

単一神経細胞クラスのプロテオミクス解析を実現 —線虫の神経細胞のプロテオームマップ構築に向けて—

概要

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻の植田充美 教授、青木航 同助教 (JST さきがけ兼任)、油屋駿介 同博士課程学生 (研究当時、現：九州大学生体医学防御研究所 PD)、山内悠至 同博士課程学生、橋本崇志 同修士課程学生 (研究当時) は、京都モノテックとの共同研究により、cell-selective biological orthogonal non-canonical amino acid tagging 法 (cell-selective BONCAT 法) を用いて、線虫 *Caenorhabditis elegans* の単一神経細胞クラス特異的なプロテオミクス解析を実現した。本結果は、神経細胞プロテオームマップの作成を通して、記憶など高次脳機能に関与する新規因子の発見に繋がると期待される。

本研究成果は、2020 年 8 月 13 日に国際学術誌「Scientific Reports」のオンライン版に公開された。

1. 背景

脳は、さまざまな種類 (サブクラス) の神経細胞によって構築されており、それぞれの神経細胞サブクラスは異なる機能を持っている。例えば、線虫 *C. elegans* の神経細胞ネットワークは、118 個の神経細胞クラスから成る 302 個の神経細胞によって構築されている (図 1)。線虫はさまざまな行動を示すが、その中でも例えば温度感知機構は、主に AFD 神経細胞サブクラスが担うことが知られている。

それぞれの神経細胞サブクラスの機能を理解するためには、遺伝子発現パターンを網羅的に解析することが重要である。これまでの研究では主に、RNA-seq (※1) をよって遺伝子発現パターンが解析されてきた。しかし、生命における実際の機能分子であるタンパク質の量と RNA の量は相関が低いことが知られているため、タンパク質そのものの量をプロテオミクス解析 (※2) によって定量することも重要である。

これまでの神経細胞サブクラス特異的なプロテオミクス解析では、レーザーマイクロダイセクションやフローサイトメトリーを用いて目的の細胞を濃縮する手法が使われてきた。しかしこれらの方法では、スループットが低い、単離プロセスで細胞の状態が変化する、などの問題が知られていた。そこで本研究では、細胞を単離・精製するプロセスを必要とせず、目的の細胞で発現するタンパク質のみを濃縮して分析可能とする cell-selective BONCAT 法を応用し、単一神経細胞クラスプロテオミクス解析を実現しようと試みた。

2. 研究手法・成果

神経細胞サブクラス特異的なプロテオミクス解析を行うには、目的の神経細胞サブクラスで発現しているタンパク質のみを特異的に回収し、高性能な質量分析器で分析する必要がある。そこで本研究では、Yuet らによって開発された cell-selective BONCAT 法 (Yuet *et al*, PNAS, 2015) を応用し、目的の神経細胞サブクラスで発現するタンパク質のみを特異的に回収しようと試みた (図 2)。cell-selective BONCAT 法では、phenylalanyl tRNA にアジドフェニルアラニン (azide phenylalanine, Azf) を結合させられる変異型 phenylalanyl tRNA synthetase (MuPheRS) を用いる。Azf に含まれるアジド基はアルキル基と特異的に反応するため、MuPheRS を目的の細胞のみに発現させれば、その細胞に含まれるタンパク質のみを濃縮することができる。

本研究では、全神経細胞で働く *rab-3* プロモーター、もしくは、AFD 神経細胞サブクラスのみで働く *gcy-8* プロモーターを用いて、線虫に MuPheRS を発現させた。これらの組み換え線虫に Azf を餌として与えると、

Azf が目的の細胞に取り込まれていることを確認した (図 3)。次に、全神経細胞で MuPheRS を発現させた線虫からアルキニアガロースを用いてタンパク質を回収し、それらのタンパク質をモノリス nano LC-MS/MS (※3) によるプロテオミクス解析に供したところ、4412 種類のタンパク質を同定することに成功した。同定されたタンパク質には、神経細胞で発現する多くの既知タンパク質が含まれており、目的細胞のタンパク質を濃縮できていることが示された。同定されたタンパク質のうち、局在パターンが明らかにされていなかった F23B2.10 タンパク質の局在を GFP レポーターアッセイにより確認すると、確かに神経細胞に局在していることが確認できた (図 4)。続いて、AFD 神経細胞サブクラスのみで MuPheRS を発現させた線虫を用いて、同様のプロセスでタンパク質を回収し、モノリス nano LC-MS/MS により分析した。その結果、1834 種類のタンパク質を同定することに成功し、本研究で開発した手法を用いることで、単一神経サブクラス特異的なプロテオミクス解析が可能であることが示された。

