

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670729

研究課題名(和文)新規Src遺伝子改変マウス視神経症モデルの網膜蛋白リン酸化の変動解析

研究課題名(英文)Retinal phosphoprotein analysis in novel Src mutant optic neuropathy mouse model

研究代表者

加藤 梧郎 (KATO, Goro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：60177441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：活性化型Srcの分解を制御するSrcのセリン75リン酸化の擬似変異マウス(SDマウス)は、正常眼圧だが老齢化に伴い網膜神経節細胞(RGC)の障害が進行する。このリン酸化の脱制御による細胞死の機序を解明するため、2D-DIGE 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動システムを構築して、網膜のリン酸化タンパク質を網羅的に解析した。その結果、推定分子量45kDa、等電点約6付近のSDマウスのスポット#30の量が野生型よりも有意に増加していることが示された。これらの成果は、Src特異的なリン酸化の変異で変動するリン酸化タンパク質同定の基盤となり、RGCの障害機序を明らかにするうえで重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Degradation of activated Src is regulated by Cdk5-dependent phosphorylation of Src Ser75. RGC loss was stimulated without elevated intraocular pressure in the aged phospho-mimicking mutant SrcSer75Asp mice (SD mice). To address the molecular mechanism of the degeneration induced by deregulation of the Ser75 phosphorylation, we established 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) to globally detect changes in the retinal phosphoprotein abundance in retinas. The level of spot #30, which had an apparent molecular weight of 45kDa and an isoelectric point of 5.5~6.5, in SD mice was increased significantly than that of wild type mice. These results can lead to identification of retinal phosphoproteins changed by the Src-specific phosphorylation mutation, and are very important in elucidating the mechanism of RGC degeneration.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：網膜 Src リン酸化タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

正常眼圧型緑内障 (NTG) をはじめ網膜神経節細胞 (RGC) の細胞死を共通のステップとする視神経症の発症機序は、十分に解明されておらず特異的治療薬がない。そのため、哺乳類動物モデルの作製が必須である。

Src 型チロシンリン酸化酵素の一つである Src は、網膜ほかの中樞神経で発現が高い。この Src のユニーク領域中のリン酸化部位である Ser75 に、リン酸化の擬似変異 (SD 置換) を導入した遺伝子改変マウス (SD 変異マウス) は、ヒトの NTG と同様に眼圧が正常範囲にあり、炎症がみられず、また老齢化による緩やかな RGC 障害の進行を呈する。従って、この SD 変異マウスは NTG に選択的な創薬の開発や治療法の開発にとって非常に有用なモデルといえる。

Src は NMDA 受容体を上方制御することが知られている。しかし、Src と NMDA 受容体の特異的な結合の一つを阻害しても RGC 死を抑制せず、SD 変異マウスの老齢化に伴う発症機序については未解明である。

## 2. 研究の目的

Src 独自の加齢による RGC の脱落機序を明らかにし、NTG に有効な選択的治療薬の開発を目指す。その第一歩として RGC 細胞死の分子の基盤を検討するため、SD 変異マウスの加齢による SD 変異依存的に変動するリン酸化タンパク質を同定する。

本研究では、マウスの網膜リン酸化タンパク質 (RPP) を網羅的に解析し、老齢 SD 変異型にのみ増加する或いは減少するタンパク質を同定する。そのため、網羅的解析の実験システムである 2D-DIGE 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動システムが高い定量性と再現性をもって施行できるようにする。また、この確立したシステムを稼働して変動するリン酸化タンパク質の同定を行い、得られる性質に関する情報を基に、NTG 型の RGC 細胞死の選択的薬物治療や予

防法開発の分子標的を考察する。

## 3. 研究の方法

網膜の単離から 2D-DIGE 法による変動スポットの解析までの流れを図 1 に示した。



図 1 . 網膜リン酸化タンパク質 (RPP) の解析

### (1) RPP の精製

老齢マウスの網膜単離と保存法: 18 か月齢の老齢マウスの野生型 (WT) と SD ホモ接合体変異型 (SD/SD) の網膜を単離し液体窒素中で急速凍結し、マイナス 80 度で保存した。

