

# 学位論文

## Doctoral Thesis

融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制タンパク質の神経系細胞内

発現抑制を介した異常シグナル分子群の解析

(Analysis of abnormal cellular signals via silencing of NF1 tumor suppressor protein in neuronal cells by integrated proteomics)

平山 未央

Mio Hirayama

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腫瘍医学

指導教員

荒木 令江 准教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腫瘍医学

2013年3月

# 学 位 論 文

## Doctoral Thesis

融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制タンパク質の神経系細胞内発現抑制  
を介した異常シグナル分子群の解析  
(Analysis of abnormal cellular signals via silencing of NF1 tumor  
suppressor protein in neuronal cells by integrated proteomics)

著 者 名 : 平山 未央  
Mio Hirayama

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腫瘍医学 荒木 令江 准教授

|         |               |       |
|---------|---------------|-------|
| 審査委員名 : | 細胞情報薬理学分野担当教授 | 中西 宏之 |
|         | 分子生理学分野担当教授   | 富澤 一仁 |
|         | 幹細胞誘導学分野担当教授  | 江良 択実 |

2013 年 3 月

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 1. 目次  | 1  |
| 2. 要旨  | 3  |
| 3. 発表論文リスト   | 5  |
| 4. 謝辞  | 6  |
| 5. 略語一覧  | 7  |
| 6. 研究の背景と目的  | 8  |
| 6-1. 神経線維腫症 I 型(Neurofibromatosis type1 / von Recklinghausen disease)について          |    |
| 6-2. 神経線維腫症 I 型の臨床症状   |    |
| 6-3. 神経線維腫症 I 型の発生頻度、遺伝形式  |    |
| 6-4. NF1 遺伝子の構造と機能   |    |
| 6-5. NF1 における学習障害とモデル細胞での研究  |    |
| 6-6. Dynein 複合体の輸送について   |    |
| 6-7. プロテオーム解析について  |    |
| 6-8. 本研究の目的  |    |
| 7. 実験方法  | 15 |
| 7-1. 細胞培養、トランスフェクション、NGF 刺激、細胞回収   |    |
| 7-2. RNA 単離・マイクロアレイ解析  |    |
| 7-3. 蛍光標識二次元電気泳動 Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE)、<br>画像解析 |    |
| 7-4. Spot 切りだし、ゲル内消化、タンパク同定  |    |
| 7-5. ProQ-Diamond 染色によるリン酸化タンパクの検出   |    |
| 7-6. iTRAQ サンプル調製と標識反応   |    |
| 7-7. サンプル分画と脱塩   |    |
| 7-8. LC-MALDI-MS/MS Analysis   |    |
| 7-9. LC-ESI-MS/MS Analysis   |    |
| 7-10. iTRAQ データ解析  |    |
| 7-11. 融合プロテオミクスのデータ解析とネットワーク解析   |    |
| 7-12. siRNA  |    |
| 7-13. Western blotting   |    |
| 7-14. Auto-2D を用いた 2D-ウエスタンブロッティング法  |    |
| 7-15. Neurite outgrowth analysis   |    |
| 7-16. 免疫細胞染色   |    |
| 7-17. 核・細胞質タンパクの分画   |    |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 8.  | 実験結果 -----   | 24 |
|     | 8-1. NF1 病態モデル細胞の作成  |    |
|     | 8-2. 2D-DIGE の結果   |    |
|     | 8-3. iTRAQ (8-Plex) analysis の結果   |    |
|     | 8-4. DNA array の結果   |    |
|     | 8-5. iPEACH を用いたプロテオームとトランスクリプトームデータの統合                                  |    |
|     | 8-6. Pathway Based Gene Ontology (GO)解析                                  |    |
|     | 8-7. ネットワーク解析  |    |
|     | 8-8. 融合プロテオミクス解析により抽出された NF1 ノックダウン細胞特異的活性化<br>ネットワークを構成する分子群の細胞生物学的検証実験 |    |
|     | 8-8-1. Dynein IC2 のスプライシングとリン酸化による変動                                     |    |
|     | 8-8-2. NF1 ノックダウンによる COX-1 および GR の発現の変化                                 |    |
|     | 8-8-3. NF1-KD 細胞における Dynein IC2-C の機能解析                                  |    |
|     | 8-8-4. Dynein IC2-GR-COX-1 のネットワークの検証                                    |    |
|     | 8-8-5. NF1-KD 細胞における COX-1 の機能解析   |    |
| 9.  | 考察 -----   | 49 |
|     | 9-1. 融合プロテオミクス法による NF1 病態モデル細胞の解析について                                    |    |
|     | 9-2. NF1 ノックダウン細胞における DyneinIC2 の挙動                                      |    |
|     | 9-3. NF1 ノックダウン細胞における GR の挙動   |    |
|     | 9-4. NF1 ノックダウン細胞における COX-1 の挙動  |    |
|     | 9-5. NF1 ノックダウン細胞において亢進していた Dynein IC2-GR-COX-1 signal について              |    |
|     | 9-6. Dynein-GR-COX-1 シグナルと神経系における neurofibromin の関与について                  |    |
|     | 9-7. neurofibromin の機能と neurofibroma formation における微小環境について              |    |
| 10. | 結語 -----   | 55 |
| 11. | 参考文献 -----   | 56 |

## 2. 要旨

【目的】神経線維腫症 I 型 (NF1) は、多発性神経線維腫や色素斑を始め多彩な病態を呈す常染色体優性遺伝性疾患である。NF1 の原因遺伝子産物 Neurofibromin は Ras-GAP 相同領域を有しており、その機能欠損による Ras を介した細胞内シグナル伝達異常は、神経系細胞の増殖と分化異常を誘発し、更に腫瘍化など NF1 の重篤な病態に関わるとされている。しかしながら、Ras-GAP の機能のみでは NF1 の多様な病態を説明できないため、NF1 の病態発症機構は、未だ不明な点が多く、本疾患の根治療法は存在しない。本研究では、NF1 病態モデル PC12 細胞を用いて、独自の融合的 mRNA/タンパク質網羅的発現解析(融合プロテオミクス)を行うことで Neurofibromin の細胞内機能とその欠損による神経系細胞異常分化・増殖機構の解明を目的とした。

【方法】神経系モデル細胞である PC12 細胞に RNA 干渉法によって NF1 遺伝子発現を抑制した NF1 病態モデルを作成した。本モデルを用いて、神経成長因子(NGF)添加による神経細胞様分化過程における経時的遺伝子およびタンパク質の発現変動を、DNA array 法、蛍光標識二次元ディファレンシャル電気泳動法(2D-DIGE)、および iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 法を用いて網羅的に解析した。得られた全データを統合解析ソフト iPEACH によって統合し、コントロール細胞と比べて NF1 病態モデル細胞において発現変動している分子群の抽出を行い、分子間ネットワーク解析を行った。抽出したシグナルの構成因子に対し、NF1 欠損細胞における挙動の検証と表現型に対する影響を解析した。

【結果】NF1 病態モデル細胞では神経突起の伸長阻害という特徴的な表現型が見られ、また細胞運動の亢進が観察された。融合プロテオミクス解析によって定量的に同定された 3239 分子群から、NF1 siRNA 処理によって有意に発現上昇した分子をネットワーク解析した結果、Dynein IC2、GR、COX-1 の発現変動を含む一連のシグナルネットワークが検出され、これらの分子相互作用が重要であることが推測された。次に NF1 病態モデル細胞において Dynein IC2、GR、COX-1 の発現亢進をウエスタンブロット法で確認し、GR アンタゴニスト、Dynein IC2 siRNA、COX-1 siRNA により本経路の構成分子の発現や機能を阻害したところ、Dynein IC2 が GR の核輸送に関与しており、核移行した GR が転写因子として機能した結果、COX-1 の転写が誘導されていることが判明した。さらに、NF1 欠損 PC12 細胞において本経路の最下流因子である COX-1 の発現を抑制したところ、神経突起伸長阻害が回復し、分化異常が正常化することが判明した。

【考察】本研究では、NF1 ノックダウンに伴う神経系細胞分化異常に連動して変動する分子群の挙動を明らかにした。NF1 欠損 PC12 細胞で上昇していた Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルの慢性的な亢進は、プロスタグランジン産生を増大することで、神経線維腫症 I 型に

特徴的な神経系細胞の分化や増殖の異常を誘発している可能性が示唆された。

【結論】NF1 病態モデル細胞において特異的に亢進する新規分子ネットワークを融合プロテオミクス法によって発見し、NF1 病態発症メカニズムの一旦を明らかにした。本発見は、治療法のない本疾患における新規の治療法開発や創薬に貢献できるものと考えられる。

### 3. 発表論文リスト

1. Mio Hirayama, Daiki Kobayashi, Souhei Mizuguchi, Takashi Morikawa, Megumi Nagayama, Uichi Midorikawa, Masayo M. Wilson, Akiko N. Nambu, Akiyasu C. Yoshizawa, Shin Kawano, and Norie Araki

Integrated proteomics identified novel activation of dynein IC2-GR-COX-1 signaling in NF1 disease model cells *Mol. Cell. Proteomics* (in press)

2. Akiko Niibori-Nambu, Uichi Midorikawa, Souhei Mizuguchi, Takuichiro Hide, Minako Nagai, Yoshihiro Komohara, Megumi Nagayama, Mio Hirayama, Daiki Kobayashi, Nobuyuki Tsubota, Tatsuya Takezaki, Keishi Makino, Hideo Nakamura, Motohiro Takeya, Junichi Kuratsu, Norie Araki

Glioma initiating cells form a differentiation niche via the induction of extracellular matrices and integrin alphaV. *PLOS ONE* (in press)

#### 4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧な御指導をいただきました熊本大学生命科学研究部腫瘍医学分野 荒木令江准教授に深く感謝いたします。また、NF1 グループとして実験や論文執筆のご指導、ご援助いただきました小林大樹博士に心から感謝いたします。

博士論文研究において研究面で様々なご指導をいただきましたウィルソン政代博士、水口惣平博士、南部晶子博士、森川崇氏、緑川宇一氏、また技術面でご援助をいただきました長山慈氏、永井美奈子氏に深くお礼を申し上げます。プロテオミクスデータ統合に関してご援助いただきました、統合データベースセンター 河野信博士、京都大学 吉沢明康博士に御礼申し上げます。最後に研究生生活において事務的業務のご援助いただきました中村真理氏、田上和江氏、緑川千晶氏に深くお礼を申し上げます。



## 5. 略語一覽

2D-DIGE: two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis

iTRAQ: isobaric tagging for relative and absolute quantitation

ACN: acetonitrile

iPEACH: Integrated Protein Expression Analysis Chart

GRD: Ras GTPase-activating protein related domain

NGF: nerve growth factor

CRMP-2: collapsing response mediator protein-2

GO: gene ontology

MANGO: Molecular Annotation by Gene Ontology

LC: liquid chromatography

QqTOF: quadrupole/quadrupole/time-of-flight mass spectrometers

MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization

Dynein IC: Dynein intermediate chain

GR: glucocorticoid receptor

COX-1: cyclooxygenase-1

siRNA: short interfering RNA

ICC: immunocytochemistry

IEF: Isoelectric focusing

MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumor

PGE: prostaglandin E

## 6. 研究の背景と目的

### 6-1. 神経線維腫症 I 型(Neurofibromatosis type1 / von Recklinghausen disease)について

神経線維腫症 I 型は、全身に多発する神経線維腫とカフェ・オ・レ斑と呼ばれる色素斑を特徴とする多彩な症状を呈する遺伝性疾患である。1882 年に Friedrich Daniel von Recklinghausen が本疾患を報告したことにより、以後レックリングハウゼン病と呼ばれるようになった。その後多くの報告により、従来の古典的レックリングハウゼン病とは異なり、両側性に生じる聴神経腫瘍を特徴とする神経線維腫症 II 型(NF2)と区別して定義するようになった。NF1 は 1990 年に、NF2 は 1993 年にクローニングされ、異なる責任遺伝子による疾患であることが明らかとなった(1)。

### 6-2. 神経線維腫症 I 型の臨床症状

NF1 の臨床症状は多彩で、皮膚および神経に生じる多発性の神経線維腫、カフェ・オ・レ斑をはじめ中枢・末梢神経腫瘍形成、虹彩小結節(Lisch nodule)、骨変化(脊椎側弯、顔蓋・顔面骨の欠損、四肢の変形・骨折)、学習・記憶障害などを特徴とする。皮膚の神経線維腫は思春期頃より全身に多発する。末梢神経内の神経線維腫(nodular plexiform neurofibroma)、びまん性の神経線維腫(diffuse plexiform neurofibroma)が見られることもある。また、多発性神経線維腫は時に悪性化することが知られており、悪性末梢神経鞘腫瘍(Malignant peripheral nerve sheath tumor: MPNST)と呼ばれている。Table 1 に主な症状と初発時期、Table 2 に神経線維腫 I 型の診断基準を示した(文献(2)より引用)。

Table 1 神経線維腫症 I 型の主な症状と初発時期

| 症候          | 合併頻度(%) | 初発時期 |
|-------------|---------|------|
| カフェ・オ・レ斑    | 95      | 出生時  |
| 皮膚の神経線維腫    | 95      | 思春期  |
| 神経の神経線維腫    | 20      | 学童期  |
| びまん性神経線維腫   | 10      | 学童期  |
| 雀卵斑様色素斑     | 95      | 幼児期  |
| 視神経膠腫       | 1       | 小児期  |
| 虹彩小結節       | 80      | 小児期  |
| 脊椎の彎曲       | 10      | 学童期  |
| 四肢骨の変形・骨折   | 3       | 乳児期  |
| 頭蓋骨・顔面骨の骨欠損 | 5       | 出生時  |

Table 2 神経線維腫症 I 型の診断基準

| 神経線維腫 I 型の診断基準                                   |
|--|
| 6個以上のカフェ・オ・レ斑<br>(思春期まででは直径0.5cm以上、それ以後は1.5cm以上) |
| 腋窩あるいは鼠蹊部の雀卵斑様色素斑                                |
| 2個以上の神経線維腫(皮膚の神経線維腫や神経の神経線維腫など)、1個以上のびまん性神経線維腫   |
| 2個以上の虹彩小結節                                       |
| 特徴的な骨病変の存在                                       |
| 家系内に同症   |

上記 6 項目のうち、2 項目以上該当すると本症と診断する。

### 6-3. 神経線維腫症 I 型の発生頻度、遺伝形式

神経線維腫症 I 型の発生頻度は非常に高頻度で、3-4000 人に 1 人の割合で生じ、本邦の患者数はおよそ 4 万人と推定されている。遺伝形式は常染色体優勢遺伝である。しかし本邦における遺伝歴のある NF1 患者は約 30%であり、突然変異による NF1 発生率が 70%と高く、半数以上の NF1 症例において両親は健常である(孤発性)。なお、突然変異における NF1 の発生率は 8000 出産に 1 人とされている(1, 3, 4)。

### 6-4. NF 1 遺伝子の構造と機能

NF1 遺伝子は 17q 11. 2 上に存在することが同定され、1990 年にクローニングされた(5)。ゲノム DNA 上、約 350kb におよぶ巨大な遺伝子でこれまで、エクソン 9a,23a,48a 3 つの選択的スプライシング部位を含め、合計 60 のエクソンが確認されている。mRNA の大きさは 11-13kb で 2818 アミノ酸をコードしている。その遺伝子産物である neurofibromin は約 250kDa のタンパク質で、mRNA レベルではほぼ全ての臓器に、タンパクレベルでは脳、脊髄、副腎に多く発現していることが知られている(4)。

Neurofibromin は四つのドメインからなっており、N 末端側から、CSRD(cysteine/serine-rich domain)領域、GRD(GAP related domain)領域、Sec PH 領域、CTD(C-terminal domain)である(Fig. 1)。Neurofibromin の中央部にある 360 アミノ酸領域は mammalian Ras GTPase-activating protein (p120Ras-GAP)及び酵母の GAP 類似タンパク IRA1、IRA2 と高い相同性を示すことから、NF1-GAP related domain(NF1-GRD)と呼ばれている。また、neurofibromin には GRD 領域にスプライシングサイトがあり、2

つのアイフォーム(GRD-type1 及び GRD 領域に 21 アミノ酸(exon23a)の挿入がある GRD-type2) が存在することが報告されており(6)、GRD-type2 は GRD-type1 と比べて GAP 活性が有意に低い。また、GRD-type1 はニューロンに豊富に発現しており、GRD-type2 はグリア細胞に多く発現しているという特徴がある(6)。

細胞内で Ras は不活性な状態である GDP 型で存在するが、成長因子等の刺激が起こることにより、受容体が活性化し、GEF が活性化状態である Ras-GTP 型に変換し、様々なシグナルを伝える役割を果たしている。活性化した Ras は自身を持つ GTPase 機能により不活性型に戻るが、この時 GAP が結合することにより、Ras の GTPase 能を増強し、すみやかに不活性型に戻る。Ras を負に制御する GAP 機能が損失することにより細胞増殖等が誘発されると考えられており、neurofibromin は癌抑制遺伝子と呼ばれている(7, 8)。従って、neurofibromin の欠損や異常による機能の喪失により Ras および Ras effector の活性亢進をきたし、過剰な細胞増殖等を誘導することが NF1 の腫瘍形成をはじめとする多彩な症状の一因と考えられている(Fig.1)。

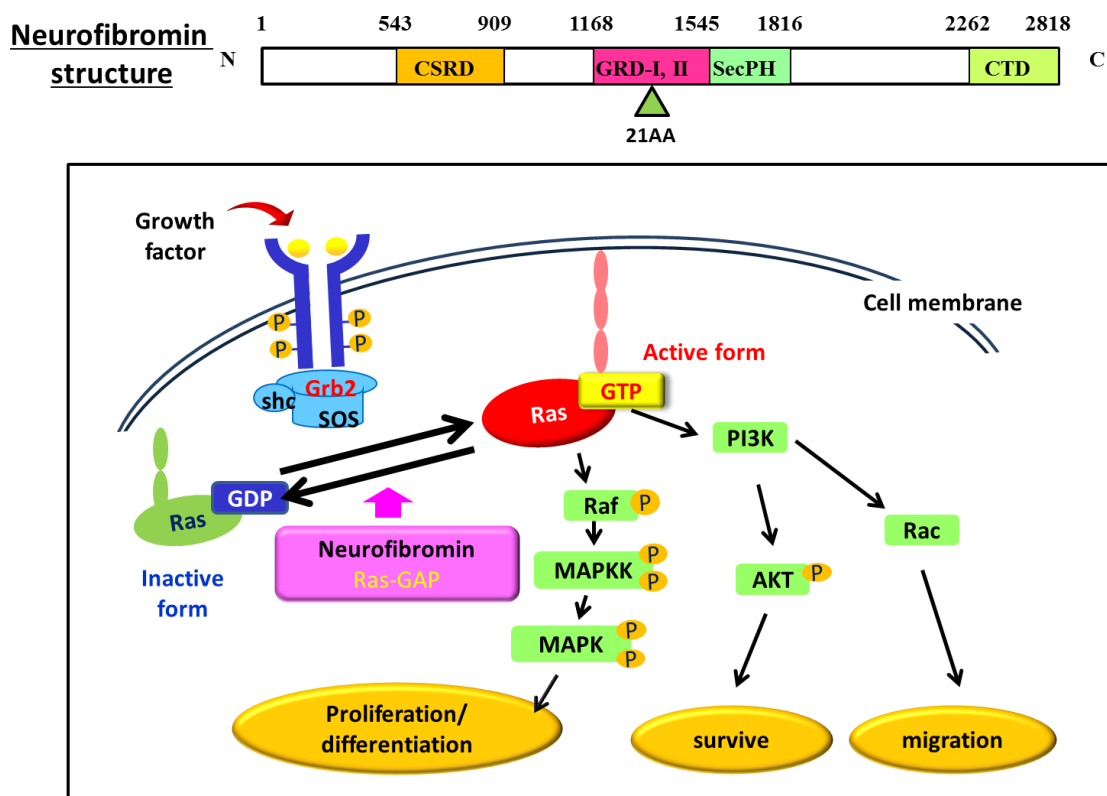


Fig.1 neurofibromin の一次構造と調節されるシグナル

## 6-5. NF1 における学習障害とモデル細胞での研究

NF1 の病態の一つに学習・記憶障害があり、約 30-65%の人に生じていると報告されており(9)、NF1 ノックアウトマウスや siRNA を用いた NF1 ノックダウン細胞を用いた原因究明の研究が行われている。Nf1(+/-)マウスは Morris water maze test の結果より空間把握能力の欠如や学習機能障害が見られ(10)、GRD 領域(exon21-27a)の中に存在する exon23a の欠損マウス Nf1<sup>23a</sup>(-/-)でも学習記憶障害が見られる(11)。これらのマウスは正常マウスより長い訓練によってその障害は改善することが報告されている(11)。また Nf1(+/-)マウスにロバスタチンを処理することにより脳での MAPK の活性化を阻害し、学習記憶障害が改善したという報告もある(12)。従って、過剰な Ras-MAPK の活性化が NF1 の症状である学習記憶障害を引き起こす一因になると考えられている。

