volume 2012, 2012 (査読有) doi: 10.1155/2012/352829
11. Sugiura Y, Zaima N, Setou M, Ito S, Yao I, Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry, Anal Bioanal Chem 403, 1851-61, 2012 (査読有) doi: 10.1007/s00216-012-5988-5
12. Chizaki R, Yao I, Katano T, Matsuda T, Ito S, Restricted Expression of Ovolo2/MOVO in XY Body of Mouse Spermatocytes at the Pachytene Stage J Androl 33, 277-86, 2012 (査読有) doi: 10.2164/jandrol.110.012294
13. Yamada M, Yao I, Hayasaka T, Ushijima M, Matsuura M, Takada H, Shikata N, Setou M, Kwon AH, Ito S, Identification of oligosaccharides from histopathological sections by MALDI imaging mass spectrometry, Anal Bioanal Chem 402, 1921-30, 2012 (査読有) doi: 10.1007/s00216-011-5622-y
14. Hayasaka T, Goto-Inoue N, Ushijima M, Yao I, Yuba-Kubo A, Wakui M, Kajihara S, Matsuura M, Setou M, Development of imaging mass spectrometry (IMS) dataset extractor software, IMS convolution, Anal Bioanal Chem 401, 183-93, 2011 (査読有) doi: 10.1007/s00216-011-4778-9

[学会発表](計 33 件)

1. 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, ホテルグランヴィア京都 (京都府京都市)
2. 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)
3. 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, AAIC 2014, 2014/7/13, Copenhagen (DNK)
4. 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)
5. 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)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 矢尾育子, ユビキチンリガーゼ Scrapper ノックアウトマウスの解析, 新潟脳神経研究会特別例会, 2014/2/10, 新潟大学 (新潟県新潟市)
  10. 矢尾育子, 先駆ける研究に至るまで, 第 3 回東北脳科学ウィンタースクール, 2014/2/15, 東北大学 (宮城県仙台市)
  11. 矢尾育子, 質量顕微鏡による生体分子イメージングへの取り組み, 平成 25 年度奈良先端未来開拓コロキウム, 2013/12/13, 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県奈良市)
  12. Yao I, Matsumura S, Katano T, Yamagata K, Imoto S, Ito S, Synaptic localization of CaMKII in the spinal dorsal horn of kinase-dead knock-in mouse in the maintenance of neuropathic pain, the 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience, 2013/11/11, San Diego (USA)
  13. 矢尾育子, 脳内物質の質量イメージング (受賞講演), 第 38 回医用マススペクトル学会, 2013/9/27, 神戸市産業振興センター (兵庫県神戸市)
  14. 矢尾育子, 質量分析イメージングによる脳情報の可視化 医学への貢献を目指して, 第 38 回医用マススペクトル学会, 2013/9/27, 神戸市産業振興センター (兵庫県神戸市)
  15. 矢尾育子, MALDI イメージング質量分析による病態分子イメージング, 第 142 回 質量分析関西談話会, 2013/8/10, 島津製作所関西支社マルチホール (大阪府大阪市)
  16. Yao I, Matsumura M, Ito S, Synaptic localization of CaMKII with mice model of chronic pain, 第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会合同大会, 2013/6/22, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
  17. 矢尾育子, 質量顕微鏡による生体分子イメージング, 第 14 回高分子 MS 研究会, 2013/5/29, 関西大学 (大阪府吹田市)
  18. 矢尾育子, 質量分析を利用したアセチルコリン局在の可視化について, 滋賀医科大学実験実習支援センターセミナー/認知症セミナー, 2013/12/3, 滋賀医科大学 (滋賀県大津市)
  19. Yao I, Sugiura Y, Zaima N, Setou M, Ito S, Imaging of acetylcholine in the nerve tissue sections with mass spectrometry, the 42nd annual meeting of the Society for Neuroscience, 2012/10/13, Louisiana (USA)
  20. Yao I, Application of imaging mass spectrometry for analysis of ubiquitin ligase SCRAPPER, 第 35 回日本神経科学大会, 2012/9/19, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
  21. Yao I, Sugiura Y, Zaima N, Setou M, Ito S, Optimization of conditions for acetylcholine detection in the nerve tissue sections by imaging mass spectrometry, 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012/9/17, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
  22. Setou M, Yao I, Hayasaka T, Masaki N, Eriksson C, Short Course "Introduction to Imaging Mass Spectrometry", 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012/9/17, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
  23. 矢尾育子, 質量顕微鏡によるイメージングについて, NAIST バイオサイエンス研究科セミナー, 2012/9/14, 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県奈良市)
  24. Yao I, Sugiura Y, Zaima N, Setou M, Ito S, Visualization of acetylcholine distribution in the brain by imaging mass spectrometry, 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2012/5/21, Vancouver (Canada)
  25. Yao I, Takao K, Miyakawa T, Ito S, Setou M, Synaptic E3 ligase SCRAPPER is crucial for hippocampus-dependent fear memory formation, the 41st annual meeting of the Society for Neuroscience, 2011/11/13, Washington, DC (USA)
  26. Yao I, in situ Proteomics with Imaging Mass Spectrometry in the Scrapper-knockout Mouse Brain, The 1st NIBB - Princeton Symposium, 2011/11/2, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
  27. 矢尾育子, 高雄啓三, 宮川剛, 伊藤

