

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名            中村 幹昭



論 文 題 目

「定量的プロテオーム解析の応用により **Wobbler** マウスの大脳で同定した  
**annexin A6** の質的变化」

指 導 教 授 承 認 印

西 山 和 利



## 定量的プロテオーム解析の応用により

### Wobbler マウス的大脑で同定した annexin A6 の質的变化

氏名 中村 幹昭

#### 【背景】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において、運動神経が特異的に変性する病態は不明である。ALS の古典的モデルである Wobbler マウスは、ALS 類似の運動神経変性を来とし、逆行性小胞輸送関連タンパク質 VPS54 をコードする *Vps54* のミスセンス変異が同定されている。VPS54 は、ゴルジ体関連逆行性タンパク質 (GARP) 複合体のサブユニットであり、Wobbler では GARP 複合体の量が減少する。また、GARP 複合体はコレステロール輸送に関係するニーマン・ピック C 型タンパク 2 (NPC2) の後期エンドソームとリソソームへの動員に不可欠である事がわかり、Wobbler マウスではコレステロールの蓄積も報告された。これらの事から、Wobbler マウスでは VPS54 の機能喪失による、コレステロール輸送障害を中心とした小胞輸送障害が ALS の病態に関与すると考えられる。しかし、小胞輸送障害が運動神経の変性過程へ与える影響は不明である。本研究は、Wobbler マウスの ALS 病態形成に関与する小胞輸送タンパク質を中心とした新たな要因の探求を目的とし、網羅的なタンパク質の質的变化を特定しうる安定同位体標識 Tandem MS Tag (TMT) によるプロテオーム解析を Wobbler マウス的大脑で行った。

#### 【方法】

##### 1. プロテオーム解析

大腦の発現タンパク質の比較解析を 6 週齢の Wobbler マウス (Wobbler)、野生型マウス (野生型) で検討した。マウス的大脑を抽出し、トリプシン消化した。その後、TMT で各個体サンプルを標識し、高感度質量分析計で測定し、酵素消化ペプチド (以下、ペプチド) の由来となるタンパク質を同定した。測定されたペプチドはデータベースソフトウェア (Proteome discoverer) を使用して、各ペプチドの由来となるタンパク質を同定した。比較解析は TMT 標識されたペプチドの信号強度に基づき、Wobbler と野生型のピーク強度比を算出し存在比 (Wobbler/野生型比: WR/WT) を比較した。ペプチドの増減について、WR/WT>1.2 を増加ペプチド、WR/WT<0.83 を減少ペプチドと定義した。

##### 2. RT-PCR・ウェスタンブロット法

プロテオーム解析で変化を認めた annexin A6 (AnxA6) について、RT-PCR・ウェス

タンブロット法による解析を実施した。

Wobbler と野生型、それぞれの大脳から作成した cDNA を用いて PCR 法を施行した。AnxA6 の N 末端領域 (1~226) をコードする *Anxa6* の Exon1~10 の範囲でプライマーを設計し、スプライシング異常を検討した。

Wobbler と野生型の大脳抽出物を SDS-PAGE した後に、抗 AnxA6 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。抗体は AnxA6 の C 末端側をエピトープとする抗体 (C 末抗体) と N 末端側をエピトープとする抗体 (N 末抗体) の 2 種類を用い、シグナル強度の定量をおこなった (n=3)。検定は Student's t 検定を行い、有意水準は 0.05 未満とした。

### 3. AnxA6 の細胞内局在の検討

Wobbler 大脳における AnxA6 の細胞内局在を細胞分画法により検討した。Wobbler、野生型の大脳抽出物を超遠心法により細胞膜分画、細胞質分画に分画し、ウェスタンブロットによって AnxA6 の局在を確認した。また、灌流固定により作成した Wobbler の大脳切片と脊髄切片を用いて免疫組織化学染色を実施した。

### 4. AnxA6 の質的変化とコレステロール依存性の関係の検討

AnxA6 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 AnxA6 と  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性 AnxA6 に大別され、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存性 AnxA6 はコレステロール依存性 AnxA6 に相当する事が判明している。AnxA6 の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性と N 末端の質的変化があるかを確認するため、方法 3. の細胞膜分画に  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートする EDTA を添加し、超遠心法で分画し、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性 AnxA6 分画と  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性 AnxA6 分画を得た。各分画を方法 2. で用いた AnxA6 の C 末抗体、N 末抗体の 2 種類の抗体を用いたウェスタンブロットで確認した。