3. 波及効果、今後の予定

本研究において、cell-selective BONCAT 法を用いることで、線虫の全神経細胞および AFD 神経細胞サブクラス特異的なプロテオミクス解析を行うことに成功した。今後は本手法を拡張・発展させることで (1) 線虫の各単一神経細胞サブクラスの cell-selective BONCAT 解析によるプロテオームマップの作成、(2) 線虫神経ネットワークの高次機能に関与するタンパク質群の網羅的同定を行う予定である。それらの結果は、脳の機能を理解する上で重要な知見になると期待される。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、JST さきがけ (grant No. JPMJPR16F1)、JST CREST (grant No. JPMJCR16G2)、および JSPS 科研費 (grant No. JP17K19452) のサポートのもと推進された。

<用語解説>

※1 RNA-seq：ハイスループットシーケンサーを用いて RNA を定量する手法。

※2 プロテオミクス解析：ある細胞や組織に含まれるタンパク質群を網羅的に測定する手法。

※3 モノリス nano LC-MS/MS：シリカー体型のメートル長キャピラリーモノリスカラムを接続したナノ液体クロマトグラフィーとタンデム型質量分析器をオンラインで接続したシステム。

<研究者のコメント>

脳は、さまざまな種類 (サブクラス) の神経細胞が相互作用することで高次機能を創発する。それぞれの神経細胞サブクラスの機能を明らかにするためには、その内部で働いているタンパク質を網羅的に調べることが重要である。そこで本研究では、シンプルな神経ネットワークを持つ線虫 *C. elegans* をモデルとして、cell-selective BONCAT 法を用いることで、単一神経細胞サブクラスのタンパク質を網羅的に解析できる方法を開発した。この手法を拡張することで、線虫神経細胞のプロテオームマップの構築が可能となり、記憶など高次脳機能を制御する新規因子の発見に繋がると期待される。



青木助教



油屋研究員

<論文タイトルと著者>

タイトル：Neuronal subclass-selective proteomic analysis in *Caenorhabditis elegans*

著者：Shunsuke Aburaya, Yuji Yamauchi, Takashi Hashimoto, Hiroyoshi Minakuchi, Wataru Aoki, Mitsuyoshi Ueda