誠二, 瀬藤光利, F ボックスタンパク質 Scrapper ノックアウトマウスにおける海馬依存的恐怖記憶形成の異常, 第 84 回日本生化学会大会, 2011/9/23, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

28. Yao I, Takagi H, Ito S, Setou M, Synaptic plasticity mediated by SCRAPPER in hippocampal CA3-CA1 synapses, 第 34 回日本神経科学大会, 2011/9/17, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
29. 矢尾育子, 杉浦悠毅, 財満信宏, 瀬藤光利, 伊藤誠二, 質量顕微鏡法を用いた神経伝達物質の検出と可視化に向けた検討, 第 36 回日本医用マススペクトル学会年会, 2011/9/15, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)
30. 矢尾育子, 質量分析イメージングによる病理標本の解析, 第 43 回日本臨床分子形態学会・学術集会, 2011/9/10, 大阪医科大学 (大阪府高槻市)
31. Yao I, Takagi H, Ito S, Setou M, Analysis of Scrapper, a component of presynaptic ubiquitin E3 ligase, OIST International Workshop, Molecular & Structural Organization of Presynaptic Function and Plasticity, 2011/9/8, 沖縄科学技術研究基盤整備機構 (沖縄県国頭郡恩納村)
32. Yao I, Takao K, Miyakawa T, Ito S, Setou M, Synaptic F-box protein SCRAPPER is involved in hippocampus-dependent fear memory formation, 第 6 回 ICNBD 国際カンファレンス, 2011/8/3-5, ANA クラウンプラザホテル富山 (富山県富山市)
33. Yao I, Yamada M, Hosaka K, Hayasaka T, Ushijima M, Matsuura M, Setou M, Ito S, Direct MALDI-TOF mass analysis of histopathological sections with imaging mass spectrometry convolution software, 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2011/6/8, Denver, (USA)

〔図書〕(計 3 件)

1. Yao I, Romero GA, Nicolaescu D, Setou M. (T Yokomizo ed), Lipid machinery investigation using MALDI imaging mass spectrometry, Bioactive Lipid Mediators, Current Reviews and Protocols, Springer Japan, 2015 in press
2. 矢尾育子. 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 207-11, メディカルドゥ, 2014
3. Sugiura Y, Yao I, Setou M. Imaging Mass Spectrometry (IMS) for Biological Application, Mass Spectrometry Handbook 41-83, John Wiley & Sons,

2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢尾 育子 (YAO, Ikuko)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・准教授

研究者番号: 60399681