当研究室では、ラットの副腎髄質由来褐色細胞腫である PC12 細胞を用いて neurofibromin の機能解析を行っており、以前の研究では neurofibromin は Ras-GAP の機能を通じて神経分化を制御することを示した。PC12 細胞において NGF(神経成長因子)刺激による Ras 活性依存的な神経突起伸長が誘導される際、Ras 活性の上昇が引き金となり、NF1-GRD type1 の発現誘導に基づく NF1-GAP 活性の上昇が見られ、これが Ras に対する負のフィードバックになり、活性抑制に寄与していたことを報告している(13)。また、neurofibromin の C 末端領域で CRMP-2 (Collapsin response mediator protein-2)と結合し、そのリン酸化を制御することで、神経突起の伸長の調節を行っていることが判明している(14)。すなわち、CRMP-2 は neurofibromin の C 末端に結合しており、PC12 細胞に NF1 siRNA を処理し、control 細胞と比較した結果、CRMP-2 のリン酸化が Ras の下流に存在する Cdk5、GSK3 $\beta$ 、RhoK によって促進されて CRMP-2 が不活性型となり、神経突起伸長が阻害されることがわかった。このように、神経系のモデル細胞である PC12 細胞を用いることで神経突起伸長に注目した表現型を評価できることから、NF1 の病態モデルとして有用であると考えられる。

## 6-6. Dynein 複合体の輸送について

通常、タンパク質は粗面小胞体で生合成後修飾を受け、そのタンパク質が働くべき場所に輸送されることでその機能を発揮している。神経細胞は細胞体や樹状突起、軸索から構成されるがタンパク質は細胞体のみで合成され、樹状突起や軸索のタンパク質は微小管を介してモータータンパク質である Kinesin と Dynein によって輸送される。Kinesin は軸索中で細胞小器官やタンパク質を神経細胞の細胞体から軸索末端へ微小管のプラス方向に向

かって運び、Dynein は微小管のマイナス方向へと向かう。

Dynein はサブユニットを形成しており、微小管と接してモーター部位として機能する heavy chain、積荷タンパク質との結合に関与している intermediate chain、intermediate chain の機能を調節する light chain などで構成されている(15)。これらのサブユニットが結合し、複合体を形成することで微小管を介した輸送が行われ(16, 17)、サブユニット機能が欠損すると正常に輸送ができなくなることが報告されている(18)。タンパク質や細胞小器官を含む輸送小胞を運ぶ時は、p150Glud、dynamitin などから構成される dynactin 複合体と Dynein が結合して輸送を行う(19)。一方 Dynein は核輸送にも関わっており、核輸送時は dynamitin と FKBP タンパク質を介して結合し、積荷を載せて微小管上を移動する。Dynein 複合体が輸送する積荷タンパク質には GR、MR がある。GR はホルモン受容体の一つで、リガンド非結合時は HSP や FKBP51 などのシャペロンタンパク質にホールドされて細胞質中に存在しているが、リガンドが細胞内に入り、GR と結合すると FKBP51 が FKBP52 へとスイッチングし、GR の構造が変化することにより核移行シグナルが露出する。また GR 複合体の中の FKBP52 は dynamitin と結合し、さらに Dynein intermediate chain と結合することで GR は Dynein 複合体と結合し、核膜孔付近まで輸送される(20)。従って、Dynein は細胞が正常に機能する上で非常に重要なタンパク質であることがわかる。

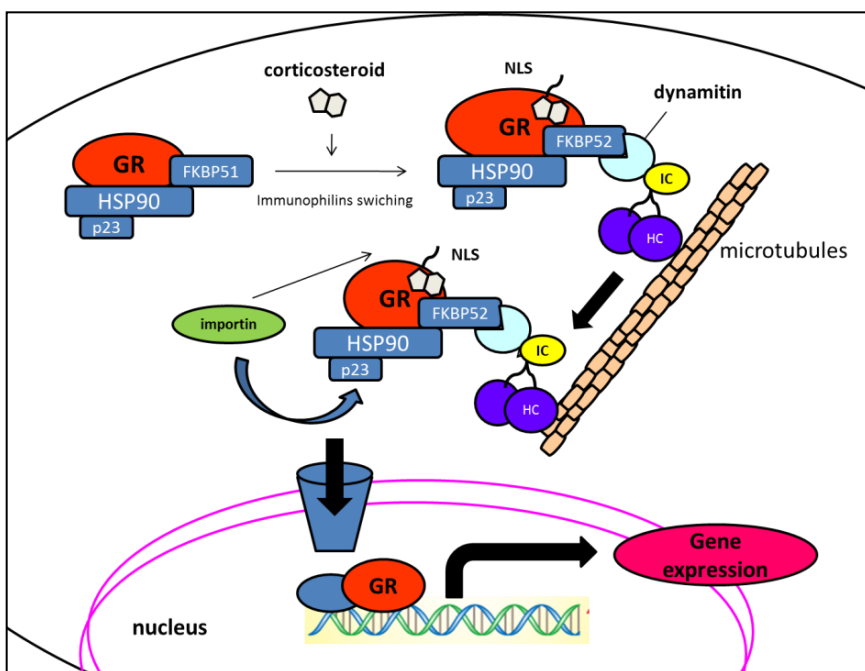


Fig.2 Dynein 複合体による GR の細胞質—核間輸送

## 6-7. プロテオーム解析について

近年、分子生物学の発展とともに塩基配列決定の速度は著しく上昇し、2003年4月にヒトゲノムの完全配列解読完了宣言がなされ、人類は膨大な遺伝子情報を手に入れることができた。しかし塩基配列の情報が多くなるに従い、DNAの解析だけでは遺伝子翻訳産物であるタンパク質の多様化した機能を説明できないことが明らかとなった。そのため、ゲノム情報の有用な利用のためには、タンパク質とそれをコードする遺伝子との対応を明らかにし、タンパク質の生化学ならびに物理化学的特性を解析し、全ての遺伝子翻訳物についての機能を解明する研究が必要である。これらの研究は、「プロテオーム解析」と呼ばれ、ポストゲノム研究の一つとして注目を浴びている。

プロテオーム解析の代表的な手法は、二次元電気泳動法と液体クロマトグラフィー(LC)を用いたショットガンプロテオミクスである。前者はタンパクサンプルを等電点と分子量において二次元展開することでタンパク質を分離し、目的のタンパク質をゲルから抽出し、酵素消化後に質量分析計で同定を行うものであり、後者はタンパクサンプルごと酵素消化し、生じたペプチド断片をLCで分離後、質量分析で同定するものである。安定同位体を用いてペプチド断片を標識する iTRAQ 法は異なるサンプルを一度に、また比較定量解析ができるため非常に有用である。しかしながら、各プロテオミクス手法を用いて解析を行った場合でも、タンパク質の特性によっては一つの手法だけでは検出されないものが存在するため、本研究ではタンパク質の変動を二次元電気泳動、iTRAQ 法また DNA array を用いて mRNA の変動を捉え、それらを融合することで分子の変動を総合的に捉える解析法である融合プロテオミクス解析を行った。

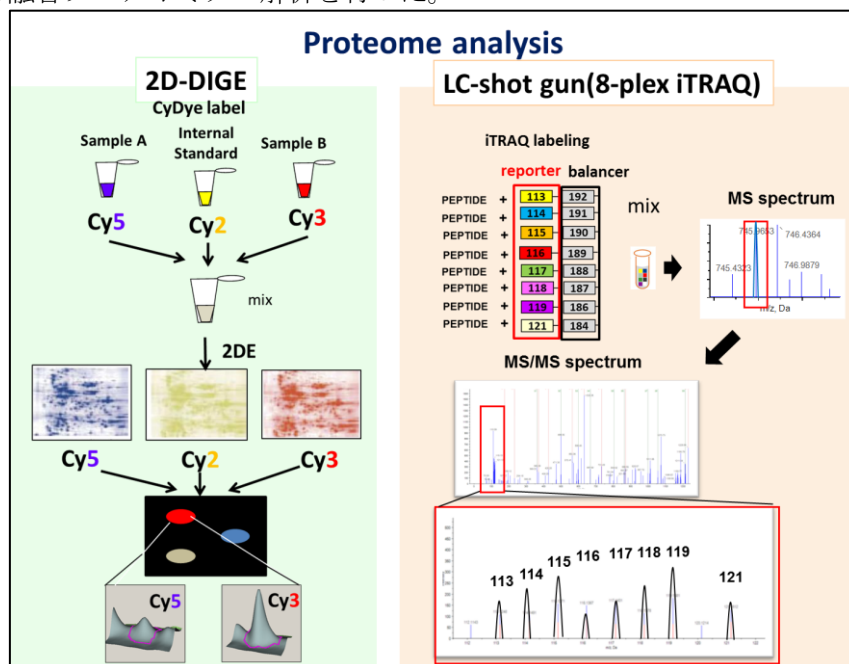


Fig.3 プロテオミクス解析(2D-DIGE、iTRAQ法)の概要

## 6-8. 本研究の目的

Neurofibromin の細胞内機能と病態との関連性の研究については、Ras-MAPK 経路 を經由することで Ras の下流の分子群の変動によって細胞増殖が亢進し、多発性神経線維腫症や様々な NF1 に関わる病態の発症に関与していると考えられているが、多様な病態発症機構の解明には至っていない。また分子量が大きな neurofibromin には Ras-GAP としての機能だけではなく、新たな機能が存在する可能性も考えられる。

本研究では、neurofibromin の細胞内機能とその欠損による NF1 の病態(学習機能障害/神経線維腫形成等)の関連性を明らかにするために、NF1 病態モデル PC12 細胞を用いた融合プロテオミクス法によって、神経細胞様分化過程において病態細胞内で起こる異常なシグナルを検出することを目的とした。



## 7. 実験方法

### 7-1. 細胞培養、トランスフェクション、NGF 刺激、細胞回収

実験に用いたラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 は ATCC(HTB-37TM)から購入した。PC12 細胞は 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で DMEM (Invitrogen)に 10% ウマ血清、5% ウシ胎児血清を添加したものをを用いて継代培養を行った。

siRNA 導入はエレクトロポレーション法を選択し、トランスフェクションは Neon transfection system (Invitrogen)を用い、プロトコール通りに行った。トランスフェクションの電圧の条件は、1100 V, 20 ms, 2 times で行った。siRNA 導入後、PC12 細胞はコラーゲン I 型コート dish (IWAKI)に播種し、24 時間後に 50 ng/ml の 2.5S NGF (Wako)を用いて刺激を行った。NGF 刺激後、細胞は PBS (phosphate-buffered saline)で二回洗い、可溶化バッファー (8 M urea, 2% CHAPS, 1 mM DTT, 10 mM sodium fluoride, 2 mM sodium orthovanadate, 1 μM okadaic acid, 1% protease inhibitor mixture (Sigma))で可溶化を行い、lysate を回収した。Lysate は 25 ゲージのシリンジで 20 回貫通させた後、4 °C、20,000 x g で 15 分遠心を行い、回収した上清をサンプルとした。タンパクサンプルの濃度は protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad)を用い、Bradford 法にて濃度測定を行った。

### 7-2. RNA 単離・マイクロアレイ解析

Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いてプロトコール通りに細胞から回収した。単離した RNA は Nano Drop ND1000 (Thermo Scientific)で濃度を測定し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)を用いて精度を測定した。

次に 3' IVT express kit (Affymetrix)を用いて total RNA から二重鎖相補 DNA (cDNA)と標識した(cRNA)を合成し、Affymetrix Rat 230 2.0 gene chips (Affymetrix) にハイブリダイズした。これらの Gene Chip は Gene Chip Scanner 3000 でスキャン後、発現解析を行った。

### 7-3. 蛍光標識二次元電気泳動 Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE)、画像解析

PC12 lysateは2D-clean up kitを用いて脱塩・濃縮し、lysis buffer (8 M urea, 2 % CHAPS, 30 mM Tris-HCl (pH 8.5))に再溶解した。50 µgの各サンプルは400 pmolのCy3又はCy5色素で標識した。また異なるゲル間の統計解析を行うために、全てのサンプルをプールしたものをCy2色素で標識を行い(400 pmol / 50 µg)、内部標準として全てのゲルに等量加えられた。標識のデザインはTable 3に示した。

Table 3 2D-DIGEの実験デザイン

| Gel No. | Cy3 labeled   | Cy5 labeled   | Cy2 labeled |
|---------|---------------|---------------|-------------|
| 1       | 0h control-1  | 0h siNF1-1    | Pool        |
| 2       | 0h siNF1-2    | 0h control-2  | Pool        |
| 3       | 0h control-3  | 0h siNF1-3    | Pool        |
| 4       | 24h control-1 | 24h siNF1-1   | Pool        |
| 5       | 24h siNF1-2   | 24h control-2 | Pool        |
| 6       | 24h control-3 | 24h siNF1-3   | Pool        |
| 7       | 48h control-1 | 48h siNF1-1   | Pool        |
| 8       | 48h siNF1-2   | 48h control-2 | Pool        |
| 9       | 48h control-3 | 48h siNF1-3   | Pool        |
| 10      | 72h control-1 | 72h siNF1-1   | Pool        |
| 11      | 72h siNF1-2   | 72h control-2 | Pool        |
| 12      | 72h control-3 | 72h siNF1-3   | Pool        |

標識は氷上暗所で30分間行い、反応は10 mM lysineを加えることで終了させた。Cy3とCy5で標識された比較すべきサンプルにCy2標識した内部標準を加え、等量の2 x sample buffer (8 M urea, 2 % CHAPS, 2.4% Destreak Reagent, 1% IPG buffer (pH 3-11 / pH 4-7)) を加え、氷上暗所で10分間インキュベートした。その後1 x sample buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 1.2% Destreak Reagent, 0.5% IPG buffer (pH 3-11 / pH 4-7))を加えて450 µlにフィルアップ後、strip holder上に静置し、IPG strips (pH 3-11 NL / pH 4-7, 24cm)の膨潤を行った。膨潤は暗所で室温にてオーバーナイトで行った。

IEFは Multiphor II apparatus (GE healthcare)を用いて行った。泳動条件は Table 4 の通りである。

Table 4 Multiphor II を用いた IEF の泳動プログラム

| step   | voltage | time (pH3-11/pH4-7) | condition |
|--------|---------|---------------------|-----------|
| Step 1 | 100 V   | 2 h / 2 h           | Hold      |
| Step 2 | 500 V   | 2 h / 4 h           | Hold      |
| Step 3 | 1000 V  | 5 h / 5 h           | Ramping   |
| Step 4 | 8000 V  | 3 h / 3 h           | Ramping   |
| Step 5 | 8000 V  | 9 h / 9.5 h         | Hold      |

IPGストリップは平衡化buffer 1 (2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 0.002% bromophenol blue, 1 mM DTT)で20分間還元反応を行い、平衡化buffer 2: (2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH8.8), 6 M urea, 30% glycerol, 0.002% bromophenol blue, 1 mM iodoacetamide)で20分間アルキル化反応を行った。平衡化したIPGゲルは10% SDSゲル上に静置し、アガロースで封入した後、Ettan DALT six system (GE Healthcare)を用いて泳動を行った。SDS-PAGEは最初の1時間は10 mA/gelで泳動し、その後は30 °Cで12 mA/gelの条件で先導色素がゲル先端に泳動されるまで行った。泳動後のゲルはTyphoon 9400 Variable Mode Imager (GE healthcare)を用いて100 μmの解像度でスキャンを行った。各色素の波長（励起/発光）は、Cy2(488 nm/520 nm) 、Cy3(532 nm/580 nm)、Cy5(633 nm/670 nm)である。

画像解析はDecyder 2D Software version 5.2 (GE Healthcare)を用いて spot 検出から同一ゲル内の発現量の比較を行う DIA (differential in-gel analysis)とそれに続いて異なるゲル間のマッチングと比較を行う BVA (biological variation analysis)に供した。発現変動解析は two-way analysis of variance (2way-ANOVA)解析で、条件 1: siRNA による影響、条件 2: NGF 刺激からの時間における二つの条件において *P* 値が 0.05 以下の spot を選び、タンパク質同定の候補とした。

#### 7-4. Spot 切りだし、ゲル内消化、タンパク同定

発現差異のあるタンパク質同定のために、150 µg の内部標準サンプル(CyDye 非標識)を泳動し、泳動後のゲルを固定液(10% メタノール、7.5% 酢酸)で固定後、Deep purple total protein stain (GE Healthcare)を用いてプロトコール通りに染色を行った。Typhoon 9400 によるスキャン後、変動のあったスポットは Ettan spot picker (GE Healthcare)を用いてゲルからの切り出しを行った。

ゲル片は洗浄液 (50 mM ammonium bicarbonate, 50% ACN)で三回洗った後、100% ACN を加えて乾固させ、バキュームして完全に乾かした後、1ゲルあたり 50 ng/mL の Sequence Grade Modified Trypsin (Promega) を 10% ACN, 50 mM ammonium bicarbonate 溶液に添加し、37°C、オーバーナイトでトリプシン消化を行った。トリプシン消化されたペプチドは抽出液(0.1% TFA, 30% ACN / 0.1% TFA, 50% ACN / 0.1% TFA, 80% ACN)のアセトニトリルの濃度を変えた三段階で超音波処理によって抽出を行った。

抽出されたペプチド混合物は吸引・乾燥後 20 µL の 0.1% TFA, 2% ACN に溶解し、ZipTip C18 pipette tip (Millipore)を用いて脱塩・濃縮を行い、LC-ESI-Qq-TOF 又は MALDI-TOF-TOF MS に供し、タンパク質の同定を行った。LC-MS 解析では UltiMate NanoLC system (LCPackings A Dionex Company)でタンパク質を分離し、API QSTAR Pulsar i 又は 4700 Proteomics analyzer (Applied Biosystems)で同定を行った。

ESI と MALDI 解析により得たデータは Uni-Prot database (release-2010-03)を用いて Mascot software application 2.1.04 (Matrix Sciences)によって解析を行った。

検索パラメーターを以下に示す。taxonomy; rat, cleavage enzyme, trypsin; variable modifications; carbamidomethyl(C), oxidation(M); max missed cleavage, 1. Peptide tolerance of 0.3 Da; fragment mass tolerance of 0.3 Da

#### 7-5. ProQ-Diamond 染色によるリン酸化タンパクの検出

リン酸化タンパク質検出のために ProQ-Diamond 染色を行った。泳動後ゲルは固定液 (50% メタノール、10% 酢酸)で 1 時間固定を行い、新しい液に変えたのちオーバーナイトで固定した。ゲルは超純水で 15 分、合計 3 回洗浄を行い、ProQ-Diamond phosphoprotein gel stain (Invitrogen)で 4 時間暗所にて染色を行った。染色後、脱色液 (1 M sodium acetate, pH 4.0, 20% ACN)で 1 時間、3 回脱色し、さらに超純水で 5 分間 2 回洗浄後、Typhoon 9400 でスキャンを行った。

続いて全タンパク質検出のため、Sypro Ruby 染色を行った。ProQ-Diamond 検出後のゲル

は洗浄し、オーバーナイト固定液中で保存後、SYPRO Ruby protein gel stain (Invitrogen)でオーバーナイト染色を行った。その後脱色液 (50% メタノール、10% 酢酸)で1時間脱色し、Typhoon 9400 でスキャンを行った。取得した ProQ-Diamond と Sypro Ruby 染色イメージは Multi gauge(Fuji film)で重ね合わせを行った。

#### 7-6. iTRAQサンプル調製と標識反応

100 µgのタンパクサンプルは、2D-clean-up kit (GE healthcare)を用いて脱塩・濃縮を行い、10 µlの6 M ureaに溶解した。iTRAQ試薬はプロトコール通りに標識した。以下に詳細を示す。20 µlのdissolution bufferに1.5 µlのdenaturant reagentを加えたものをサンプルに添加した。さらにサンプルに3 µlのdenaturant reagentを加え、60 °C で1時間インキュベートを行った。還元したリジン残基は1.5 µlのcystein blocking reagentに10分反応させ、12.5µlのトリプシンを加えて37 °Cで16時間インキュベートした。

消化したペプチド混合物には8つの異なったiTRAQ試薬 (113-121)を加え、室温で2時間反応させた。標識条件は以下の通りである。iTRAQ 113: NGF 0h control siRNA, 114: 24h control, 115: 48h control, 116: 72h control, 117: 0h siNF, 118: 24h siNF, 119: 48h siNF, 121: 72h siNF1. 標識されたサンプルは全て一つに混合し、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画した。

#### 7-7. サンプル分画と脱塩

標識されたペプチド混合物はGE Healthcare AKTA systemを用いて分画した。混合物は loading buffer (20% ACN, 10 mM potassium phosphate, pH 3.0)で希釈し、平衡化したMono S column (GE Healthcare)に導入した。ペプチド混合物はbufferB (10 mM potassium phosphate, pH 3.0, 500m M KCl, 20% ACN) のグラジエントで溶出を行った。溶出は以下の条件で行った。(0–2 min, 0–7% B; at 10 min, to 14% B; at 14 min, to 32% B; at 19 min, to 70% B; at 24 min, to 100% B)

iTRAQ 標識ペプチドを含んだ 44 画分は減圧下で乾燥させ、2% ACN, 0.1% TFA で再溶解した。サンプルは ZipTip µ-C18 pipette tips (Millipore)で脱塩を行い、同じサンプルを等分に分け、nano-LC-MALDI-TOF-TOF と nano-LC-ESI-QqTOF を用いて解析を行った。

## 7-8. LC-MALDI-MS/MS Analysis

ペプチドサンプルはC18 nano-LC using DiNa Map (KYA Tech Corp.)を用いて分離した。Solvent A (2% ACN, 0.1% TFA)で平衡化されたC18 column (0.5 mm inner diameter x 1 mm length, KYA Tech Corp.)にサンプルをインジェクトし、C18 nanocolumn (0.15 mm inner diameter x 50 mm length; KYA Tech Corp.)で300 nl/minの速度で分離した。solvent B (70% ACN, 0.1% TFA)の113分のグラジエントは以下の通りである。(0–22% B from 0 to 10 min, to 39% B at 53 min, to 45% B at 83 min, to 100% B at 93 min.) 分離カラムはmatrix (3 mg/ml alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% ACN, 0.1% TFA) の流路と結合し、stainless steel MALDI target plate (384 wells/plate; Applied Biosystems)の上にスポットティングされた。

その後AB SCIEX TOF/TOF 5800 (AB SCIEX)に供し、得られたMS/MSスペクトルは、TOF/TOF TM Series Explorer TM Software (Version 4.0.0)を用いて解析を行った。

## 7-9. LC-ESI-MS/MS Analysis

サンプルは20 µlのsample loopをセットしたLC Packings Ultimate instrumentを用いて nano-LC ESI- MS/MS解析を行った。サンプルは25 µl/min の速度で5mm RP C18 precolumn (LC Packings)に導入した。分離カラムは3 µm C18 beads with 100-Å pores が充填された75 µm internal diameter x 150mm length PepMap RP column(LC Packings)を使用した。RP columnの流速は200 nl/min で、120 minのsolvent B (85%ACN, 0.1% formic acid)によるgradientで行われた。条件は以下の通りである。(0–3% B from 0–5 min, to 15% B at 10min, to 40% B at 95min, to 100% B at 100min.)