網膜のタンパク質可溶化液の調製: 凍結網膜 10 個を 250  $\mu$ l の QIAGEN 社の 0.25% CHAPS, protease inhibitor cocktail, Benzonase, phosphatase inhibitor cocktail を各々添加した phosphoprotein lysis buffer (PLB) 中で超音波ホモジナイザー (タイテック社、VP-050) にかけた (冷却下、オートチューニング、オートパワー、パワー出力 35% の条件で 3~5 秒、2 回)、30 分間 (10 分ごとに攪拌) 氷浴後、遠心分離 (10,000 $\times$ g, 30 分) し上清を可溶化液とした。タンパク質の濃度は Bradford 法により測定した。

固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー: 可溶化液を PLB で 0.1 mg/ml に調製し、PhosphoProtein Purification Column (QIAGEN) にかけて洗浄後、0.25% CHAPS を含む PhosphoProtein Elution Buffer 500  $\mu$ l で 5 回溶出した。各画分のタンパク質濃度を測定し、リン酸化タンパク質液画分を限外濾過法 (分子量 10kDa 以上、

アミコンウルトラ-0.5) で CyDye 標識用 buffer( 下記参照, 30 mM Tris, 7M 尿素, 2M チオ尿素, 4% CHAPS, pH8.4) に交換後、濃縮した。

#### ( 2 ) 網膜リン酸化タンパク質(RPP)の蛍光標識

WT 及び SD/SD 変異マウスの RPP 各 50  $\mu$ g を混合後( 2 ~ 3 mg/ml, pH 8.5 ) 800 pmol の Cy3 ( GE ヘルスケア ) 標識液を加え遮光しながら氷浴、30 分間反応させ、10 mM の lysine で反応を停止した。また、WT の RPP 50  $\mu$ g ( 2 ~ 3 mg/ml, pH 8.5 ) に、400 pmol の Cy5 ( GE ヘルスケア ) 標識液を加え上記のように反応させ停止した。SD/SD の RPP 50  $\mu$ g ( 2 ~ 3 mg/ml, pH 8.5 ) も同様に Cy5 で標識した。各標識サンプルはマイナス 80 度で遮光保存した。

#### ( 3 ) 2-D DIGE の方法

Cy3 標識 WT+SD/SD 混合 RPP 試料(内部標準)12  $\mu$ g と WT 型の Cy5 標識 RPP 12  $\mu$ g を DTT 及び IPG buffer(pH4-7) を含む rehydration buffer ( 膨潤用緩衝液 ) と混合後、この混合液で IPG ストリップ( pI 4-7, 7 cm , GE ヘルスケア) を膨潤させた( WT ゲル )。同時に Cy3 標識 WT+SD/SD 混合 RPP 試料 12  $\mu$ g と SD/SD 型の Cy5 標識 RPP 12  $\mu$ g を上記の膨潤用緩衝液と混合後、別の IPG ストリップを膨潤させた( SD ゲル )。各 IPG ストリップを洗浄後、一次元目の等電点電気泳動( Multiphor システム、GE ヘルスケア) にかけた( 20 度、遮光下 )。各 IPG ストリップを平衡化後、二次元目の 10% または anyKd SDS ポリアクリルアミドゲル( バイオラッド ) 電気泳動にかけた。終了後、LAS4000( GE ヘルスケア) で各ゲルの Cy3 及び Cy5 蛍光画像を取得した。

#### ( 4 ) スポットの検出、定量比較法

一組の WT ゲルと SD/SD ゲルにおいて、内部標準のスポットと一致した WT スポットの内部標準スポットの強度に対する相対強

度を求めた。同時に同じペアの内部標準のスポットと一致した SD/SD スポットの内部標準スポットの強度に対する相対強度を求めた。4 組の WT 及び SD/SD 型 RPP の各スポットの相対強度を統計解析した( Student's t-test )。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) 超音波破砕法により 1 個の網膜あたり 180 ~ 230  $\mu$ g のタンパク質を得た。10 個の網膜より得たタンパク質溶液を固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーにかけて網膜タンパク質の約 15% のリン酸化タンパク質が得られ、限外濾過法により約 75~80% を回収した。