掲載誌：Scientific Reports DOI：https://doi.org/10.1038/s41598-020-70692-w

<参考図表>

図1：各神経細胞はどのようなタンパク質で発現しているのか？

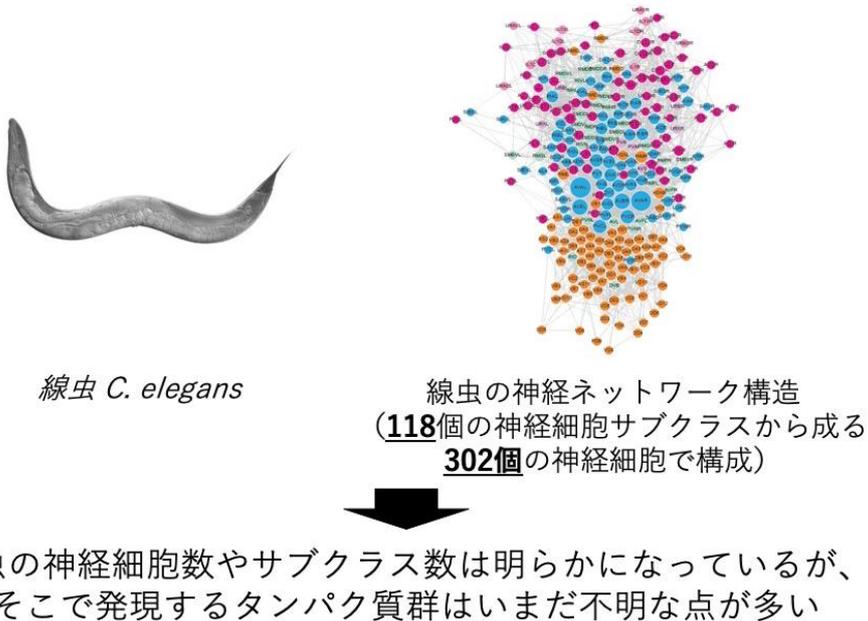


図2： cell selective BONCAT法の概要

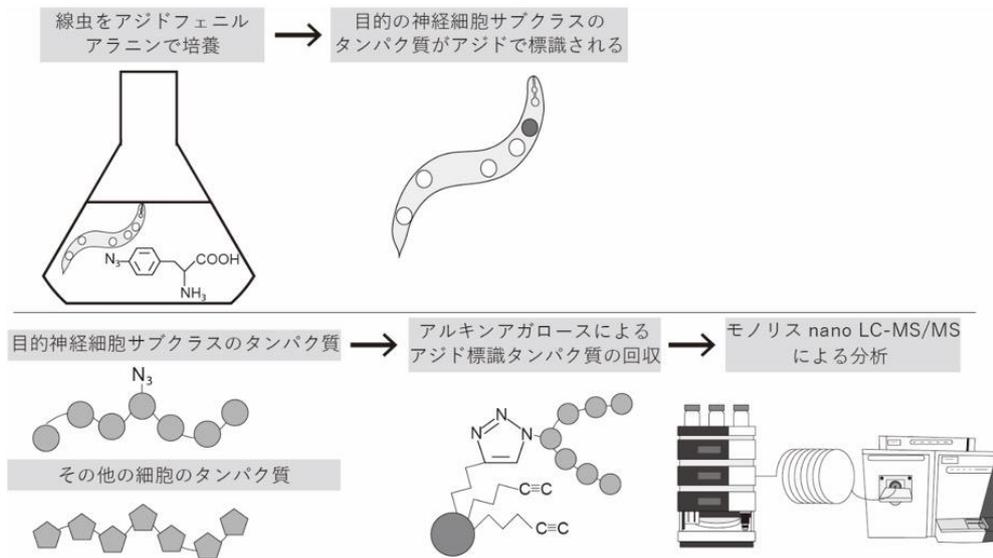
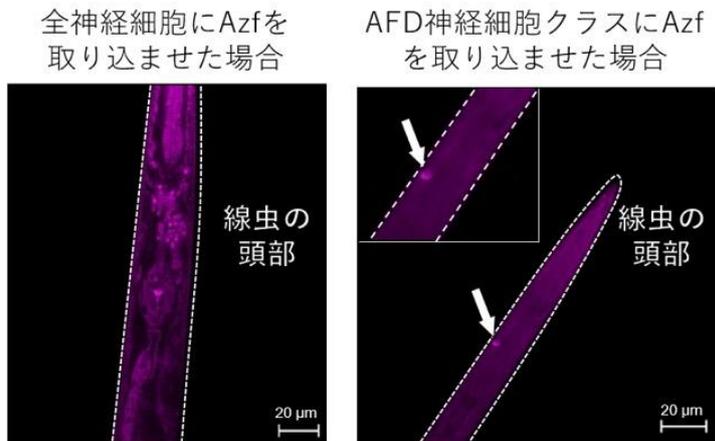


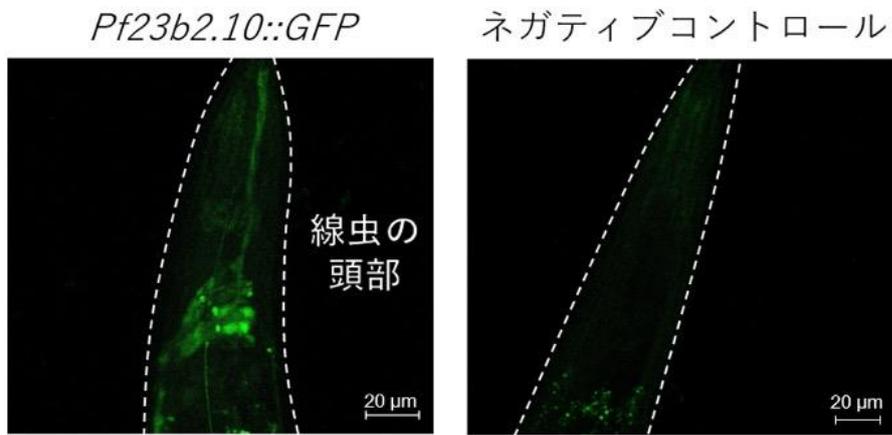
図3： Azf取り込みの確認



マゼンタ：アジド基と特異的に反応する蛍光試薬 (TAMRA-DBCO)

右図の矢印：AFD神経細胞クラス

図4：GFPレポーターアッセイ



緑：F23B2.10プロモーター由来のGFP蛍光