分離したサンプルはQSTAR Elite massspectrometer (Applied Biosystems/AB Sciex)に供し、Analyst QS 2.0 (Applied Biosystems/AB Sciex)を用いて MS スペクトルを取得した。

## 7-10. iTRAQ データ解析

ESI/MALDI 解析によって得られたスペクトルデータは ProteinPilot Version 4.1 (Applied Biosystems)を用いて解析した。検索のためのデータベースは UniProt database Rat proteome (release-2012-01, 37104 entries)を使用した。Protein pilot 解析に用いた検索パラメーターを以下に示す。i) cysteine alkylation, Iodoacetic acid ; (ii) digestion, trypsin digestion; (iii) special factors, none; (iv) species, all none; (v) identification focus, biological modifications, amino acid substitutions; and (vi) search effort, thorough identification search Protein Pilot における同定の信頼性の cutoff 値は、95% confidence を使用した。

## 7-11. 融合プロテオミクスのデータ解析とネットワーク解析

トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析から得られた全てのデータは、iPEACH を使って一つの表に統合した。iPEACH の中では各解析で得られたデータは Entrez gene ID によって認識、統合されている。発現差異解析のために、統合したデータは Affymetrix Rat 230.3 array の全アノテーションデータが入っている subio platform (ver. 1.12)にインポートした。発現に差異がある遺伝子/タンパク質の抽出とクラスター解析は siNF1/control の比に基づいた値を用いて統計解析ソフト Subio で解析を行った。

ネットワーク解析は文献ベースの分子間相互作用解析を行うツールである Keymolnet (Institute of Medicinal Molecular Design (IMMD))を用いた。発現が増加/減少した分子のリストを KeyMolnet にインポートし、増加/減少した分子群がどのような GO (Gene ontology)に基づいているか調べるために、GO-based pathway analysis を行った。次に発現が増加した分子群について“始点終点解析”を行い、これらの分子間の相互作用をネットワークとして構築した。

## 7-12. siRNA

使用した siRNA は Nippon EGT (Japan)で合成した。各 siRNA の配列は Table 5 に示した。Silencer Negative Control siRNA 1 (Ambion)はコントロール siRNA として用いた。Rat Dynein IC2 に関しては参考論文(21)の配列を用いた。

Table 5 実験で用いた siRNA の配列

| target                 | sequence                       |
|------------------------|--------------------------------|
| rat NF1(249)           | 5-249-CAAGGAGTGTCTGATCAACTT-3  |
| rat NF1(611)           | 5-611-GGTTACAGGAGTTGACTGTTT-3  |
| rat Dynein IC2-C (329) | 5-329-GATCTAGACGAGGACCTAT-3    |
| rat Dynein IC2-C (331) | 5-331-TCTAGACGAGGACCTATTA-3    |
| rat COX-1 (1023)       | 5-1023-AACCATCGAGATTATCATCGA-3 |
| rat COX-1 (2618)       | 5-2618-AACAGGTGGACTCATCTACGA-3 |
| rat Dynein IC2         | 5-CCCTTTGCTTTGGATTGGTGTCATT-3  |

### 7-13. Western blotting

PC12 lysate は SDS-PAGE で分離した後 PVDF 膜に転写され、抗体を用いて免疫抗体反応を行い、続いて HRP が結合した二次抗体又は蛍光色素が結合した二次抗体 (ECL-Plex rabbit IgG-Cy2 , ECL-Plex mouse IgG-Cy5 (GE Healthcare))を用いて反応させた。HRP 標識二次抗体を用いた反応は、ECL-prime 試薬に反応させ、Hyperfilm ECL (GE Healthcare)に感光することによって、検出イメージを取得した。

蛍光標識二次抗体を用いた反応は、CyDye で標識されたパターンを Typhoon 9400 (GE Healthcare)を用いて画像を取得した。用いた一次抗体は以下の通りである。

NF1, Dynein IC, TCPE1 (Santa Cruz Biotechnology); COX-1, GR, LaminB1 (Abcam); beta-actin (Sigma)

画像の強度は、ImageQuant (GE Healthcare)を用いて測定した後、total spot volume mode を用いてバックグラウンド値やノーマライズを行い算出した。また二次元蛍光ウエスタンブロット解析では、ProGenesis Work station version 2005 (PerkinElmer Life Sciences)を用いて蛍光強度を測定した。それぞれのスポットはデジタルデータとして記録し、Microsoft Office Excel で計算を行った。値は平均±S.E.で示した。

### 7-14. Auto-2D を用いた 2D-ウエスタンブロットティング法

PC12 lysate は 2D-clean up kit を用いて脱塩・濃縮し、lysis buffer (8 M urea, 2 % CHAPS )に再溶解した。5 µg のサンプルを膨潤液 (8 M urea, 2% CHAPS, 1.0% Destreak Reagent, 0.4% IPG buffer pH 4-7) と混合し、strip holder に添加した。IEF は Auto-2D (Sharp)を用いて Table 6 の泳動条件に従って行った。

Table 6 Auto-2D を用いた IEF 泳動プログラム

| step   | voltage | time   | condition |
|--------|---------|--------|-----------|
| Step 1 | 200 V   | 15 min | Hold      |
| Step 2 | 1000V   | 15 min | Ramping   |
| Step 3 | 3000 V  | 15 min | Ramping   |
| Step 4 | 6000 V  | 15 min | Ramping   |
| Step 5 | 6000 V  | 15 min | Hold      |

IPG ゲルは(45% NuPAGE (invitrogen), 50 m M DTT )で 5 分間平衡化後、8 % gel (5 x 7.5cm) にて二次元目の SDS-PAGE を行った。泳動後、タンパクサンプルは PVDF 膜に転写され、



抗体を用いて免疫抗体反応を行った。検出後は ProGenesis Work station version 2005 (PerkinElmer Life Sciences)を用いて定量解析を行った。

#### **7-15. Neurite outgrowth analysis**

PC12 細胞の神経突起伸長を測定するために、細胞は siRNA 導入後コラーゲンコートされた 6well プレートに播種し、50 ng/ml NGF (Wako)で刺激後し、72 時間反応させた。NGF 刺激を行った PC12 細胞の神経突起の長さは MetaMorph software (Molecular Devices)を用いて測定した。それぞれの測定には、最低 50 細胞を各視野からランダムに選択した。各実験は三回行った。

#### **7-16. 免疫細胞染色**

6well プレートに播種された PC12 細胞は 4% ホルムアルデヒド/PBS に室温で 15 分間反応させて固定し、続いて 0.1% Triton X-100/ PBS を 15 分間氷上で反応させることによって透過処理を行った。PBS で洗浄後、5% BSA/PBS で室温 1 時間ブロッキング後、細胞は 0.2% BSA で希釈された一次抗体を反応させ、続いて蛍光標識された二次抗体を室温で 1 時間反応後、蛍光顕微鏡 (Olympus IX81)で観察を行った。

#### **7-17. 核・細胞質タンパクの分画**

PC12 細胞は siRNA を導入し、NGF 刺激後 48 時間後に回収した。細胞はセルスクレイパーで集め、サンプル間での量を等しくした後、2-D Sample Prep for Nuclear proteins kit (Thermo Fisher scientific)を用いて核画分と細胞質画分の抽出を行った。抽出は Thermo Fisher scientific のプロトコール通り行った。

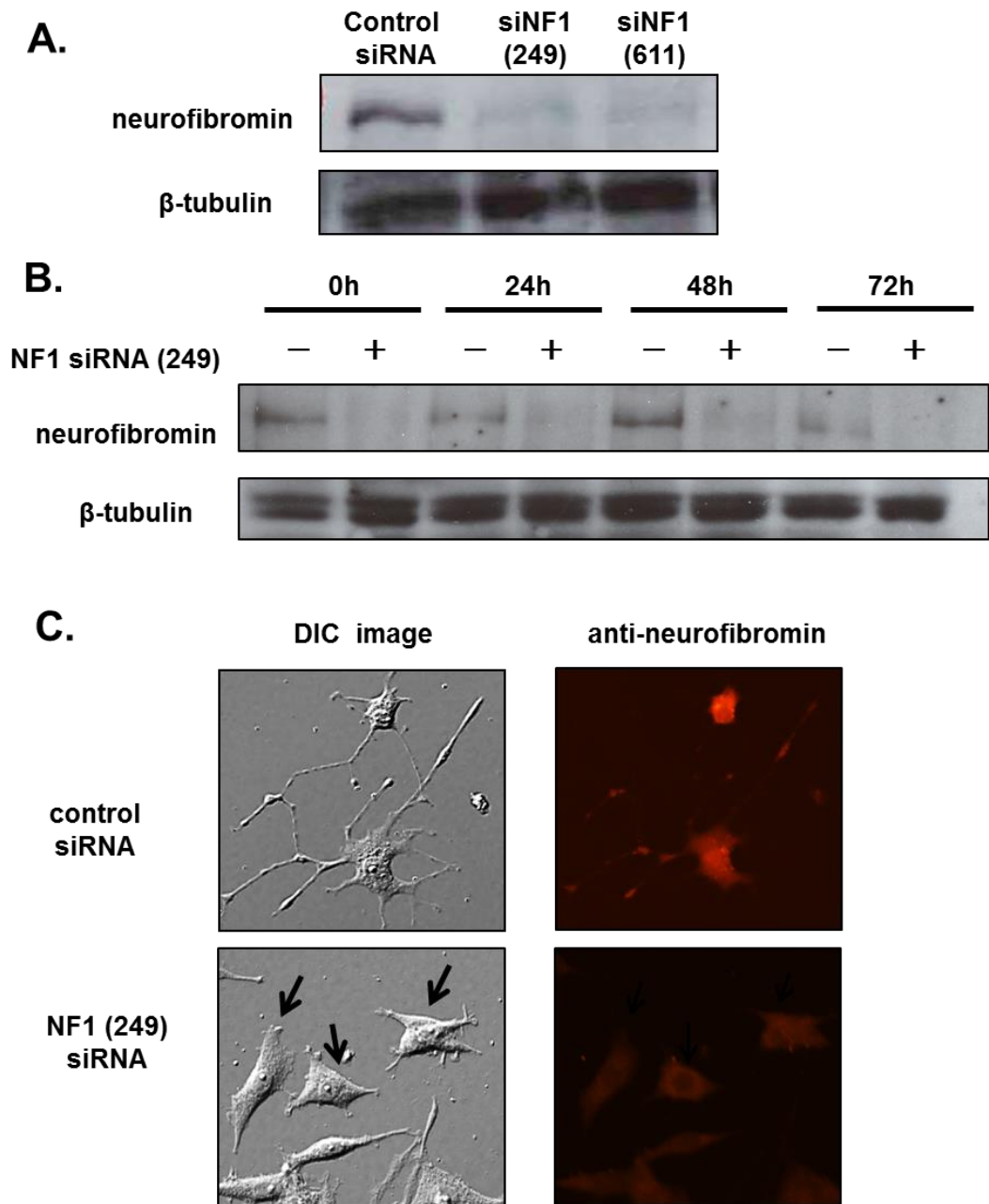
## 8. 実験結果

### 8-1. NF1 病態モデル細胞の作製

NF1 遺伝子を発現抑制するため、siRNA を用いて NF1 ノックダウン PC12 (NF1-KD PC12)細胞を作製した。NF1 siRNA(249, 611)を PC12 細胞に導入し、その 24 時間後に NGF 刺激を加え、NGF 刺激前後 24 時間、48 時間、72 時間の形態変化を control siRNA 処理群と比較した。刺激前の状態を 0 時間とした。また、PC12 細胞内の NF1 遺伝子産物 neurofibromin の発現が抑制されていることを、ウエスタンブロット法と免疫細胞染色法によって確認し、その表現形を観察した(Fig. 4 A-C)。

Neurofibromin が正常に存在する細胞では、NGF 刺激によって経時的に神経突起が伸長するのに対して、2 種類の siRNA 処理によって neurofibromin が発現抑制されている細胞は、共通して細胞体が双極性の紡錘状に変形し、神経突起の伸長が明らかに抑制される形態変化を顕著に示した。これらの NF1 ノックダウンによる細胞の形態変化は、非常に再現性高く検出され、NF1 病態に特徴的な神経系細胞分化異常の一つの表現形を再現するものと考え、この細胞を NF1 病態モデル細胞とした。

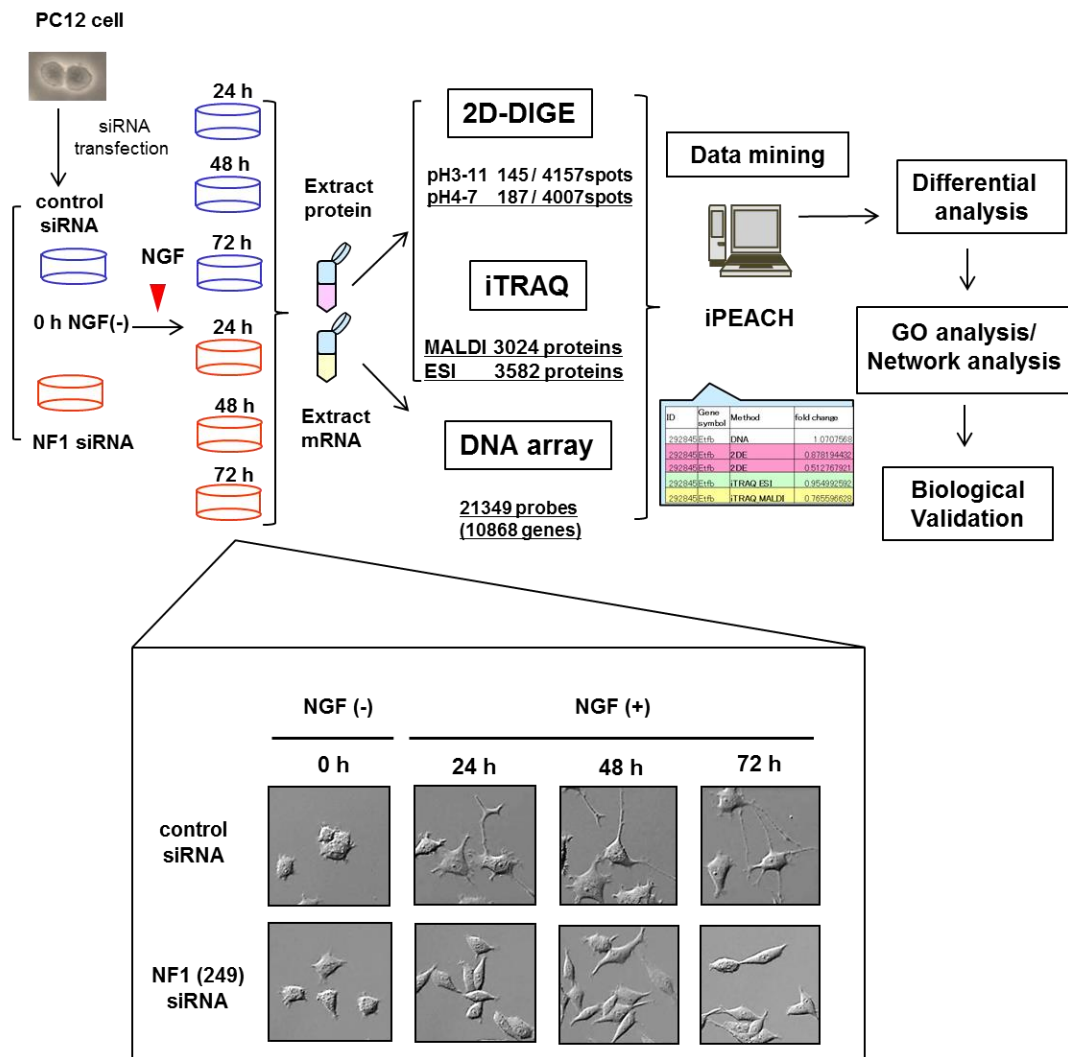
上記の NF1 病態モデル細胞を、Fig. 5 に示す方法で融合プロテオミクス解析に供した。Control siRNA 又は NF1 siRNA を導入し、24 時間後に NGF を加えて刺激を開始し、0、24、48、72 時間後に各細胞から、タンパク質と mRNA を抽出した。タンパク質は、2D-DIGE 法および iTRAQ-8plex 法にて解析し、mRNA は DNA array (expression array)にて解析し、得られた全ての結果について iPEACH を用いて統合した(Fig. 5)。



**Fig. 4** PC12 細胞の神経突起伸長における NF1 siRNA の効果

A. PC12 細胞に control siRNA、NF1 siRNA(249/611)をそれぞれ導入し、NGF 刺激を行い 48 時間後に回収し、neurofibromin 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。Beta-tubulin は loading control として用いた。B. NGF 刺激前後の各タイムポイントにおける neurofibromin の発現を確認した。

C. PC12 細胞に control siRNA、NF1 siRNA(249)をそれぞれ導入し、NGF 刺激を行い 72 時間後に細胞免疫染色法を行った。細胞は 4%PFA で固定し、neurofibromin 抗体を反応させ、続いて Alexa 568-anti-rabbit IgG (赤)を反応後、蛍光顕微鏡で観察を行った。矢印は PC12 細胞の神経突起の伸長が阻害されている部分を示している。



**Fig. 5** NF1-KD PC12細胞における異常なシグナルネットワーク同定のための融合プロテオミクス法のワークフロー

PC12細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA を導入し NGF 刺激を行い、タンパク質と mRNA を以下の異なるタイムポイントで回収した(0 h, NGF(-); 24 h, 48 h, 72 h; NGF(+))。回収したタンパク質は 2D-DIGE 法、iTRAQ-8plex 法に、mRNA は DNA microarray Rat 230 2.0 gene chip analysis (Affymetrix) に供した。各解析後、iPEACH を用いて統合されたデータは、NF1 siRNA 処理によって発現が変動している遺伝子・タンパク質を抽出し、GO 解析/pathway 解析後に生物学的検証を行った。実験に用いた PC12 細胞の siRNA 導入後の継時的な形態学的変化を枠内に示した。

## 8-2. 2D-DIGE の結果

PC12 細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA を導入し、各タイムポイント (0h, 24h, 48h, 72h) で細胞回収・タンパク質抽出し、脱塩・濃縮後に 2D-DIGE に供した。また、より多くのタンパク質スポット情報を得るために、各サンプルを 2 等分し、pH 3-11 と pH 4-7 の二つの pH 領域で泳動を行った。まず、pH 3-11 の領域では、平均  $4157 \pm 160$  spots を、pH 4-7 の領域では平均  $4007 \pm 176$  spots 検出することができた。これらのスポットについて統計解析ソフトである Decyder2D で control PC12 細胞と NF1-KD PC12 細胞における発現の変動を調べるために、2way-ANOVA 解析を行った (条件 1: siRNA 処理、条件 2: 時間)。その結果、pH 3-11 では 145 スポット、pH 4-7 では 187 スポットが、siRNA 処理と時間において有意に変動がある ( $p$ -value  $< 0.05$ ) スポットとして抽出された。