## 【結果・考察】

### 1. Wobbler マウス大脳のプロテオーム解析

5,432 種のタンパク質に由来する 25,576 ペプチドを同定し、Wobbler では 360 ペプチドが増加し、314 ペプチドが減少していた。減少ペプチドの中で  $\text{WR/WT}=0.12$ 、 $0.19$  と著明に低下している 2 ペプチドが存在し、このペプチド断片は、AnxA6 に由来した。AnxA6 に由来するペプチドは 22 ペプチドが同定されたが、減少しているペプチドは、上記の 2 ペプチドのみであり、これは、AnxA6 の N 末端側近傍の配列由来ペプチドであった。Wobbler で AnxA6 の N 末端側の一部の存在比が低下した理由として、①翻訳後修飾や構造変化などの質的変化が起きた可能性、②AnxA6 の N 末端側をコードする mRNA に選択的スプライシング異常が起きた可能性を考え、①には抗 AnxA6 抗体を用いたウェスタンブロットによる検討、②には N 末端側をコードするエキソン領域の PCR プライマーを用いたスプライシング異常の検討を施行した。ウェスタンブロットの検討では、C 末抗体を用いたウェスタンブロットで、野生型と Wobbler のシグナルに有意差は認められず、タンパクの発現量は Wobbler でも維持さ



れている事が示された。しかし、N 末抗体を用いた場合は、Wobbler では野生型と比較して有意にシグナル強度に変化が認められた（シグナル強度比=0.74）。さらに、どちらの抗体を用いた解析でも、Wobbler で明らかなバンドシフトは起こしていなかった。PCR の結果、野生型と Wobbler でスプライスアウトされたバンドは認めなかった。このため、Wobbler における AnxA6 の変化はスプライシング異常が原因ではないことが明らかになった。このことから、Wobbler の AnxA6 の N 末端側近傍の変化は、スプライシング異常ではない複数の質的变化によって生じていると考えられた。

## 2. AnxA6 の細胞内局在の検討

AnxA6 の質的变化と関連する機能を検索するため、AnxA6 の細胞内局在を解析した。大脳抽出物を細胞膜分画、細胞質分画に分画し、ウェスタンブロットを実施し、野生型では AnxA6 は細胞膜分画と細胞質分画に存在したが、Wobbler では大部分が細胞膜分画に局在した。また、免疫組織化学染色による検討でも、脊髄の前角細胞で AnxA6 は細胞質と細胞膜で認められたが、Wobbler では細胞膜にのみ局在した。

## 3. AnxA6 の質的变化とコレステロール依存性の関係

Ca<sup>2+</sup>依存性 AnxA6 分画と Ca<sup>2+</sup>非依存性 AnxA6 分画のウェスタンブロットでは、野生型、Wobbler 共に Ca<sup>2+</sup>依存性 AnxA6 分画で C 末抗体と N 末抗体のシグナル強度に変化がなかったが、Wobbler では、Ca<sup>2+</sup>非依存性 AnxA6 分画で N 末抗体のシグナル強度が著しく低下していた。Ca<sup>2+</sup>非依存性 AnxA6 はコレステロール依存性 AnxA6 である事が知られているため、Wobbler の AnxA6 の質的变化は、コレステロール依存性 AnxA6 で特に顕著である事が明らかになった。以上の結果から、Wobble ではコレステロールの凝集により AnxA6 の細胞膜への局在変化が進行し、コレステロール依存性 AnxA6 に質的变化が加わり、AnxA6 の機能低下や神経細胞変性を引き起こす可能性が示唆された。

### 【結論・課題】

Wobbler マウスでは AnxA6 の細胞内局在が変化し、大部分が細胞膜に分布するとともに、AnxA6 の N 末端近傍に複数の質的变化が存在する事を発見した。質的变化がコレステロール依存性 AnxA6 に集中し、VPS54 の機能喪失によるコレステロール凝集により惹起されるとともに、AnxA6 の機能変化を与え、この変化が神経の変性へ影響を与えている可能性が示唆された。AnxA6 の N 末端近傍の質的变化の実態が解明できなかった事が本研究の課題である。質的变化は翻訳後修飾である事が予想され、追加の検討を実施し、AnxA6 の変化が ALS 病態に与える影響を追求する。