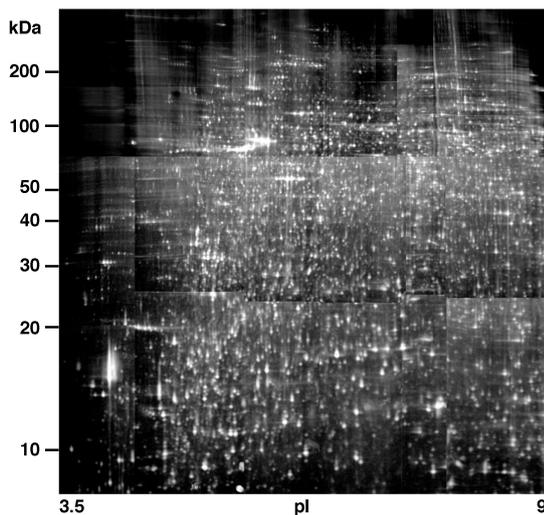


プロテオミクスを基礎にした神経細胞が非対称性を獲得する機構の解析

稲垣直之(奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科)

二次元電気泳動法は、質量分析法と組み合わせることにより組織や細胞に発現する多くのタンパク質を分離し同定することが可能であり、タンパク質の定量的解析ならびにその翻訳後修飾の解析にも威力を発揮する。また、このようなプロテオミクスは分子生物学などの従来手法では検出が困難な新しいタンパク質を検出・同定できる点に大きな魅力がある。

私達は微量タンパク質を含むできるだけ数多くのタンパク質を解析するために、6つの異なる pH レンジの 24 cm 固定化 pH 勾配ゲル (pH3.5-4.5, pH4.5-5.5, pH5.5-6.7, pH6-9) を組み合わせて一次元目の泳動を行った。また二次元目には個々の固定化 pH 勾配ゲルに対して長さ 70 cm のゲルを 2 枚、合計 12 枚泳動した。分子量 40 kDa 以上のタンパク質は 6 枚の 7.5% のポリアクリルアミドゲルで分離し、分子量 40 kDa 以下のタンパク質の分離には 6 枚の 13.5% のポリアクリルアミドゲルを用いた。そして、これら 12 枚のゲルを組み合わせることにより最終的に 93 cm x 103 cm の合成ゲルを構築した。



図はラット培養神経細胞のタンパク質を 93 cm x 103 cm の合成ゲルで分離した例を示す。感度向上のため、タンパク質を $[^{35}\text{S}]$ メチオニンおよび $[^{35}\text{S}]$ システインでラベルしたものをオートラジオグラフィーにて検出した。バックグラウンド放射能の影響を避け、微量タンパク質を検出するために、イメージングプレートと鉛のシールドに工夫を加え、2週間の感光を行なった。その結果、

約 11,000 個のスポットが検出された。検出スポット数は 18 cm x 20 cm のゲルを用いた場合の 10 倍以上である。ゲルで最も強いアクチンとチューブリンのスポットの放射性活性は 2×10^5 cpm でスポットの検出限界は 2 cpm であった。したがってこのデータにおけるタンパク質検出のダイナミックレンジは通常ゲルの 100 倍の $1 \sim 10^5$ である (*Curr. Proteomics* 1, 35-39, 2004)。また、このサイズのラージゲルでは、放射性ラベルタンパク質の添加量をさらに増やすことにより検出のダイナミックレンジを $1 \sim 10^6$ まで上げることが可能だった。また、タンパク質同定のためのゲル内消化の改善に Acid-labile surfactant (ALS) を用いた (*J. Mass Spectrometry* 39, 666-672, 2004)。

本法の応用例として、神経極性形成分子群の網羅的プロテオーム解析を紹介する。神経細胞は、始めは複数の短い突起をもつ対称な形だが、やがて成長の過程で自発的にその中の 1 本が長く伸びて対称性が破れる。長い突起はシグナルを出す軸索になり、短い突起はシグナルを受け取る樹状突起になる。巨大ゲル二次元電気泳動法を用いて神経軸索に濃縮するタンパク質 200 個を検出し、そのうち 82 個のタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。また、神経軸索形成とともに発現量が上昇する 277 個のタンパク質を検出し、そのうち 92 個を同定した。

同定された新規タンパク質のひとつ Shootin1 は、神経細胞の極性形成時に発現量が上昇し、軸索に濃縮する。極性形成時の Shootin1 の挙動をライブイメージングで解析したところ、極性形成前の細胞 (対称性を保持する状態) では、Shootin1 は複数の未成熟な神経突起の先端に、ゆらぐように濃縮と消失を繰り返すことが分った。そして、Shootin1 がある 1 本の神経突起の先端に強く濃縮すると、クラッチメカニズムにより軸索を形成し神経細胞の対称性が破れた。Shootin1 を過剰に発現させた神経細胞では、通常 1 本しか形成されない軸索が複数形成された。反対に Shootin1 の発現量を RNAi 法により抑制した細胞では、軸索の形成が阻害された。以上の結果から Shootin1 が神経細胞の非対称性獲得に重要な役割を果たすことが示唆された (*J. Cell Biol.* 175, 147-157, 2006; *J. Cell Biol.* 181, 817-829, 2008)。

私達は、神経細胞の顕微鏡ライブ画像から得られたデータをもとに、定量的な数理解析を行い、システムバイオロジーの手法を用いて神経細胞の対称性の破れの機構の解明も試みている (*Mol. Syst. Biol.* 6, 394, 2010; *Dev. Neurobiol.* 71, 584-593, 2011)。