これらの変動したスポットは、ゲル内消化を行い、AB SCIEX MALDI TOF/ TOF 4700、5800 又は ABI Q-Star Pulsar I を用いた MS 解析によってタンパク質の同定を行った結果、合計 123 (pH 3-11: 128, pH 4-7: 124 spots) タンパクを同定することができた (Table 7-A)。このデータは後に融合プロテオミクスのデータと統合するために使用した。

## 8-3. iTRAQ (8-Plex) analysis の結果

iTRAQ 解析は 2D-DIGE の解析に用いたサンプルと同一のものを用いた。サンプルは独立した実験によって得られた  $N=3$  のサンプルをプールし、トリプシン消化後に iTRAQ 標識を行った。各サンプルは標識後に混合し、ペプチドは陽イオン交換クロマトグラフィーを用い、44 fraction に分画を行った。これらのすべての画分を ZipTip で脱塩し、nanoLC-MALDI および nanoESI-Qq-TOF による解析を行った。得られた全スペクトルデータ (MALDI: 141533, ESI: 286025) は Protein pilot 4.1 によって、uniprot RAT proteome データベースを用いて解析を行い、95% confidence の条件で MALDI では 46766 ペプチド配列から、non-redundant な 3024 タンパクを ESI は 68790 ペプチド配列から 3582 タンパクを同定した (Table 7-B)。

## 8-4. DNA array の結果

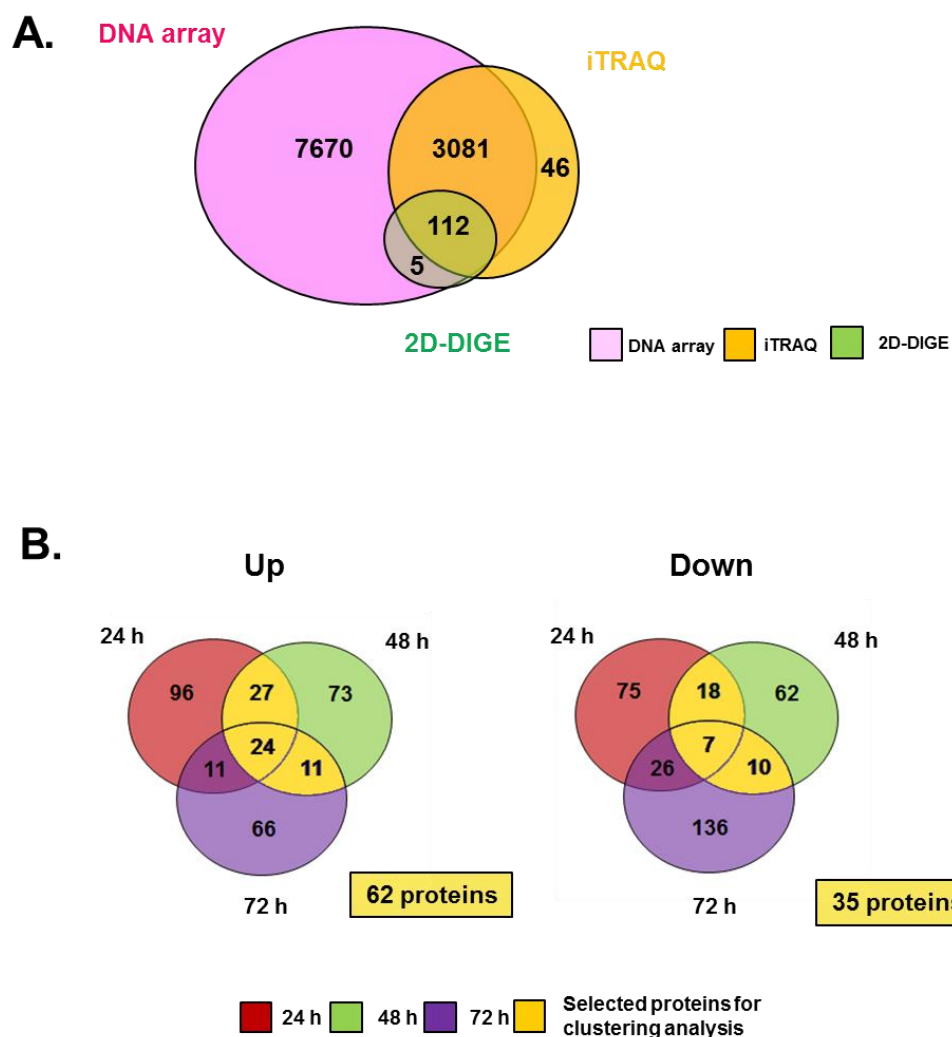
DNA array 解析は、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (affimetrix) を用いて、2D-DIGE 及び iTRAQ 解析と同様に調製した細胞から、各タイムポイント 4 点で mRNA を回収し、サンプルごとに解析に供した (Fig. 1B)。得られたシグナルデータを MAS5 でノーマライズした結果、31099 プローブが検出され、全てのサンプルで Absent と検出されたものを除いた 21349 プローブ (10868 遺伝子) を解析に用いた (Table 7-C)。このデータは後に融合プロテオミクスのデータと統合するために使用した。

### 8-5. iPEACH を用いたプロテオームとトランスクリプトームデータの統合

各手法で検出したプロテオミクスとトランスクリプトームデータを各タイムポイントにおける control に対する siNF1 の比の値を算出し、iPEACH を用いて統合を行った。次に NF1 KD cells 内で挙動を変化させる特徴的な分子群を抽出するために、統合されたデータの比較定量解析(特異的に発現上昇/減少した分子の抽出)、クラスター解析、および GO 解析を行った。定量データのマイニングを行うため、subio platform に iPEACH によってひも付けられた Gene name を指標にし、各時間における siNF1/ cont の比較定量データのインポートを行った。

各手法により同定された総分子の内、タンパク質(iTRAQ と 2D-DIGE)と DNA の両方で 3239 分子が共通してすべての時間帯で定量データを有していた(Fig. 6-A)。このうち、プロテオミクスによって得られたデータに焦点をあて、クラスター解析を行った。iTRAQ では、MALDI と ESI の両方の解析で増加(1.2 倍以上)または減少(0.83 以下)したタンパクの平均値を採用し、それ以外のタンパク質に関しては 1(変動なし)として算出し、各時間において増加または減少したタンパク質を抽出した(Fig. 7-B)。

NGF 刺激後継続的(24 から 48 時間、48 から 72 時間、または 24・48・72 時間) に変動しているタンパク質を抽出したところ、継続的に発現増加するタンパク質は 62、減少するものは 35、合計 97 タンパク質であった(Fig. 6-B)。これら 97 分子について NGF 刺激後の各時間における mRNA とタンパク質の挙動を uncentered correlation 法でクラスター解析したところ、mRNA の 24 時間の挙動が、タンパク質の 24.48.72 時間と近い距離にクラスターされたことから、24 時間の mRNA の変動が 24.48.72 時間のタンパク質の動きに連動している可能性が示唆された(Fig 6-C)。

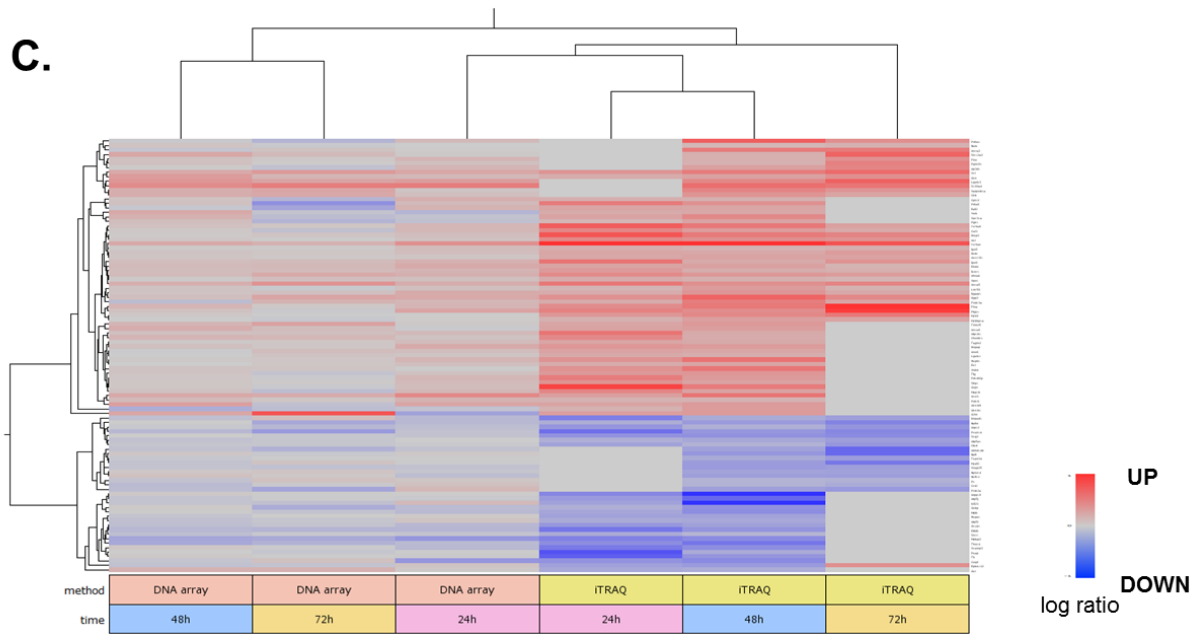


**Fig. 6** 融合プロテオミクス法より得た結果より抽出した発現量に変動がある分子群のクラスター解析とパスウェイ解析

**A.** 2D-DIGE, iTRAQ, DNA array によって同定した全遺伝子/タンパク質数のベン図

**B.** iTRAQ 法によって同定された増加/減少したタンパク質数のベン図

iTRAQ 法では、MALDI-TOF-TOF と ESI-Qq-TOF によって全 3,239 タンパク質が同定された。各タンパク質の発現量の比 (NF1 siRNA/control siRNA)は各タイムポイントにおける MALDI と ESI の値の平均をとって計算した。発現に関して 20%以上変動しているものを (平均値  $>1.20$  又は  $<0.83$ )発現量が異なるタンパク質と定義した。クラスター解析には、継続的に発現減少又は増加するタンパク質をベン図から抽出を行った(黄色で示した領域, 62 増加したタンパク質; 35 減少したタンパク質)。



**C.** iTRAQ 法で得たデータより抽出した発現量に変動がある 97 分子群の発現量のクラスタ解析

縦のカラムはサンプルの種類を、横の行は各タンパク質の発現量を示しており、log abundance scale を用いて標準化し、ヒートマップとして示している。ヒートマップの青と赤は減少と増加を示しており、色の強さは変動の強さと連動している。

| <b>A. 2D-DIGE</b>                     |         |        | <b>B. iTRAQ (MALDI+ESI)</b> |              |            | <b>C. DNA array</b>  |              |            |
|---------------------------------------|---------|--------|-----------------------------|--------------|------------|----------------------|--------------|------------|
|                                       | pH 3-11 | pH 4-7 | detected 3239 proteins      |              |            | detected 10868 genes |              |            |
| detected spots                        | 4157    | 4007   | time                        | Down (<0.83) | Up (>1.20) | time                 | Down (<0.67) | Up (>1.50) |
| 2way ANOVA analysis (p <0.05)         | 147     | 187    | 0h                          | 158          | 150        | 0h                   | 481          | 603        |
| identified proteins by MS/MS analysis | 128     | 124    | 24h                         | 126          | 158        | 24h                  | 578          | 392        |
| upregulated proteins                  | 32      |        | 48h                         | 97           | 135        | 48h                  | 375          | 488        |
| downregulated proteins                | 20      |        | 72h                         | 179          | 112        | 72h                  | 778          | 401        |

**Table 7** 2D-DIGE (A), iTRAQ (B), and DNA array(C)で検出した分子の数 括弧内数値は発現量の比(NF1 siRNA/control)を示す。2D-DIGE 解析では、同じタンパク質で複数の spot が検出された場合は、それらの中で発現変動が最大/最少値となるスポットを採用した。また、タイムポイント 1 点以上で変動しているものを変動分子と定義した。



## 8-6. Pathway Based Gene Ontology (GO)解析

NGF 刺激後継続的に発現増加するタンパク質 62 個、および減少するタンパク質 35 個に加えて、2D-DIGE でいずれかの時間帯で上昇しているものとして同定された 32 個のタンパク質、および減少しているもの 20 個、さらに、DNA array の結果の 24 時間(1.2 倍以上または 0.83 以下 185)と 48 時間(1.5 倍以上または 0.67 以下 186)の分子を統合し、これらの分子群を KeyMolnet による pathway based Molecule 解析 (based on the GO criterion)を行った(Table 8)。

その結果、上昇している pathway には、“Calcium signaling” ( $P = 1.380 \times 10^{-5}$ ), “Transcriptional regulation by GR” ( $P = 4.963 \times 10^{-5}$ ), “Granzyme signaling pathway” ( $P = 8.112 \times 10^{-5}$ ), “MMP (matrix metalloproteinase) signaling pathway” ( $P = 1.118 \times 10^{-4}$ ), “Intermediate filament signaling pathway” ( $P = 1.789 \times 10^{-4}$ )が、又、減少している pathway は、“Serotonin signaling pathway” ( $P = 6.580 \times 10^{-6}$ ), “CaSR (calcium-sensing receptor) signaling pathway” ( $P = 3.507 \times 10^{-5}$ ), “AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) signaling pathway” ( $P = 5.266 \times 10^{-5}$ ), “Calcium signaling pathway” ( $P = 6.266 \times 10^{-5}$ ), “GABA (gamma-aminobutyric acid) signaling pathway” ( $P = 9.489 \times 10^{-5}$ )が高いスコアで検出された。又、Biological Event として、上昇したグループは cell communication, epidermis development, apoptotic process が、減少したグループは localization, transport, response to wounding がリストアップされた。

**Table 8** 2D-DIGE、iTRAQ、DNA array によって同定された発現増加または減少した遺伝子/タンパク質の pathway 解析

A. 増加した分子群の pathway 解析

| rank | keymolnet pathway                       | score  | score<br>(P-value)    | protein   |
|------|---|--------|-----------------------|---|
| 1    | Calcium signaling pathway               | 16.145 | 1.38×10 <sup>-5</sup> | <b>14-3-3</b> , <b>Annexin</b> , cadherin, <b>Crn1</b> , DGK, <b>Importin</b> , Kinesin, nAChR, <b>S100</b> , VILIP1, <b>vinculin</b>                         |
| 2    | Transcriptional regulation by GR        | 14.298 | 4.96×10 <sup>-5</sup> | <b>14-3-3h</b> , ANXA1, AP-1, CGA, collagenase, CRF, GR, GRb, <b>HSP70</b> , IBAT, RGS2   |
| 3    | Wnt signaling pathway                   | 13.59  | 8.11×10 <sup>-5</sup> | b-TRCP, cadherin, <b>CRMP</b> , <b>MAP</b> , <b>MAP1B</b> , <b>tub</b> , Wnt  |
| 3    | Granzyme signaling pathway              | 13.59  | 8.11×10 <sup>-5</sup> | <b>a2M</b> , COLIV, <b>HSP70</b> , <b>lamin</b> , Laminin, PI-9, <b>tub</b>   |
| 5    | MMP signaling pathway                   | 13.127 | 1.12×10 <sup>-4</sup> | <b>a2M</b> , COLIV, Laminin, laminin5, LRP, MMP, MMP-10, MMP-13, MMP-19, MMP-3, PAI-2   |
| 6    | Intermediate filament signaling pathway | 12.449 | 1.79×10 <sup>-4</sup> | <b>14-3-3</b> , <b>14-3-3z</b> , <b>AP3-C</b> , <b>dynein</b> , <b>IF-II</b> , <b>K8</b> , Kinesin, <b>lamin</b> , <b>laminA</b> , <b>laminC</b> , <b>tub</b> |
| 7    | inflammasome signaling pathway          | 11.866 | 2.68×10 <sup>-4</sup> | AIM2, caspase-1, inflammasome, IPAF, NALP1, NALP3, PI-9   |
| 8    | CD44 signaling pathway                  | 11.135 | 4.45×10 <sup>-4</sup> | COLIV, collagen, <b>ERMP</b> , <b>ezrin</b> , Laminin, MMP, <b>tub</b>  |
| 9    | CYP family                              | 10.729 | 5.89×10 <sup>-4</sup> | CYP3A, CYP3A4, CYP3A43, CYP3A5, CYP3A7, CYP4, CYP4B1  |
| 10   | LHR signaling pathway                   | 10.609 | 6.40×10 <sup>-4</sup> | CGA, hCG, LH, LHR   |

B. 減少した分子群の pathway 解析

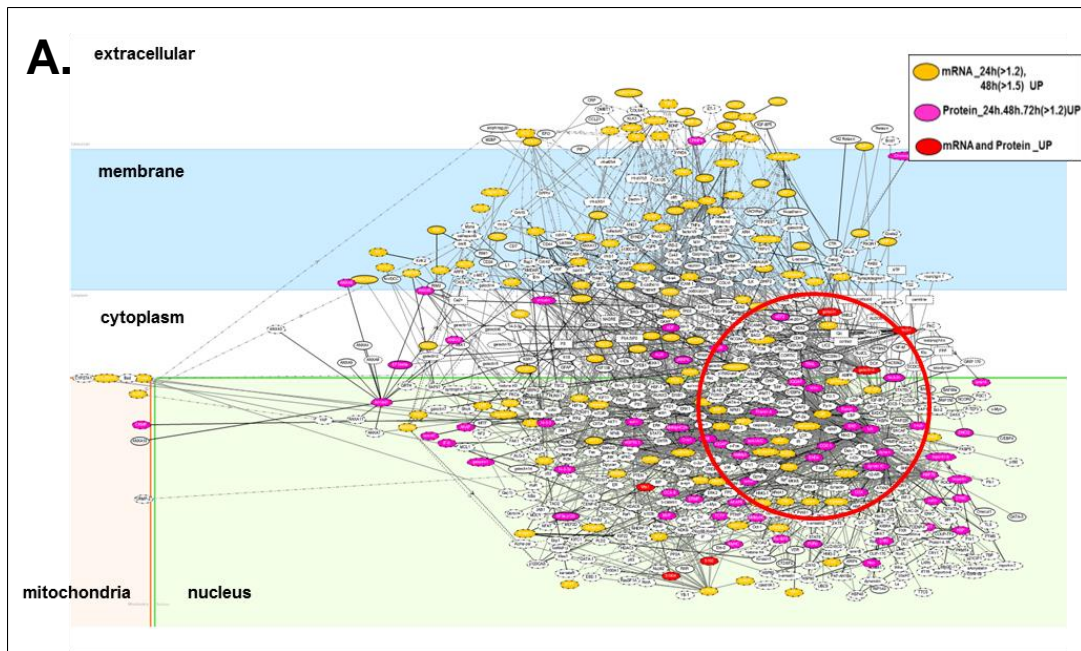
| rank | keymolnet pathway                                  | score  | score<br>(P-value)    | protein   |
|------|--|--------|-----------------------|---|
| 1    | Serotonin signaling pathway                        | 17.213 | 6.58×10 <sup>-6</sup> | 5HT3R, 5HT5AR, 5HT5R, EPAC, Ga(q/11), Ga(q/11)bg, nNOS, PKC, PLA2                     |
| 2    | CaSR signaling pathway                             | 14.799 | 3.51×10 <sup>-5</sup> | Ga(q/11), Ga(q/11)bg, <b>PI4K</b> , PKC, PMCA   |
| 3    | AMPA signaling pathway                             | 14.213 | 5.27×10 <sup>-5</sup> | Actin, AKAP5, Liprin-a, PKC, <b>Protein 4.1G</b> , <b>tub</b>                         |
| 4    | Calcium signaling pathway                          | 13.962 | 6.27×10 <sup>-5</sup> | Actin, CRT, Ga(q/11), Ga(q/11)bg, <b>Kinesin</b> , P2X, PKCg, PMCA4, troponin         |
| 5    | GABA signaling pathway                             | 13.363 | 9.49×10 <sup>-5</sup> | Actin, AKAP5, GABAAR, GABAARg, GABAARg3, GABAARq, GABAR, PKC                          |
| 6    | calpain signaling pathway                          | 13.188 | 1.07×10 <sup>-4</sup> | Actin, calpain, calpain8, integrin b, <b>NF-M</b> , PKC, PKCg, PMCA, TN-T, <b>tub</b> |
| 7    | HDAC signaling pathway                             | 13.1   | 1.14×10 <sup>-4</sup> | Ets, HDAC, HDAC11, <b>HSP90</b> , IV-HDAC   |
| 8    | Melanopsin signaling pathway                       | 11.955 | 2.52×10 <sup>-4</sup> | Ga(q/11), Ga(q/11)bg, melanopsin  |
| 9    | JAM family signaling pathway                       | 11.769 | 2.87×10 <sup>-4</sup> | Actin, int-aL/b2, int-aM/b2, int-aX/b2, int-b2  |
| 10   | Guanylate cyclase(receptor type) signaling pathway | 10.916 | 5.18×10 <sup>-4</sup> | CNGC, <b>HSP70</b> , <b>HSP90</b> , phospholamban, PMCA, <b>Tyr3MOX</b>               |