( 2 ) 二次元電気泳動の方法：野生型網膜試料を用いて pI 4-7, 7 cm の IPG ストリップの膨潤条件や一次元目の等電点電気泳動の泳動条件等を検討し、高い分離と再現性が得られようになった。質量分析による同定が可能とみられる強度のスポットが約 200 ~ 300 個得られた( 図 2A )。

( 3 ) スポットの検出、定量比較：老齢の野生型と SD 変異型マウス網膜 RPP のスポットのうち強度の強い 65 個について相対強度( A.U. ) を解析したと

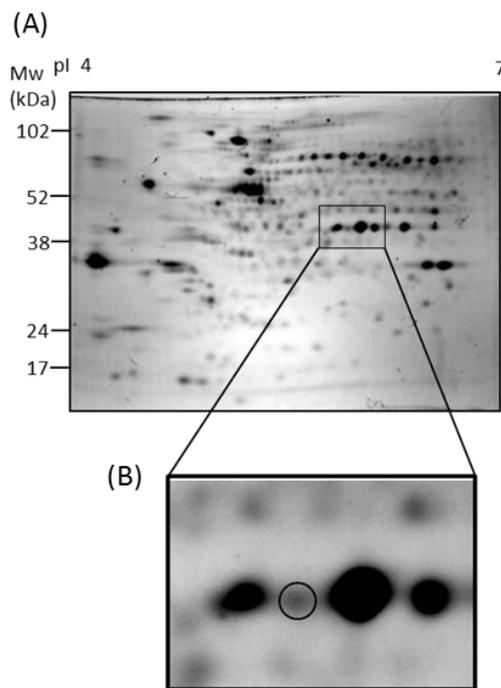


図 2 . RPP の 2D-DIGE。( A ) WT 型マウス RPP の二次元電気泳動像。( B ) スポット # 30 ( )。

ころ、推定分子量 45kDa、等電点約 6 付近の SD 変異型のスポット#30 (図 2B) のみが、野生型よりも 1.6 倍有意に増加していることが明らかになった (図 3)。

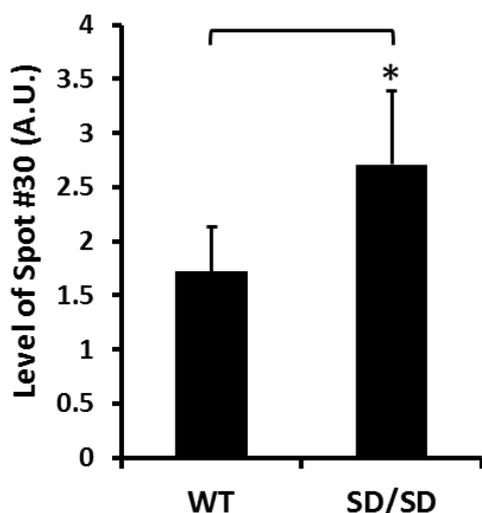


図 3 .スポット#30 の定量比較。n=4,  $P < 0.05$ .

(4) 考察、意義：本研究で確立した RPP の 2D-DIGE は高い分離と再現性が得られている。少ないスポット数の解析ながら、SD 変異型マウス網膜で有意に変動するスポットを検出した。CyDye 試薬が高価であるなど予算面の制約から質量分析によるタンパク質の同定までには至らなかったが、これらの成果は、質量分析による SD 及び SA (リン酸阻害) 変異で変動するリン酸化タンパク質同定の基盤となり、RGC 細胞死の分子的機作を明らかにするうえで重要な意義がある。

当初計画した高解像度と高い網羅性が期待される 24 cm ストリップでは、実験スペースの確保が難しく、また、現有設備では高解像度で解析できないので 7cm ストリップで行った。CyDye 二重標識の 2D-DIGE に対応した専用解析ソフトが予算面で得られないなど困難な点もあったが、大型ゲルに対応したスキャナーや解析ソフトの整備がされれば、本研究で構築した実験戦略で更に多くの変動スポットを検出できると期待される。

## 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 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 悟郎 (KATO Goro)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号：60177441

### (2) 研究分担者

( )

なし  
研究者番号：