NF1-KD 細胞において発現上昇/減少している分子のリストには 263 増加遺伝子/タンパク質 (iTRAQ, 62 proteins; 2D-DIGE, 32 proteins; DNA array, 185 genes) と 239 減少遺伝子/タンパク質 (iTRAQ, 35 proteins; 2D-DIGE, 20 proteins; DNA array, 186 genes) を含んでおり、これらの分子群について KeyMolnet による pathway 解析を行った。Table 8 には変動している分子が属する経路について Keymolnet score を基準として上位 10 位まで示している。分子名が太字のものは、プロテオミクス解析により検出したものである。

## 8-7. ネットワーク解析

NF1-KD 細胞において発生した異常に亢進したシグナル分子群を抽出するために、融合プロテオミクスデータについてネットワーク解析を行った。クラスター解析の結果から mRNA とタンパク質の経時的な発現変動が連動していることが示唆されたため、mRNA で 24 時間に 1.2 倍以上かつ 48 時間に 1.5 倍以上に上昇している分子群を始点に、iTRAQ のデータより、24・48・72 時間で継続的に上昇し続けている分子群と 2D-DIGE で検出した上昇タンパクを融合させて終点とし、ネットワークの構築を行った。Fig.7-A はその結果得られたネットワークの KeyMolnet による細胞内局在描画を表示している。

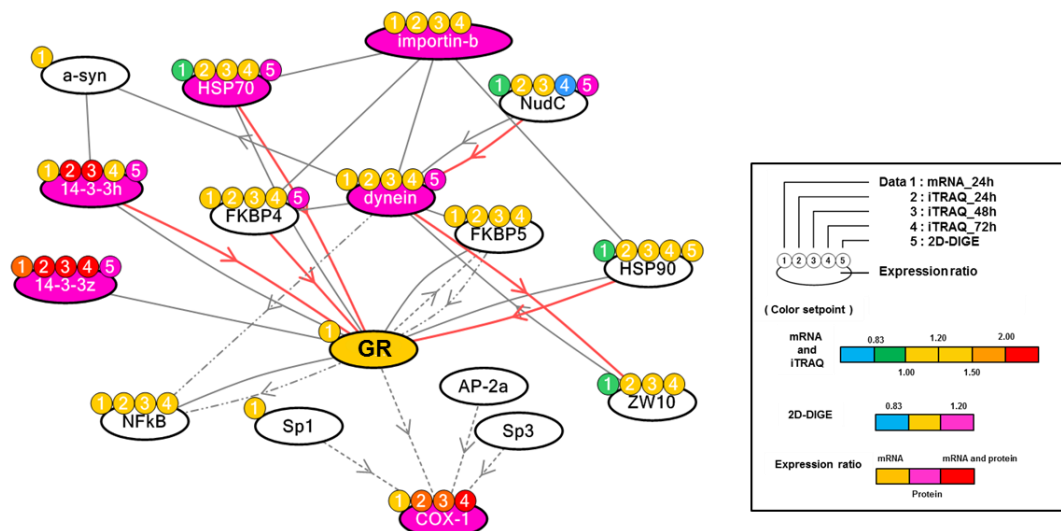
特にこのネットワークの中で、上昇している分子のクラスターが密である部位に注目した(Fig. 7-A red circle)。このネットワークの構成分子として、NGF 刺激を与えた後、mRNA24 時間で上昇し、継続的に iTRAQ で上昇している COX-1 と、2D-DIGE で挙動の異なる複数スポットが検出された Dynein IC2 と、これらをつなげる中心的存在である転写因子 GR からなるシグナルネットワーク (Dynein IC2-GR-COX signal)に注目した(Fig. 7-B)。Dynein 複合体は GR を核内に輸送する時のモータータンパク質であり、また、COX-1 は転写因子である GR によって発現誘導されることが報告されている(22)。これらのことから、NF1 ノックダウンによって上昇した分子群の細胞内挙動を推察した。すなわち Dynein IC2 を中心に構成された複合体により GR が核へと移行し、これが転写因子として機能した結果、COX-1 の転写が誘導されていること、またこのシグナルの亢進が NF1-KD 細胞において神経系の分化異常を引き起こしているのではないかと推測された。



**Fig. 7 NF1-KD PC12 細胞において発現増加しているタンパク質群のネットワーク解析**

A. NF1 ノックダウンによって発現が上昇した分子群リストを KeyMolnet software にて解析した。ネットワークの始点をトランスクリプトームで上昇した分子、終点をプロテオミクスで上昇した分子として始点終点解析を行い、標的分子群が構成するネットワークを描画した。赤の円は発現上昇したタンパク質群がクラスターを形成している場所示している。右上凡例に示したオレンジの円は DNA array で上昇した遺伝子、ピンクの円はプロテオーム解析で上昇したタンパク質、赤は両解析で上昇した分子を示す。

**B.**



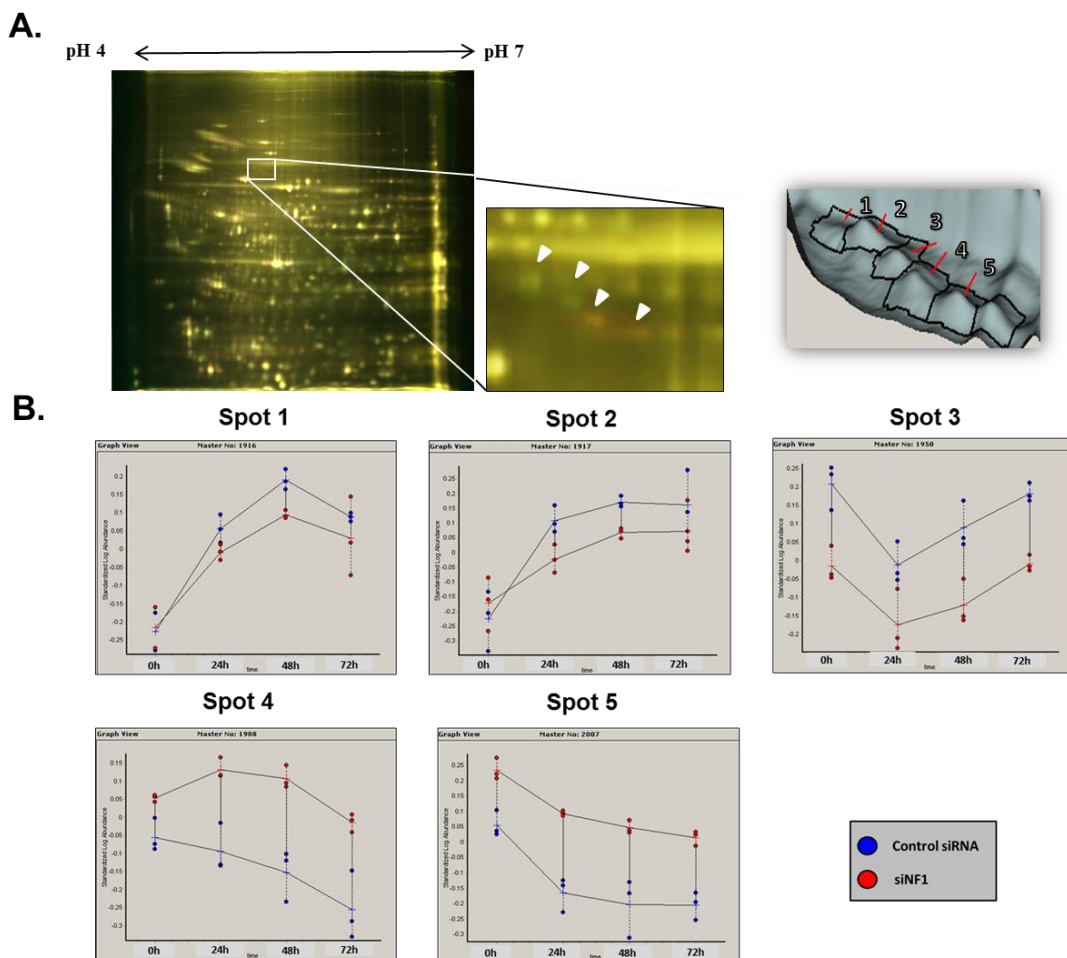
**B. 分子ネットワーク(図 A)から抽出した dynein IC2、 GR、 COX-1 を含む NF1 ノックダウン細胞内異常シグナリング**

図中凡例のカラーマークは以下に示す解析法により得られたデータを表している。カラーマーク 1: 24 h mRNA, 2: 24 h iTRAQ, 3: 48 h iTRAQ, 4: 72 h iTRAQ, 5: 2D-DIGE. また各解析によって得たデータは Expression ratio として発現量の増減を示した。矢印を伴う実線は、直接的な結合又は活性化を示し、矢印を伴わない実線は複合体形成、矢印を伴う破線は転写活性化を示している。

## 8-8. 融合プロテオミクス解析により抽出された NF1 ノックダウン細胞特異的活性化ネットワークを構成する分子群の細胞生物学的検証実験

### 8-8-1. Dynein IC2 のスプライシングとリン酸化による変動

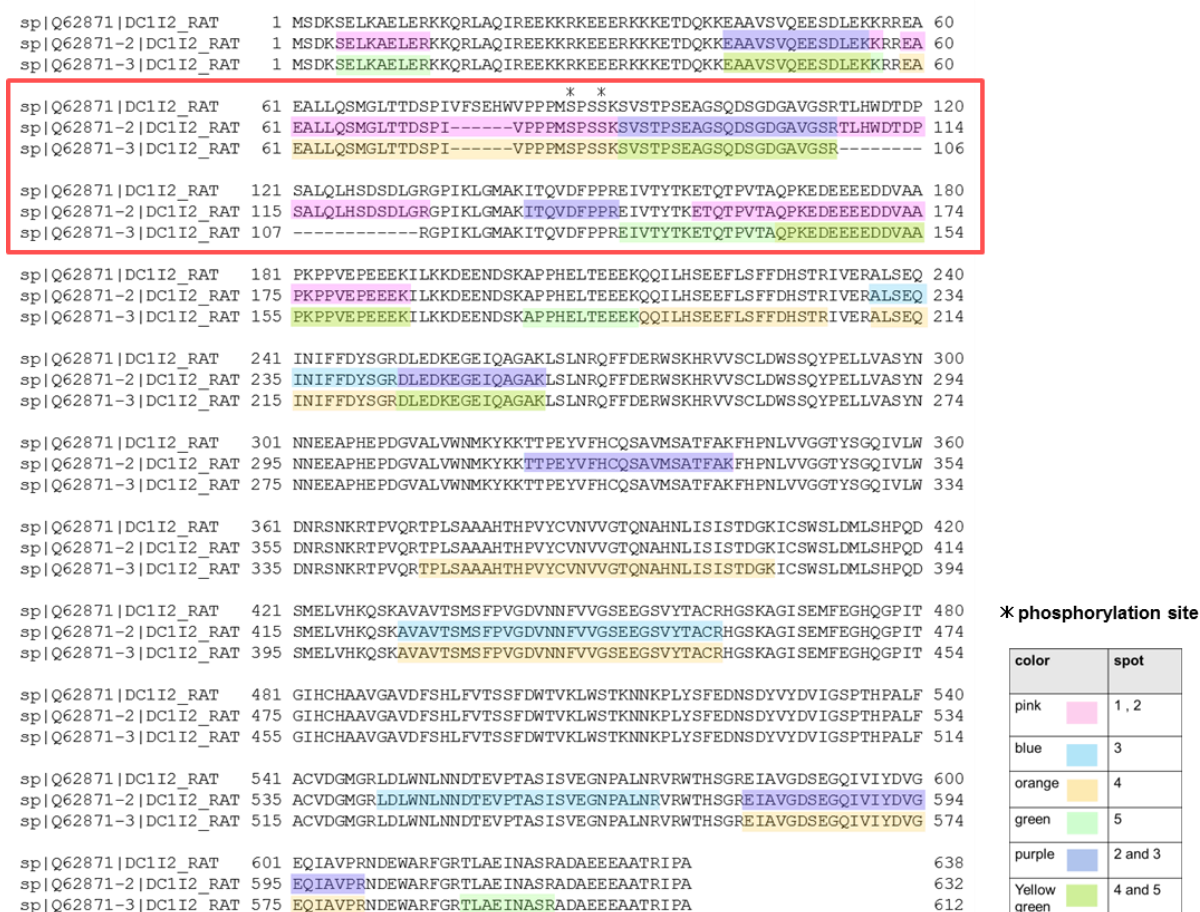
2D-DIGE 解析において最も顕著に変動したスポットとして同定された Dynein IC2 は、5つのスポットとして検出され、NF1 ノックダウンによってそれぞれが発現変動することがわかった(Fig. 8-A)。各スポットを酸性側から 1, 2, 3, 4, 5 とし、それぞれの発現変動を経時的にグラフ化した(Fig. 8-B)。興味深いことに、スポット 1・2・3 は NF1 ノックダウンにより発現量が減少するグループであり、一方スポット 4・5 は発現増加するグループであった。また、NGF 刺激後の各スポットの経時変化を観察すると、NF1siRNA の有無にかかわらず、スポット 1・2 では NGF 刺激後において発現量が増加しており、スポット 3・5 では減少する傾向であったが、スポット 4 においては、NF1siRNA が存在しないときは減少傾向であるのに対して、NF1 がノックダウンされると上昇することが判明した。



**Fig. 8 2D-DIGE における dynein IC2 の発現パターン**

A, B 2D-DIGE 解析における dynein IC2 のスポットイメージ Dynein IC2 は PC12 細胞において NF1 ノックダウンによって顕著に発現が変動する 5 つのスポットとして同定された。矢印は Dynein IC2 スポットを示す。control siRNA: Cy5(青)、NF1 siRNA: Cy3 (赤) また、B には DeCyder 2D software による dynein IC2 の継時的変動を示した。スポット 1, 2, 3, 4, 5 の標準化された強度の平均をグラフに示している(n=3)。グラフの横軸は NGF 刺激からの時間、縦軸は標準化されたスポット強度を示している。グラフ中の青の円は control siRNA、赤の円は NF1 siRNA を示している。

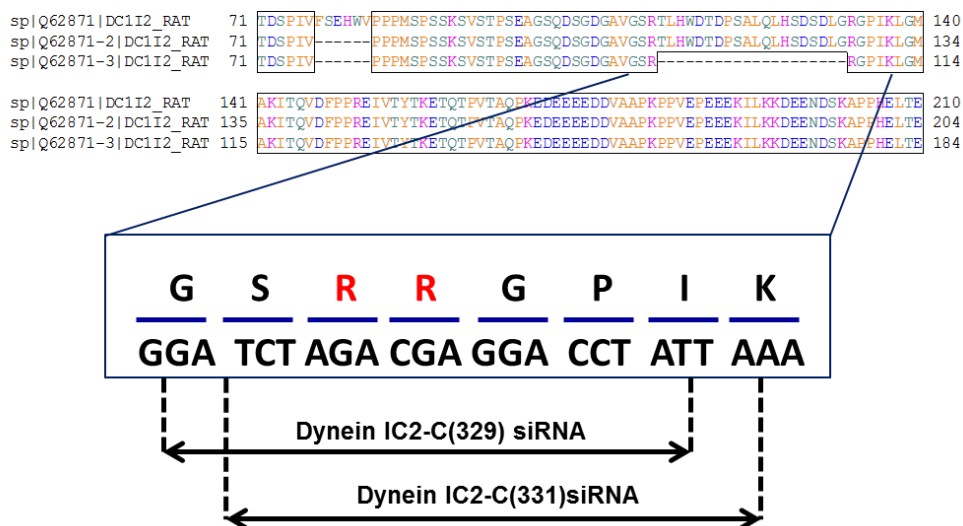
Dynein IC2 は alternative splicing を受けることが報告されており(23)、Dynein IC2-A, -B, -C の三つのスプライシングバリエーションが存在する。各アイソフォームの分子量と等電点と質量分析によるアミノ酸配列同定の結果から、検出したスポットは IC2-B および IC2-C であることが推測された(Fig. 9)。



**Fig. 9 nano-LC-ESI-Qq-TOF 解析によって同定された 3 つの dynein IC2 アイソマーのアミノ酸配列のアライメント図。** 右下の凡例に示したカラーボックスは同定された各 dynein IC2 スポットの配列を示しており、アスタリスクは本解析にて検出したリン酸化サイトである。赤枠は二つの alternative splicing sites を含む領域である。

次に IC2-B と IC2-C の配列の違いを認識する Dynein IC2-C 特異的 siRNAs (329, 331) を設計し (Fig. 10-A)、この siRNA を PC12 細胞に導入することによって、spot 4, 5 が両 siRNA ともに顕著に消失することを確認した (Fig. 10-B)。従って、spot 1, 2, 3 は IC2-B、spot 4, 5 は IC2-C であることが証明された。

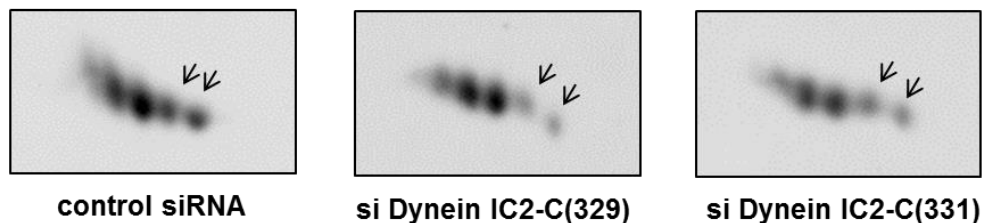
### A.



**Fig. 10** 二つの dynein IC2-C 特異的 siRNA 設計

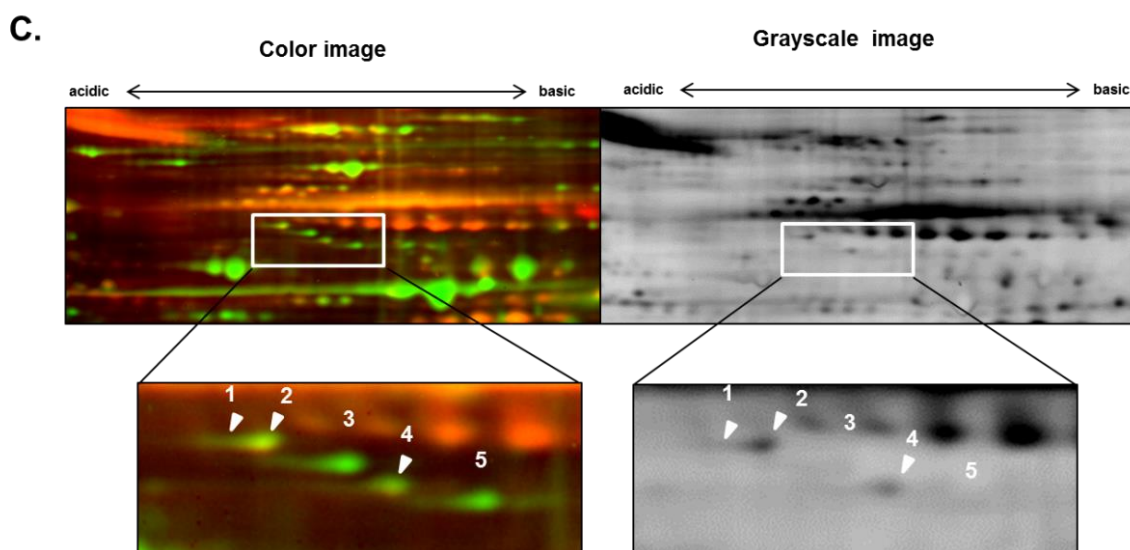
A. rat dynein IC2 isoforms IC2-A (Q62871), IC2-B (Q62871-2), IC2-C (Q62871-3) のアミノ酸配列のうち、スプライシング部位を含む部分を示している。挿入図は dynein IC2-C のスプライシング部位におけるアミノ酸部位とそれに対応している核酸の配列を示している。二つの特異的な dynein IC2-C siRNAs は二番目のスプライシングサイトを横断するように設計されている。

### B.



**B. PC12 細胞における Dynein IC2-C 特異的な siRNA の効果** PC12 細胞に control siRNA 又は dynein IC2-C (329), dynein IC2-C (331) siRNA を導入し、トランスフェクト後 48 時間で回収した。Lysate は Dynein IC 抗体を用いた二次元ウエスタンブロット解析に供した。矢印で示すスポットのみ発現の減少が確認されたため、dynein IC2-C であることがわかった。

2D-PAGE におけるこれらのスポットは等電点変動しており、翻訳後修飾を受けている可能性が考えられたため、Dynein IC2 に関わる細胞内シグナル伝達に重要であるリン酸化に注目し、リン酸化タンパク特異的染色液である ProQ-Diamond を用いて染色を行った(Fig. 10-C)。その結果、スポット 1, 2, 4 が ProQ-Diamond で染色されたため、リン酸化を受けていることがわかった。また質量分析の結果、少なくとも spot 1, 2, 4 には Dynein IC2(Q62871)の Ser 87 のリン酸化が起こっていることが判明した (Fig. 9)。



### C. ProQ-Diamond 染色によるリン酸化タンパク質の解析

2D-DIGE 解析に用いたサンプルの全てを混合したタンパク溶液(150 µg)を二次元電気泳動し、リン酸化特異的染色液 ProQ-Diamond 染色を行った。二次元ゲル上に展開された dynein IC2 のスポットは、ProQ-Diamond (green)と SYPRO Ruby (red)で染色され、Typhoon 9400 imager によって取り込まれた。各画像イメージを重ね合わせた結果、黄色で示される重なったスポット spots 1, 2, 4 は Pro-Q Diamond によって染色されたスポットである。左：カラーイメージ、右：グレースケールイメージ

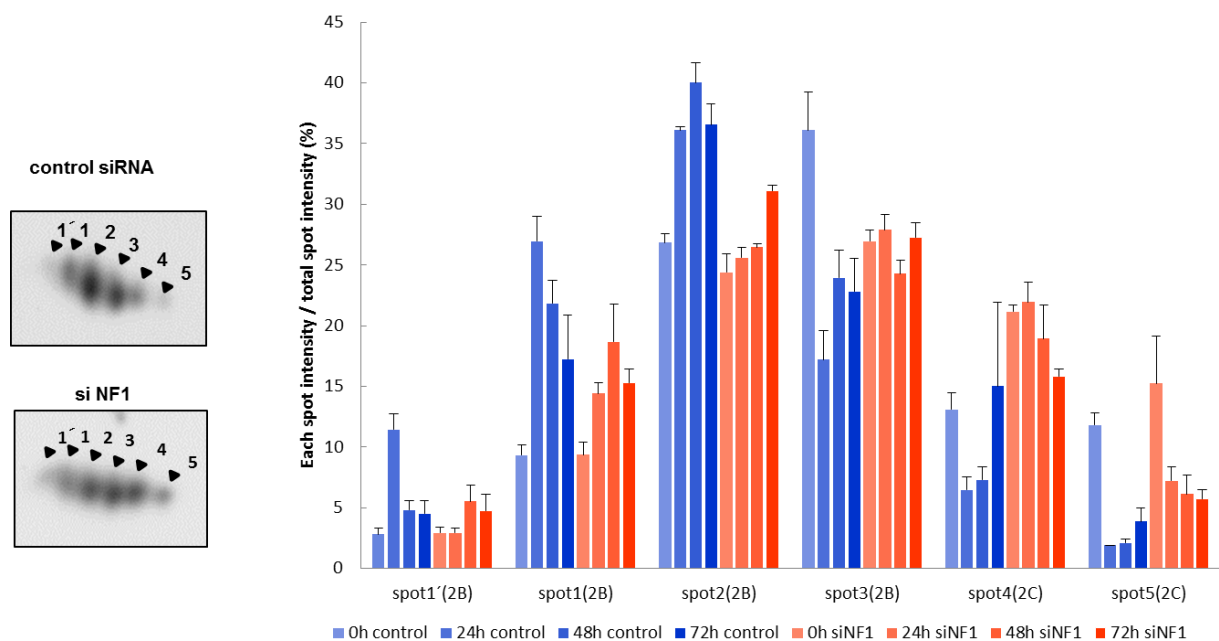
そこで、Dynein IC2 の経時的な発現変動を解析するために、Dynein IC 特異的抗体を用いて二次元ウェスタンブロット解析を詳細に行った。2D-DIGE で行った処理と同様の方法で、NF1 siRNA /control siRNA 処理細胞から lysate を調製し解析に供した。

2D-WB 解析の結果、新たに 1'スポットが検出され、Dynein IC2 positive の 6 つのスポットが確認できた(Fig.11 left panel)。各スポットの経時的な発現の変化を比較解析するために、各スポットが全スポットに占める割合を算出した(Fig. 11 right panel)。その結果、2D-DIGE の結果と同様に、スポット 1', 1, 2, 3 では control に比べて NF1-KD 細胞での発現量が低く、スポット 4, 5 では高いこと



がわかった。NGF 刺激を受けると、control 細胞ではリン酸化スポットである 1', 1, 2 は上昇し、スポット 3, 4, 5 の割合が減少するが、NF1-KD 細胞ではスポット 3, 4, 5 の割合が高く、リン酸化型の 1', 1, 2 の割合が低い。さらに NF1-KD 細胞ではリン酸化型のスポット 4 の割合が高いことがわかった。(Fig. 11 right panel)

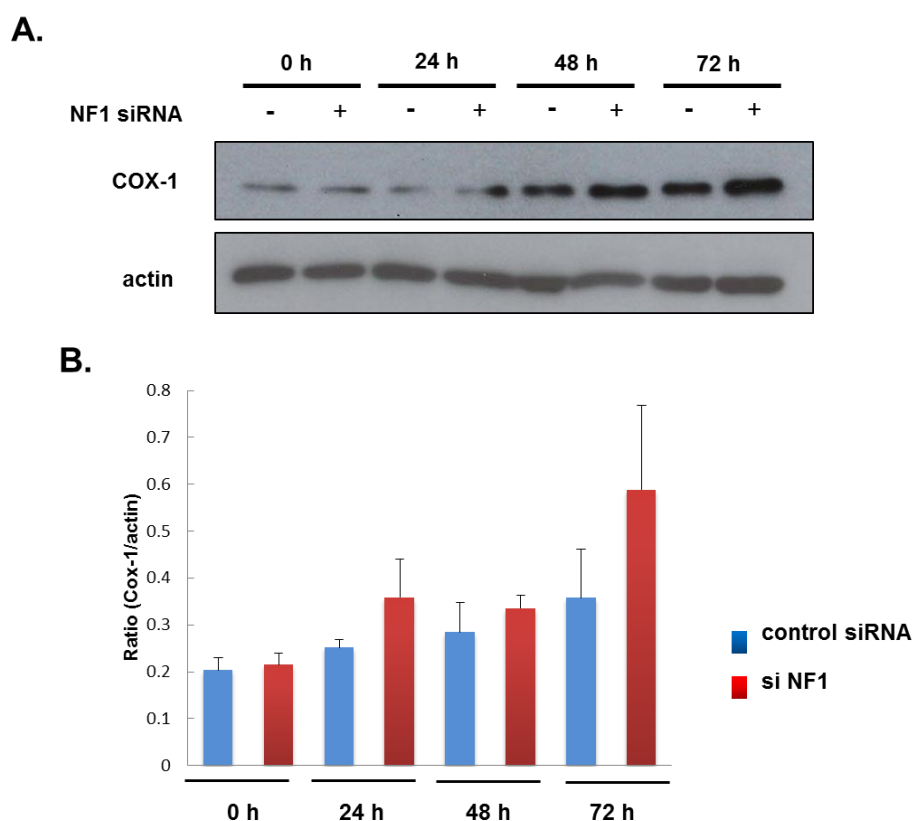
これらの結果から、Dynein IC2 は NF1 の発現抑制によって、alternative splicing とリン酸化による発現制御パターンが変動していることがわかり、これらの減少が NF1 病態モデル細胞で見られる表現型と神経系の分化異常に関連がある可能性が示唆された。



**Fig. 11** 二次元ウエスタンブロット法による dynein IC2 の同定と継時的変動解析  
 左のパネルは dynein IC 抗体による二次元ウエスタンブロットにおける dynein IC2 のスポットパターンを示している。(上 : control siRNA-treated cells、下 : NF1 siRNA-treated cells、NGF 刺激後 48 時間) タンパクスポットは 1', 1, 2, 3, 4, 5 の 6 つのスポットに対応している。PC12 細胞に各 siRNA を導入後 24 時間で NGF 刺激を行い、各タイムポイントで細胞を回収、可溶化後にウエスタンブロットを行った。ヒストグラムは、全スポットに対する各スポットの割合を示している。このデータは独立した三回の実験を行って得たものであり、エラーバーは標準誤差を示している。

### 8-8-2 NF1 ノックダウンによる COX-1 および GR の発現の変化

ネットワークを構成する分子のうち、iTRAQ 法で顕著に発現上昇する分子として同定された COX-1 (cyclooxygenase-1) について詳細な検証を行った。発現の挙動を確認するために、PC12 細胞に control または NF1 siRNA を導入し、導入後 24 時間で NGF 刺激を行った。刺激前(0 時間)、24-72 時間と継時的にサンプルを回収し、COX1 特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、control と比較して NF1-KD 細胞では COX-1 の発現量が継時的に上昇し、72 時間後には 0 時間に比較して約 3 倍、72 時間 control に比較して約 2 倍に達していることがわかった(Fig. 12 A,B)。この結果は iTRAQ による定量解析の結果とほぼ同等であった。



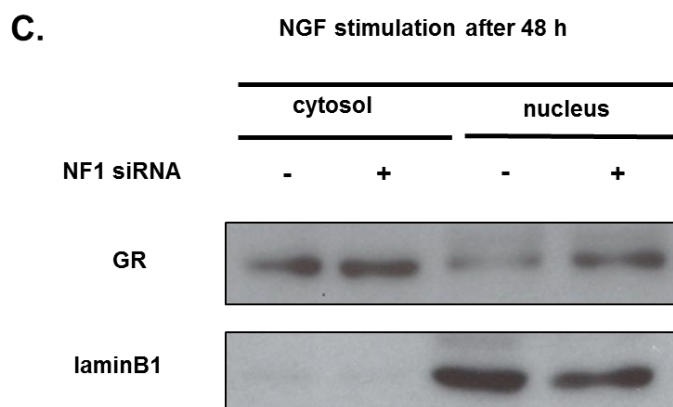
**Fig.12** 融合プロテオミクスの結果抽出された COX-1 のウエスタンブロット解析

**A, B** NF1 siRNA 又は control siRNA をトランスフェクトした PC12 細胞における COX-1 の発現量のウエスタンブロット解析

A. COX-1 の発現は COX-1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。B. COX-1 バンドの強度は ImageQuant software を用いて測定し、actin を loading control として用い、定量化を行った。データは独立した三回の実験における平均値と標準誤差を示している。

融合プロテオミクス法により抽出したネットワークにおいて、COX-1 の発現を調節する可能性があると解析された GR(glucocorticoid receptor)は、DNA マイクロアレイ解析において NGF 刺激 48 時間後には control と比較して NF1-KD 細胞では、発現が約 2 倍上昇していた。COX-1 の発現の上昇は、その転写因子である GR の活性化によるものと推測されたため、NF1 ノックダウンによる GR の活性化状態を調べた。GR は不活性化状態では細胞質に存在し、活性化すると核に移行することが報告されている(24, 25)。

PC12 細胞に control または NF1 siRNA を導入し、導入後 24 時間で NGF 刺激を行った。NGF 刺激 48h で細胞を回収し、細胞質と核画分の分画を行い、両画分において GR 抗体を用いウエスタンブロット解析を行った。その結果、NF1-KD 細胞では control 細胞と比べて細胞質核分では顕著な違いは確認できなかったが、核画分において、優位に増加していることがわかった(Fig. 12-C)。よって、NF1 ノックダウンによって GR の核への局在、すなわち転写因子としての活性化が増加していることが示唆された。



### C. GR 抗体を用いたウエスタンブロットによる GR の細胞内局在解析

PC12 細胞に control siRNA または NF1 siRNA を導入し、NGF 刺激を行って 48 時間後に細胞を回収し、細胞質画分と核画分に分画後、各画分において GR 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った(n=3)。LaminB1 は核画分のマーカーである。

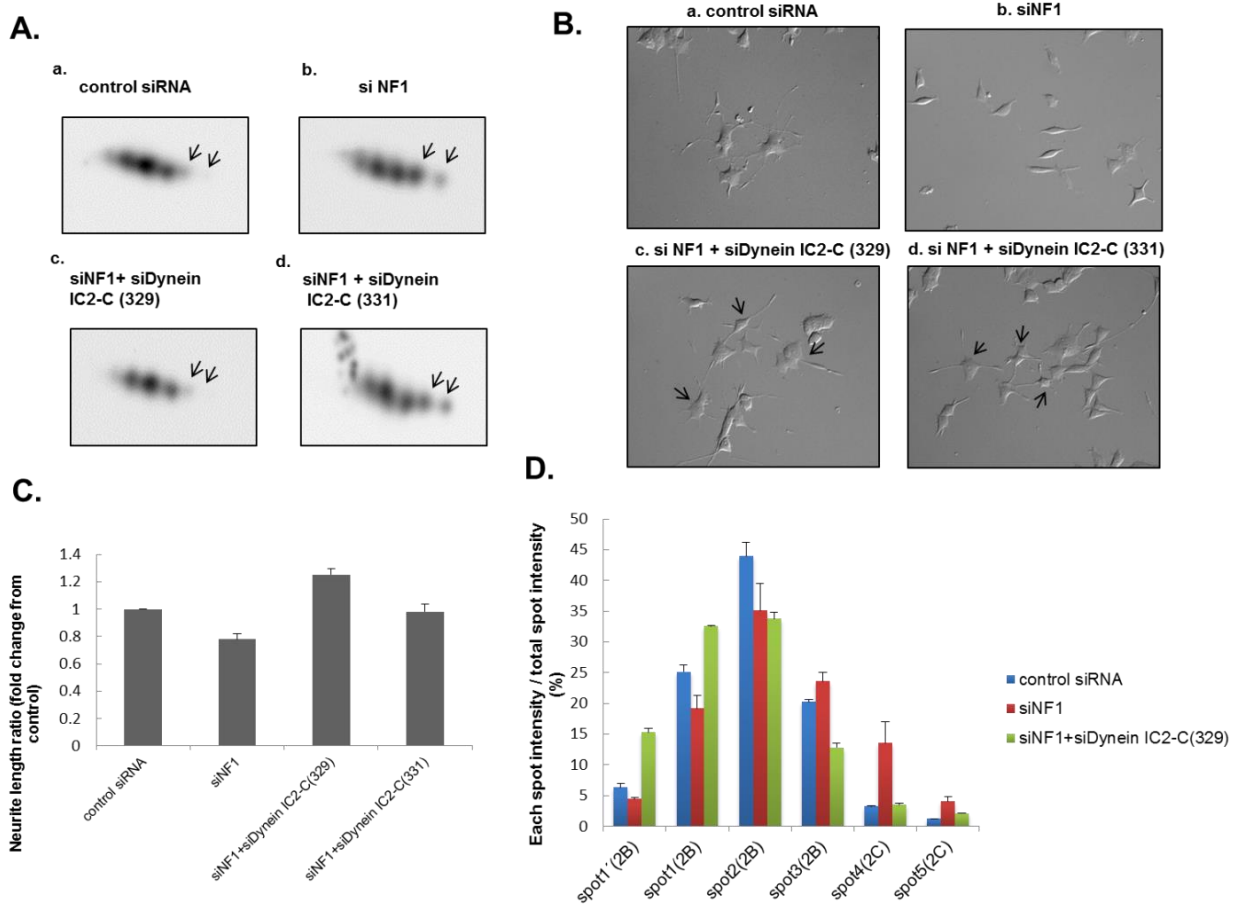
これらの結果から、NF1 ノックダウンによって、Dynein IC2-C のスプライシングによる発現上昇・リン酸化と Dynein IC2-B のリン酸化の減少、さらに、GR の核移行による活性化と、COX-1 の発現増加が連続的に起こっている可能性が示唆された。

### 8-8-3. NF1-KD 細胞における Dynein IC2-C の機能解析

Dynein IC2-C の発現とリン酸化の上昇が NF1-KD 細胞において重要なイベントであったことから、Dynein IC2-C のノックダウンによる表現型への影響を調べるために、PC12 細胞に NF1 と DyneinIC2-C の両 siRNA の共導入を行った。両 siRNA 導入後、NGF 刺激 48 時間で回収したサンプルを Dynein IC 抗体を用いて、二次元ウエスタンブロットで解析した。NF1 ノックダウンによって発現上昇したスポット 4・5 (siDynein IC2-C)は確かに発現が抑制されていることを確認した(Fig. 13-A)。この時のPC12細胞の表現型を観察したところ、NF1 ノックダウンによって退縮した神経突起が、Dynein IC2-C siRNA を共処理することによって、顕著に伸長の改善を示すことが判明した(Fig. 13-B)。続いて各細胞における神経突起の長さを定量・グラフ化したところ、二種類の siRNA (IC2-C 329,331)とも control 細胞と同等かそれ以上の長さの神経突起の伸長が確認された(Fig. 13-C)。神経突起の数に関しては変動がなかった。従って、Dynein IC2-C は NF1-KD 細胞内において、神経突起の伸長阻害に働く事が考えられた。

次に、NF1siRNA と Dynein IC2-C siRNA を PC12 細胞に共処理した時の Dynein IC2 のスプライスフォーム、及びリン酸化によってシフトした各スポットの変動を詳細に解析した。PC12 細胞に siRNA を導入後 24 時間で NGF 刺激を行い、48 時間後にサンプルを回収し、二次元電気泳動を行い、Dynein IC 抗体を用いて 2D-ウエスタンブロット解析を行い、各スポットの全スポットに占める割合を算出した。その結果、NF1 ノックダウンで上昇した Dynein IC2-C のスポット 4・5 の顕著な発現量の抑制を確認するとともに、NF1 ノックダウンで減少していた Dynein IC2-B のリン酸化スポットのうち、スポット 1'、1 において NF1 ノックダウン時と比較して増加しており、スポット 2 (リン酸化 2-B)に関しては変化がみられず、また、脱リン酸化スポット3に関しては減少した(Fig. 13-D)。これらの結果から、NF1 ノックダウンによって減少した Dynein IC2-B のリン酸化が Dynein IC2-C siRNA によって促進されたためだと考えられた。従って PC12 細胞の神経突起の伸長には Dynein IC2-B のリン酸化が重要であることが示唆された。

さらに Dynein IC と神経突起の関係を検証するために、DyneinIC2-B と-C の両方の発現を抑制する Dynein IC2 siRNA を用いて神経突起伸長に対する影響を調べた。NF1 および Dynein IC2 に対する両 siRNA 導入 24 時間後に NGF 刺激を行い、48 時間後には Dynein IC2 の発現が、効率よく抑制されている事を確認し(Fig. 14-B)、72 時間後の細胞の表現型を観察した。その結果、NF1 ノックダウンにより神経突起伸長が阻害された PC12 細胞の突起の伸長の回復は見られなかった(Fig. 14-A)ことから、NF1-KD 細胞における神経突起伸長阻害の回復には、IC2-B 自身の存在とそのリン酸化が重要であることが示唆された。



**Fig. 13** NF1-KD PC12細胞における神経突起伸長の阻害は dynein IC2-C のノックダウンによって回復する  
 PC12 細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA 単独導入、又は NF1 siRNA と dynein IC2-C (329/331) siRNA を共導入し、NGF 刺激を行った。48 時間後細胞を回収し、dynein IC 抗体を用いて二次元ウエスタンブロット解析を行った。また 72 時間後に神経突起の長さの測定を行った。

**A.** siRNA 導入後の dynein IC2 のスポットパターンのウエスタンブロット解析

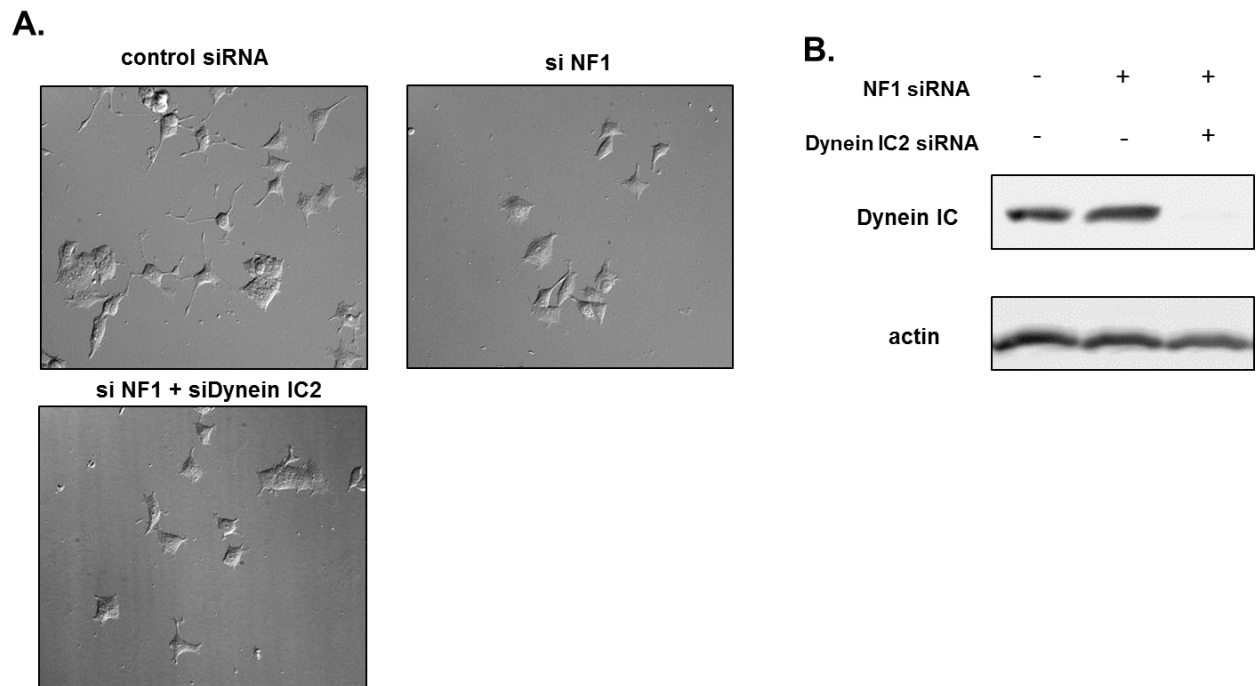
Control siRNA **[a]**, NF1 (249) siRNA **[b]**, NF1 (249) siRNA, dynein IC2-C (329) siRNA **[c]** NF1 (249) siRNA, dynein IC2-C (331) siRNA **[d]**.

**B.** NGF 刺激後 72 時間の細胞の形態観察

**C.** siRNA を処理した PC12 細胞の神経突起の長さの測定  
 縦軸には PC12 細胞の神経突起の長さの平均を示しており、データは独立した三回の実験における平均値と標準誤差を示している。各測定では、最低 50 細胞を測定に用いた。

**D.** NF1 siRNA と dynein IC2-C (329) siRNA のトランスフェクション後の dynein IC2 のスポット強度の比較

ヒストグラムは各サンプルにおける dynein IC2 の全スポットの割合に対する各スポットの割合で示している。二次元ウエスタンブロットでは dynein IC 抗体と Cy5 標識された二次抗体を用いることで定量解析を行った。データは独立した三回の実験における平均値と標準誤差を示している。

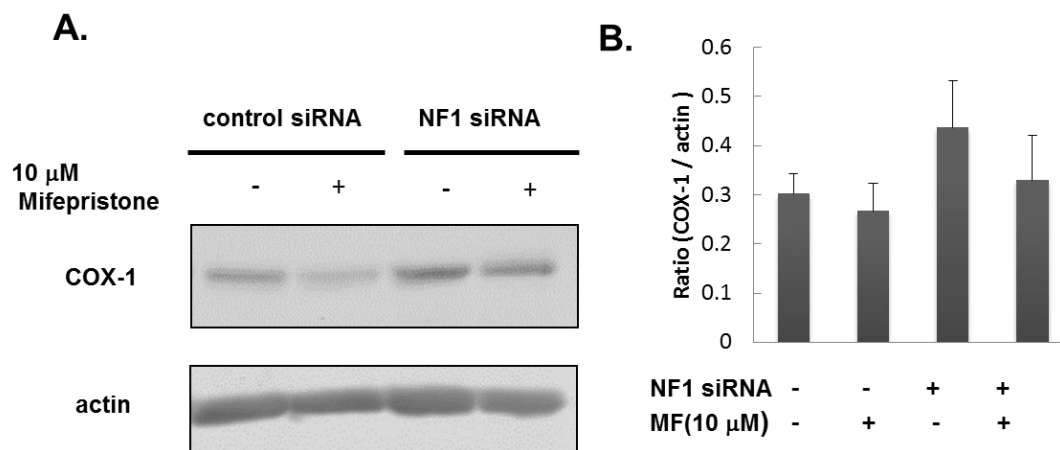


**Fig. 14 PC12 細胞の神経突起伸長における pan-dynein IC2 siRNA の効果**

A. PC12 細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA 単独導入、又は NF1 siRNA と pan dynein IC2 siRNA を共導入し、NGF 処理後 72 時間の細胞の形態を微分干渉顕微鏡で観察を行った。B. NGF 刺激 48 時間後に細胞を回収し、dynein IC 抗体を用いたウエスタンブロット解析で dynein IC の発現を解析したところ、Dynein IC2 siRNA 処理は全ての dynein IC2 アイソマーの発現抑制に効果があった。

#### 8-8-4. Dynein IC2-GR-COX-1 のネットワークの検証

Fig. 3B の結果より NF1 ノックダウンにより継時的に発現上昇した COX-1 は、GR による発現制御を受けている可能性を示したが、より詳細にこれらの相互作用を検証するため、GR のアンタゴニストである Mifepristone 処理を行い、COX-1 発現への影響を調べた。PC12 細胞に control または NF1 siRNA を導入した 24 時間後、30 分間 10 $\mu$ M Mifepristone 処理を行い、NGF 刺激を行った。NGF 刺激 48 時間後にサンプルを回収し、COX-1 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、NF1 ノックダウンにより発現上昇していた COX-1 は Mifepristone 処理によって、control(未処理)と同等の量まで発現が減少した(Fig. 15-A,B)。control の COX-1 の発現量も Mifepristone 処理により減少していることから、COX-1 は GR によって発現調節を受けていることがわかった。

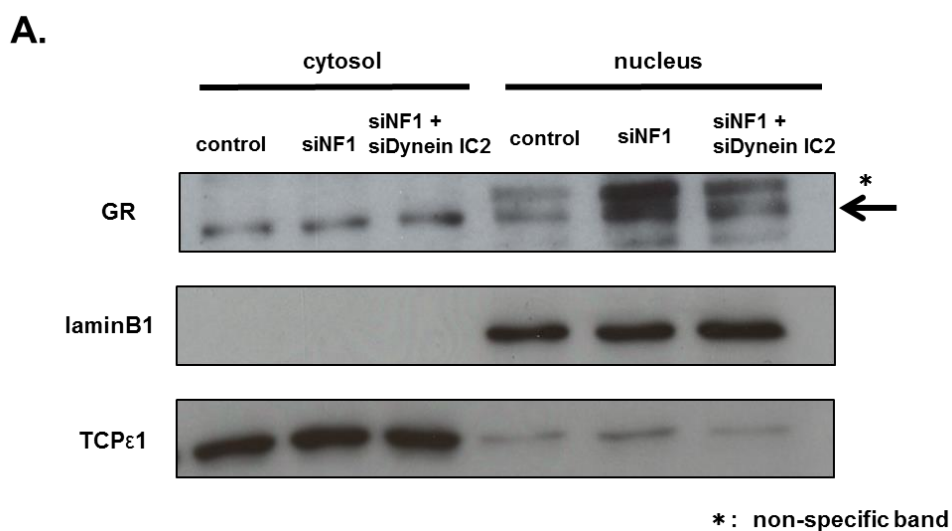


**Fig. 15** NF1-KD PC12 細胞において発現上昇した COX-1 は GR アンタゴニストの Mifepristone によって発現抑制される

A,B PC12 細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA を導入 24 時間後、10  $\mu$ M mifepristone を 30 分処理し、NGF 刺激を行った。刺激 48 時間後に細胞は回収し COX-1 の発現をウエスタンブロット法で測定した。Actin は loading control として用いた。また、B は actin で補正した COX-1 の発現量比をヒストグラムに示している。この結果は独立した三回の実験で得られたものでエラーバーは標準誤差を示している。

GRが活性化し核移行する時には微小管やシャペロンタンパク質や Dynein 等と複合体を構成して移行することが知られている(26-28)。特に、Dynein IC は積荷タンパク質との結合に重要であると考えられており(18)、Dynein IC2 が GR の輸送に関与し、GR の核移行が増加することで COX-1 の転写が活性化する経路が考えられたことから、この経路を証明するため、Dynein IC2 の発現抑制を行い、GR の活性化および COX-1 発現に与える影響を調べた。

まず、Dynein IC2 が NF1 ノックダウン時に増加した GR の核局在の変化に関与を調べるために、Dynein IC2 siRNA を共処理し、GR の細胞内局在についてウエスタンブロット解析を行った。PC12 細胞に siRNA を導入し、導入後 24 時間で NGF 刺激を行った。NGF 刺激 48 時間で細胞を回収し、細胞質と核画分の分画を行い、両画分において GR 抗体を用い、ウエスタンブロット解析を行った(Fig. 16-A)。その結果、NF1 ノックダウンによって核局在を示した GR の量が Dynein IC2 siRNA との共処理によって減少することがわかった。



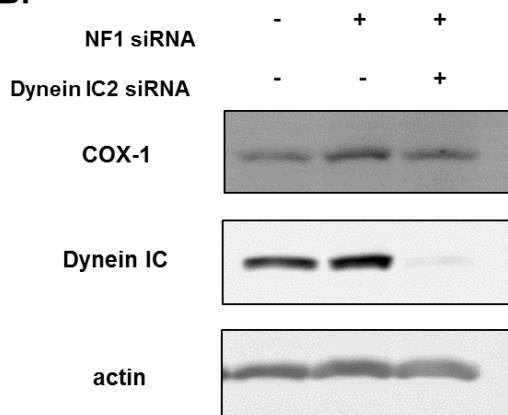
**Fig. 16** NF1 ノックダウン細胞における Dynein IC2 の発現抑制は GR の核移行を減少させる  
PC12 細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA 単独導入、又は NF1 siRNA と dynein IC2 siRNA を共導入し、NGF 刺激 48 時間後に細胞を回収し、細胞質画分と核画分の分画を行った。その後両画分を GR 抗体によるウエスタンブロット解析を行った。TCPε1 は細胞質画分マーカー、Lamin B1 は核画分マーカーである。

次に、NF1 siRNA と Dynein IC2 siRNA の共導入による COX-1 の発現変化を解析した。NF1 ノックダウンによって発現上昇した COX-1 は、Dynein IC2 siRNA を共に処理することによって、

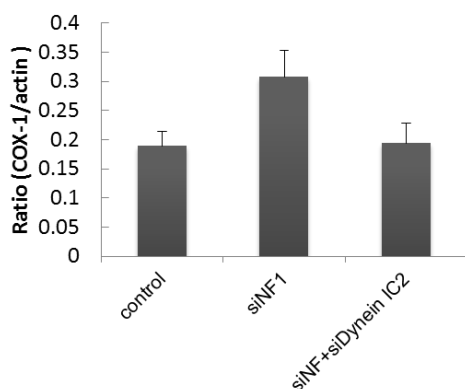


control 細胞と同程度まで発現量が減少した(Fig. 16-B, C)。しかしながら、Dynein IC2-C siRNA を共処理した時は COX-1 の発現変動に影響は見られなかった(Fig. 16-D)。従って、COX-1 の発現に影響を与える GR の輸送には少なくとも Dynein IC2-B あるいは-B および-C 両者の相互作用が重要であることが考えられた。

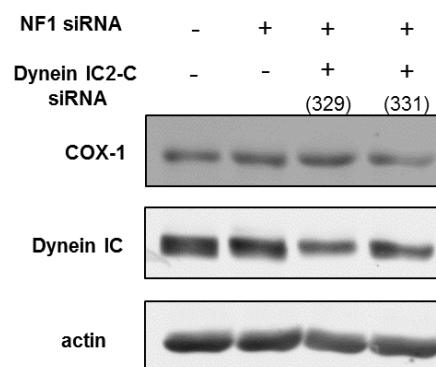
## B.



## C.



## D.



### B, C COX-1 の発現は dynein IC2 siRNA 処理によって減少する

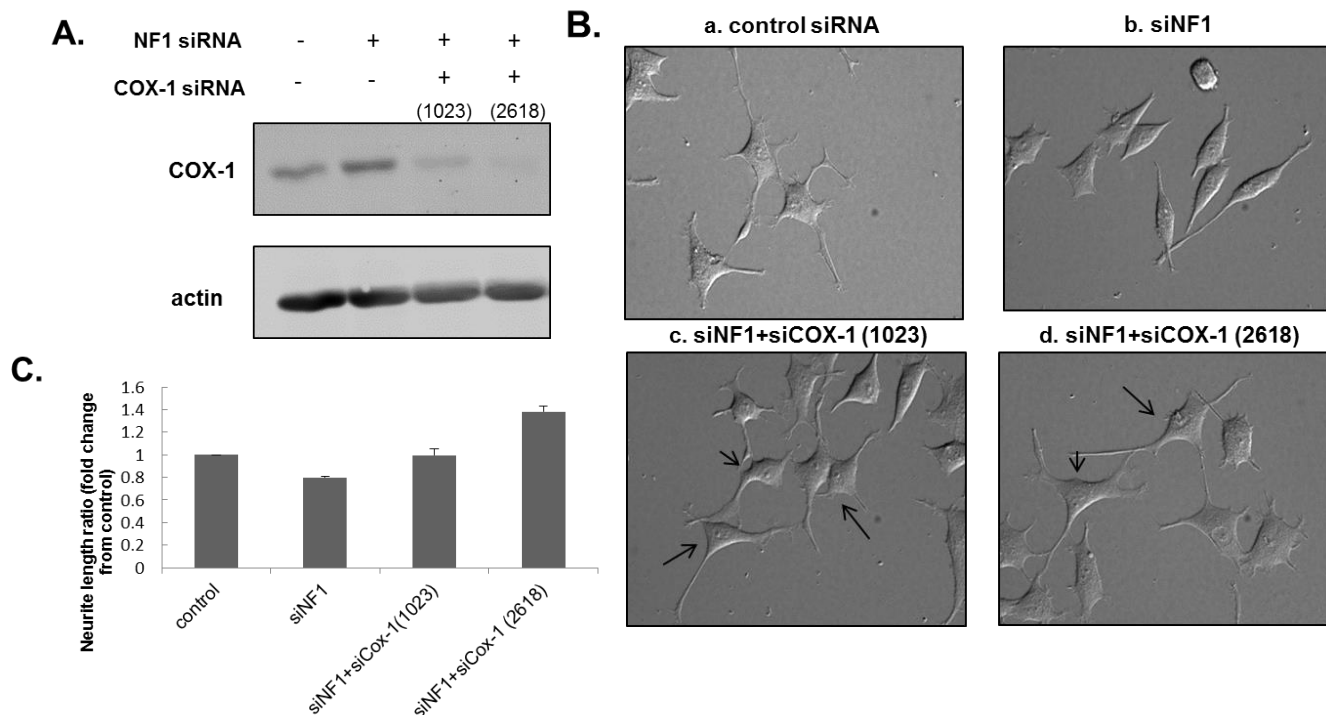
PC12 細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA 単独導入、又は NF1 siRNA と dynein IC2 siRNA を共導入し、NGF 刺激後 48 時間で細胞を回収し、COX-1 抗体によるウエスタンブロット解析を行った。actin は loading control として用いた。また、B は actin で補正した COX-1 の発現量比をヒストグラムに示している。この結果は独立した三回の実験で得られたものでエラーバーは標準誤差を示している。

### D. NF1-KD PC12 細胞における dynein IC2-C siRNA の COX-1 の発現に対する影響

PC12 細胞に control siRNA、NF1 siRNA(249)又は NF1 siRNA、dynein IC2-C (329 or 331) siRNAs をそれぞれ導入し、NGF 刺激を行い 48 時間後に回収し、COX-1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

### 8-8-5. NF1-KD 細胞における COX-1 の機能解析

次に、NF1 のノックダウンによって発現上昇する COX-1 について、siRNA を用いた発現抑制実験を行った。まず NF1-KD 細胞に COX-1 siRNA を導入したことによる表現型の影響について調べた。NF1 ノックダウンによって発現上昇した COX-1 は NF1 siRNA との共処理によって発現が抑制されていることを確認した(Fig. 17-A)。また、COX-1 siRNA を共処理した NF1-KD PC12 細胞では神経突起の伸長が観察された(Fig. 17-B)。各細胞における神経突起の長さを定量したところ、NF1 ノックダウン時に見られた神経突起の退縮という表現型が、COX-1 siRNA を共処理し発現を抑制することによって、control 細胞と同程度で NF1 siRNA 処理のみの場合の最大 1.8 倍の神経突起の伸長改善が見られた(Fig. 17-C)。神経突起の数については細胞間で顕著な差は見られなかった。これらの結果から、PC12 細胞において NF1 ノックダウンにより過剰に合成された COX-1 の発現を抑制することによって、神経突起退縮の改善が起こることがわかった。



**Fig. 17** NF1-KD PC12 細胞における神経突起伸長阻害は COX-1 のノックダウンによって回復する。

A. PC12 細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA 単独導入、又は NF1 siRNA と COX-1 (1023/2618) siRNA を共導入し、NGF 刺激後 48 時間で細胞を回収し、COX-1 の発現量をウエスタンブロットにて解析した。actin は loading control として用いた。

B. PC12 細胞に control siRNA 又は NF1 siRNA 単独導入、又は NF1 siRNA と COX-1 (1023/2618) siRNA を共導入し、NGF 処理後 72 時間の細胞の形態を微分干渉顕微鏡で観察した。C. siRNA 処理を行った PC12 細胞の神経突起の長さの計測を行った。縦軸には PC12 細胞の神経突起の長さの平均が示している。データは独立した三回の実験における平均値と標準誤差を示している。各測定では、最低 50 細胞を測定に用いた。

## 9. 考察

本研究では、融合プロテオミクス法を用いることによって、NF1 病態モデル PC12 細胞における神経細胞様分化異常に連動して変動する分子ネットワークメカニズムの一旦を明らかにした。すなわち、Dynein IC2-GR-COX1 signal が、NF1 欠損細胞内で特異的に活性化して、神経系細胞の分化異常に関わっていることを初めて示した。神経線維腫症 I 型の原因遺伝子産物 neurofibromin は Ras-Gap と相同配列を持ち、Ras を負に制御しているが、現在までにその他の機能はあまり解明されていない。本研究で用いた NF1 欠損 PC12 細胞は、神経突起に関する表現型を観察できる利点があり、NF1 欠損による神経分化異常病態を分子レベルで詳細に解析するための有用な病態モデルである。neurofibromin の機能とその機能欠損による NF1 の発症メカニズムを解明し、治療や創薬に有効であるマーカーや標的を探索するために、本病態モデル細胞を用いて、mRNA とタンパク質の発現を網羅的に解析する新しい融合プロテオミクス法を用いた実験に応用した。

### 9-1. 融合プロテオミクス法による NF1 病態モデル細胞の解析について

mRNA とタンパク質の発現量と翻訳後修飾を一度に網羅的に解析する融合プロテオミクス法は、同じサンプルから回収した mRNA/タンパク質を用いることで、NF1 ノックダウン時に起こる分子群の変化を網羅的に捉えることができる。本研究では PC12 細胞が NGF 処理によって神経突起を伸長させる過程で起こる変化が、NF1 のノックダウンによってどのように変動するかを経時的にとらえた。経時的な mRNA とタンパク質の変動を見ることで、今までは一点のみで見てきた現象が、mRNA に変動が起こることによるタンパク質の影響や、また合成されたタンパク質が mRNA に与える影響の変化を捉えることが可能となる。実際、今回の解析では、mRNA の時間経過による発現変動のパターンと、プロテオミクスで得られたパターンでは、タイムラグが生じており、それぞれの時間における発現解析結果をクラスター解析すると、24 時間の mRNA において変動した分子群がプロテオミクスの 24 時間以降の動きに反映されて変動していることを見出した。このことから、mRNA レベルとプロテオームレベルにおいて発現変動を連続的にダイナミックに捉えることが可能な点が融合プロテオミクスの利点の 1 つである。

さらに、2 つ目の利点として、mRNA とタンパク質の発現の絶対量のレベルや安定性の違いから、同定できない分子が存在することがあるが、相互に同定されない分子を補完することが可能となることである。3 番目の利点として、mRNA やタンパク質の発現量のみ

では変動が検出できなくても、翻訳後修飾の変動を捉える事ができることである。

本研究では、融合プロテオミクス手法を用いて Dynein IC2-GR-COX-1 経路が NF1 病態モデル細胞において発現亢進していることを新たに発見した。Dynein IC2 は 2D-DIGE 法、GR は DNA array、COX-1 は iTRAQ 法でそれぞれ同定された分子であり、各手法を組み合わせ、分子間相互作用を総合的に見ることによって、GR を輸送する Dynein 複合体を構成する分子群と COX-1 の挙動を捉えることに初めて成功した。

## 9-2. NF1 ノックダウン細胞における Dynein IC2 の挙動

Dynein はモータータンパク質の一つで、様々なタンパク質や細胞小器官を輸送する役割を担っており、特に神経細胞では、モータータンパク質である kinesin と共に、情報伝達物質の輸送・取り込みに関わる重要なタンパク質である(15)。

融合プロテオミクス法で検出された Intermediate chain2(IC2)は rat では3つのアイソフォームが存在し(23)、神経細胞では IC2-A,-B,-C が発現しており、神経細胞以外では IC2-C がユビキタスに発現している(29)。過去には神経系モデル細胞である PC12 細胞での研究が行われており、NGF 刺激を行うと、IC2-C がメインの発現状態から IC2-B 優位の発現変動が起こることが報告されている(29)。つまり、NGF 刺激を受けて神経分化する際に、IC2-C から IC2-B へのスプライシングの切り替えが行われる可能性が示唆されている。スプライシングの切り替え機構やそれを制御する酵素については未だ解明されていないが、複数のアイソフォームが協調して輸送の役割を行っていることが示唆される。二次元電気泳動法で等電点と分子量を解析した結果、NF1 のノックダウンにより、Dynein IC2 のスプライシングが IC2-C 優位になるように調節を受けることがわかった(Fig. 11)。特に NGF 刺激前から IC2-C の割合がコントロールと比べて高く、刺激後もコントロールと比べて発現が高い。一方 NF1 のノックダウンによって IC2-B のリン酸化の割合が減少していることがわかる(Fig. 11)。これらの結果から、通常の神経突起が伸長する時に起こる Dynein IC2-B のリン酸化が、NF1-KD 細胞ではより多く発現している IC2-C に優先的にリン酸化が起こり、IC2-B のリン酸化が阻害されてしまうことによって、神経突起が伸長しない表現型が現れるということが推察された。IC のリン酸化酵素は casein kinase(30, 31)、polo-like kinase(32)等の報告はあるが、詳細な個々のリン酸化部位に対する責任酵素は未だ同定されていない。

Dynein IC2-C を NF1-KD 細胞に共処理したところ、退縮していた PC12 細胞の突起伸長が回復するという結果が得られた(Fig. 13-B,C)。この際の Dynein IC2 のスポット変動を解析した結果、リン酸化 IC2-B である spot1,2 が NF1 ノックダウン時と比べて上昇してい

ることがわかった(Fig. 13-D)。従って、神経突起の伸長には IC2-B のリン酸化が必要であることが明らかになった。しかし spot3 (IC2-B)のリン酸化については回復していないため、spot3 のリン酸化は IC2-C とは異なるリン酸化酵素によってリン酸化を受ける可能性、および、IC2-B 特異的な部位のリン酸化の可能性が考えられた。

### 9-3. NF1 ノックダウン細胞における GR の挙動

DNA array 法にて NF1 ノックダウンによって発現上昇すると検出した GR は、核内レセプターの一つで、不活性化状態では細胞質に存在し、活性化すると核へ輸送されることが知られている(24)。GR は過剰発現すると脳内の海馬を委縮させることやうつ病との関与が報告されており(33)、神経系の細胞には非常に重要な因子である。

NF1 のノックダウンによって GR の mRNA 発現量が増加するのに加えて核への局在が増加していることがわかった。ネットワーク解析の結果、NF1 ノックダウン細胞において 14-3-3 eta の発現量が、mRNA、タンパク質とともに上昇していることがわかった。14-3-3 eta は核内にも存在し、ステロイド等の刺激によって活性化することが知られている(34)。

また 14-3-3 eta は GR と相互作用することが報告されており、ユビキチン化を受けて分解される前に GR と結合することにより、ユビキチン化を阻害し、GR の分解を阻害することが報告されている(34)。従って NF1 ノックダウンによって GR が核移行しやすくなると共に、14-3-3 eta のような分解を阻害するタンパク質の発現亢進によって、GR が核内に留まり、転写因子として長く働く環境が整っていることが、NF1 の病態に関与している可能性が示唆された。

### 9-4. NF1 ノックダウン細胞における COX-1 の挙動

核移行した GR は転写因子として機能し、様々な遺伝子の発現を調節すると予測されるが、下流の因子の中で融合プロテオミクスの結果顕著に発現変動していたのが、COX-1 だった。COX はプロスタグランジン合成酵素で、アラキドン酸をプロスタグランジン G/H に合成する働きを持つ(35, 36)。COX には発現する部位の異なる COX-1.2 のアイソフォームが存在し、炎症反応等により発現誘導される(37)COX-2 とは異なり、COX-1 は通常の組織に恒常的に発現しているという特徴がある。COX-2 は MPNST を含むがん細胞において発現が上昇し、プロスタグランジン(PGs)の合成を挙げ、炎症反応や細胞増殖に働きかけるとい報告があり(38-40)、治療ターゲットとして様々な研究が行われている(41, 42)。一方、COX-1 については胃の粘膜保護や血流維持などの機能が知られているが(43)、疾患に関与

する報告はあまりない。

近年、ミクログリアに存在する COX-1 が脳の炎症に関与していることが報告されている(33, 44)。このような脳の慢性炎症には COX-2 ではなく、COX-1 が関与していることから、近年改めて COX-1 の機能が見直されている。また、PC12 細胞に NGF 処理を行い神経系細胞に分化させる過程において遅い時間において COX-1 の発現が上昇することが報告されており(45, 46)、分化との関与が示唆されている。COX-1 の発現は AP-2 等の転写因子によって誘導されることが報告されているが、GR と sp3 によっても転写活性が誘導されることが報告されている(22)。本研究では、NF1 ノックダウンによって発現上昇する COX-1 は GR の制御を受けていることが初めて証明された。

#### 9-5. NF1 ノックダウン細胞において亢進していた Dynein IC2-GR-COX-1 signal について

本論文では、NF1 ノックダウンによって起こる dynein IC2 と GR-COX-1 の経路が連繫していることを初めて証明した。NF1-KD 細胞に dynein IC2 siRNA を処理することによって、GR の核への局在が阻害され COX-1 の発現量も減少した。しかし、実際 GR の輸送に関与しているのはどの Dynein IC2 アイソフォームであるか、またリン酸化の関与は明らかにできなかった。Dynein IC2-C のノックダウンによって COX-1 の発現量が減少しなかったことから、IC2-B が GR の輸送に関与している可能性が考えられる。また神経細胞では Dynein IC2-B と IC2-C が相互作用することで正常な核輸送を担っているのかもしれない。

Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルの下流にあたる COX-1 を NF1-KD PC12 細胞に siRNA を用いて発現抑制したところ、退縮していた神経突起の伸長が回復することがわかった(Fig. 17-B, C)。COX-1 siRNA を NF1-KD 細胞に共処理することで、神経突起の伸長が改善されることから、NF1 ノックダウンによって発現が上昇した他のタンパク分子群の中での相互作用による影響が考えられる。COX-1 によって合成された PGs は、細胞外に放出され、自身や他の細胞においてその影響を与える。PGs の中で、PGE2 の受容体は EP1, EP2, EP3, EP4 であり(47)、DNA array の結果の各レセプターの発現量を見てみると、EP2 の発現量が NGF 刺激 48 時間後に、EP3 の発現量が 72 時間で上昇していることがわかった。過去の文献によると、過剰な PGE2 の合成によって EP2 や EP4 が活性化し、癌細胞において細胞増殖と細胞生存能が亢進することが報告されている(48, 49)。また、EP3 レセプターは細胞外の PGE2 と結合することにより、G タンパクと共役することで細胞内の cAMP の量を下げる働きを持っており、又 Rho を活性化させることが報告されている(50, 51)。RhoA の活性化は、我々の研究室で NF1 欠損 HeLa 細胞において報告しており(52)、また、RhoA

の活性化によって PC12 細胞の神経突起の退縮が起こることは多数報告されている(50, 51)。

従って、NF1 ノックダウン細胞において COX-1 の発現上昇が起こりプロスタグランジン E2 の合成が亢進した結果、EP3 レセプターを介して RhoA が活性化し、神経突起の退縮に関与した可能性が考えられる。従って、COX-1 をノックダウンすることで神経突起の退縮の改善がみられたと推測される。

#### 9-6. Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルと神経系における neurofibromin の関与について

今回発見した Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルは NF1 関連において新規の経路である。この経路の最下流である COX-1 はアラキドン酸をプロスタグランジン G/H に合成する働きを持つが、このアラキドン酸は細胞膜中のリン脂質に存在し、ホスホリパーゼ A2(cPLA-2) の働きにより、アラキドン酸として遊離される。従って COX-1 の発現増加によって PGE の生産が増加し、Ras-MAPK 経路が上昇している可能性も考えられる。また、NF1 ヘテロマウスでは神経系の細胞において Ras が過剰に活性化すると、海馬において GABA の放出が活性化することが報告されている(53)。これらの Ras の異常な活性化が神経系の細胞に影響を及ぼし、神経細胞の分化・成熟の異常を引き起こし、学習記憶障害を引き起こしているのかもしれない。また、KRas、Raf、SOS 等の Ras-MAPK シグナル上に存在する分子の異常によって生じる疾患であるヌーナン症候群、レオパード症候群などでは心奇形、骨格異常、精神遅滞、特徴的顔貌といった症状が生じ(54)、レオパード症候群ではカフェオレスポットが生じるなどの NF1 と同じような皮膚症状もある。従って Ras-MAPK 活性化と神経系の異常に関係があることが示唆されるが、神経線維腫を生じるなどの多彩な症状を呈するのは NF1 遺伝子欠損による NF1 のみであることから、Ras-GAP 以外の機能のさらなる解明が望まれる。

また、学習障害に関する研究で、NF1 ヘテロ細胞において cAMP 量の減少により、DRG ニューロンの神経突起伸長が阻害されるという報告がされている(55)。ショウジョウバエを用いた研究では neurofibromin は Ras と cAMP の両方の経路を調節し、アデニルシクラーゼ活性は学習と関与している報告もある(56)。このように NF1 患者で生じる学習機能障害は、Ras の活性化と cAMP 経路が関与しており、本研究で明らかとなった COX-1 を最下流とするシグナルも、これらの経路に関与している可能性があり、さらなる研究が必要である。

### 9-7. neurofibromin の機能と neurofibroma formation における微小環境について

末梢神経には、ニューロンと軸索を包んでいるシュワン細胞、線維芽細胞、周膜細胞から構成する鞘を神経周膜が包んで束となって存在している。しかし neurofibroma では、シュワン細胞、ニューロン、線維芽細胞、マスト細胞等が増殖亢進し、コラーゲンに富む軟らかい腫瘍を形成している(57)。神経線維腫症 I 型の患者の細胞では 2 つのアレルのうち元々片方機能欠損しているが、これらの細胞群の中でもシュワン細胞内の neurofibromin が両アレルとも欠損すると prexiform neurofibroma になり、悪性化する可能性が高くなる。

また、NF1+/ニューロンは神経突起伸長阻害等により、シュワン細胞と正常に接着・相互作用できずミエリン化が不完全になる(4, 58)。ニューロンとの接触を失ったシュワン細胞は増殖し、線維芽細胞はコラーゲンの生産を増加し、マスト細胞は活性化することで互いの細胞間シグナルに異常な影響を与えることが neurofibroma の原因の一つとも言われる(59)。

シクロオキシゲナーゼは、プロスタグランジンを産生することで痛みや炎症を引き起こす。NF1 患者の neurofibroma 内では、COX-1 が恒常的に発現することで、慢性的な炎症状態が起こっている可能性がある。炎症反応が恒常的に起こることによりマスト細胞がさらに活性化し、シュワン細胞や線維芽細胞を増殖させる因子を放出し、neurofibroma の形成に寄与している可能性も考えられる。NF1 患者の neurofibroma では、痒みや痛みが生じることが知られていることから、COX-1 と NF1 病態に関しては治療の観点から興味深い。COX-1 が生じるプロスタグランジンの阻害薬に関しては、インドメタシンなどの消炎鎮痛剤をはじめ開発が進んでおり、将来的には COX-1 選択的阻害剤が NF1 患者の皮膚の痛み症状を改善することができる可能性が推測される。



## 10. 結語

本研究では、NF1 病態モデル PC12 細胞において新規に開発した融合プロテオミクス法によって Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルの活性化による COX-1 の発現が NF1 ノックダウン細胞において亢進していることを見出した。

神経線維腫症 I 型で生じる神経系分化異常を始めとした多彩な症状の発症は、これらのシグナルの制御異常に関与している可能性が考えられる。またこのシグナル経路の抑制は、新たな治療ターゲットとなるかもしれない。特に COX-1 は現在鎮痛剤等で治療に使われているが、NF1 フェノタイプである神経突起の退縮を回復させたことから、今後 NF1 の治療において細胞の分化に焦点を当てた有用なターゲットになる可能性が示唆された。

## 11. 参考文献

1. Bernards, A. (1995) Neurofibromatosis type 1 and Ras-mediated signaling: filling in the GAPs. *Biochim. Biophys. Acta* 1242, 43-59.
2. 吉田, 雄., 久保田, 由., 金田, 眞., 土田, 哲., 松永, 佳., 中川, 秀., 新村, 眞., 大塚, 藤., 中山, 樹. (2008) 神経線維腫症 1 型(レックリングハウゼン病)の診断基準および治療ガイドライン. *日本皮膚科学会雑誌* 118, 1657-1666.
3. Stephens, K., Riccardi, V. M., Rising, M., Ng, S., Green, P., Collins, F. S., Rediker, K. S., Powers, J. A., Parker, C., and Donis-Keller, H. (1987) Linkage studies with chromosome 17 DNA markers in 45 neurofibromatosis 1 families. *Genomics* 1, 353-357.
4. Cichowski, K., and Jacks, T. (2001) NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104, 593-604.
5. Cawthon, R. M., Weiss, R., Xu, G. F., Viskochil, D., Culver, M., Stevens, J., Robertson, M., Dunn, D., Gesteland, R., O'Connell, P., and et al. (1990) A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 62, 193-201.
6. Nishi, T., Lee, P. S., Oka, K., Levin, V. A., Tanase, S., Morino, Y., and Saya, H. (1991) Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. *Oncogene* 6, 1555-1559.
7. Guo, H. F., Tong, J., Hannan, F., Luo, L., and Zhong, Y. (2000) A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. *Nature* 403, 895-898.
8. Gregory, P. E., Gutmann, D. H., Mitchell, A., Park, S., Boguski, M., Jacks, T., Wood, D. L., Jove, R., and Collins, F. S. (1993) Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. *Somat. Cell Mol. Genet.* 19, 265-274.
9. Rosser, T. L., and Packer, R. J. (2003) Neurocognitive dysfunction in children with neurofibromatosis type 1. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 3, 129-136.
10. Costa, R. M., Federov, N. B., Kogan, J. H., Murphy, G. G., Stern, J., Ohno, M., Kucherlapati, R., Jacks, T., and Silva, A. J. (2002) Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature* 415, 526-530.
11. Costa, R. M., Yang, T., Huynh, D. P., Pulst, S. M., Viskochil, D. H., Silva, A. J., and Brannan, C. I. (2001) Learning deficits, but normal development and tumor predisposition, in mice lacking exon 23a of Nf1. *Nat. Genet.* 27, 399-405.
12. Li, W., Cui, Y., Kushner, S. A., Brown, R. A., Jentsch, J. D., Frankland, P. W., Cannon, T. D., and Silva, A. J. (2005) The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr. Biol.* 15, 1961-1967.
13. Yunoue, S., Tokuo, H., Fukunaga, K., Feng, L., Ozawa, T., Nishi, T., Kikuchi, A., Hattori, S., Kuratsu, J., Saya, H., and Araki, N. (2003) Neurofibromatosis type I tumor suppressor

neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GTPase-activating protein function toward Ras. *J. Biol. Chem.* 278, 26958-26969.

14. Patrakitkomjorn, S., Kobayashi, D., Morikawa, T., Wilson, M. M., Tsubota, N., Irie, A., Ozawa, T., Aoki, M., Arimura, N., Kaibuchi, K., Saya, H., and Araki, N. (2008) Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. *J. Biol. Chem.* 283, 9399-9413.

15. Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610-638.

16. Schnapp, B. J., and Reese, T. S. (1989) Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1548-1552.

17. Schroer, T. A., Steuer, E. R., and Sheetz, M. P. (1989) Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles. *Cell* 56, 937-946.

18. Vaughan, P. S., Leszyk, J. D., and Vaughan, K. T. (2001) Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin. *J. Biol. Chem.* 276, 26171-26179.

19. Eschbach, J., and Dupuis, L. (2011) Cytoplasmic dynein in neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* 130, 348-363.

20. Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2012) On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* 13, 364-374.

21. Ha, J., Lo, K. W., Myers, K. R., Carr, T. M., Humsi, M. K., Rasoul, B. A., Segal, R. A., and Pfister, K. K. (2008) A neuron-specific cytoplasmic dynein isoform preferentially transports TrkB signaling endosomes. *J. Cell Biol.* 181, 1027-1039.

22. Sun, H., Sheveleva, E., and Chen, Q. M. (2008) Corticosteroids induce cyclooxygenase 1 expression in cardiomyocytes: role of glucocorticoid receptor and Sp3 transcription factor. *Mol. Endocrinol.* 22, 2076-2084.

23. Pfister, K. K., Salata, M. W., Dillman, J. F., 3rd, Vaughan, K. T., Vallee, R. B., Torre, E., and Lye, R. J. (1996) Differential expression and phosphorylation of the 74-kDa intermediate chains of cytoplasmic dynein in cultured neurons and glia. *J. Biol. Chem.* 271, 1687-1694.

24. Picard, D., and Yamamoto, K. R. (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333-3340.

25. Madan, A. P., and DeFranco, D. B. (1993) Bidirectional transport of glucocorticoid receptors across the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3588-3592.

26. Galigniana, M. D., Radanyi, C., Renoir, J. M., Housley, P. R., and Pratt, W. B. (2001) Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 276, 14884-14889.

27. Harrell, J. M., Murphy, P. J., Morishima, Y., Chen, H., Mansfield, J. F., Galigniana, M. D.,

- and Pratt, W. B. (2004) Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *J. Biol. Chem.* 279, 54647-54654.
28. Wochnik, G. M., Ruegg, J., Abel, G. A., Schmidt, U., Holsboer, F., and Rein, T. (2005) FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 280, 4609-4616.
29. Salata, M. W., Dillman, J. F., 3rd, Lye, R. J., and Pfister, K. K. (2001) Growth factor regulation of cytoplasmic dynein intermediate chain subunit expression preceding neurite extension. *J. Neurosci. Res.* 65, 408-416.
30. Karki, S., Tokito, M. K., and Holzbaur, E. L. (1997) Casein kinase II binds to and phosphorylates cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem.* 272, 5887-5891.
31. Ikeda, K., Zhapparova, O., Brodsky, I., Semenova, I., Tirnauer, J. S., Zaliapin, I., and Rodionov, V. (2011) CK1 activates minus-end-directed transport of membrane organelles along microtubules. *Mol. Biol. Cell* 22, 1321-1329.
32. Bader, J. R., Kasuboski, J. M., Winding, M., Vaughan, P. S., Hinchcliffe, E. H., and Vaughan, K. T. (2011) Polo-like kinase1 is required for recruitment of dynein to kinetochores during mitosis. *J. Biol. Chem.* 286, 20769-20777.
33. Anrather, J., Gallo, E. F., Kawano, T., Orio, M., Abe, T., Gooden, C., Zhou, P., and Iadecola, C. (2011) Purinergic signaling induces cyclooxygenase-1-dependent prostanoid synthesis in microglia: roles in the outcome of excitotoxic brain injury. *PLoS One* 6, e25916.
34. Kim, Y. S., Jang, S. W., Sung, H. J., Lee, H. J., Kim, I. S., Na, D. S., and Ko, J. (2005) Role of 14-3-3 eta as a positive regulator of the glucocorticoid receptor transcriptional activation. *Endocrinology* 146, 3133-3140.
35. Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S., and Lanzo, C. A. (1999) Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J. Biol. Chem.* 274, 22903-22906.
36. Smith, W. L., Garavito, R. M., and DeWitt, D. L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271, 33157-33160.
37. Smith, W. L., DeWitt, D. L., and Garavito, R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145-182.
38. Dang, I., and De Vries, G. H. (2011) Aberrant cAMP metabolism in NF1 malignant peripheral nerve sheath tumor cells. *Neurochem. Res.* 36, 1697-1705.
39. Park, S. W., Kim, H. S., Choi, M. S., Jeong, W. J., Heo, D. S., Kim, K. H., and Sung, M. W. (2011) The effects of the stromal cell-derived cyclooxygenase-2 metabolite prostaglandin E2 on the proliferation of colon cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 516-523.
40. Rundhaug, J. E., Pavone, A., Kim, E., and Fischer, S. M. (2007) The effect of cyclooxygenase-2 overexpression on skin carcinogenesis is context dependent. *Mol. Carcinog.* 46,

981-992.

41. Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C., and Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3228-3232.
42. Muraki, C., Ohga, N., Hida, Y., Nishihara, H., Kato, Y., Tsuchiya, K., Matsuda, K., Totsuka, Y., Shindoh, M., and Hida, K. (2012) Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells. *Int. J. Cancer* 130, 59-70.
43. Peskar, B. M. (2001) Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence. *J. Physiol. Paris* 95, 3-9.
44. Choi, S. H., Aid, S., and Bosetti, F. (2009) The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 174-181.
45. Kaplan, M. D., Olschowka, J. A., and O'Banion, M. K. (1997) Cyclooxygenase-1 behaves as a delayed response gene in PC12 cells differentiated by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 272, 18534-18537.
46. Yung, H. S., Chow, K. B., Lai, K. H., and Wise, H. (2009) Gi-coupled prostanoid receptors are the likely targets for COX-1-generated prostanoids in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 65-71.
47. Sugimoto, Y., and Narumiya, S. (2007) Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 11613-11617.
48. Hawcroft, G., Ko, C. W., and Hull, M. A. (2007) Prostaglandin E2-EP4 receptor signalling promotes tumorigenic behaviour of HT-29 human colorectal cancer cells. *Oncogene* 26, 3006-3019.
49. Rasmuson, A., Kock, A., Fuskevag, O. M., Kruspig, B., Simon-Santamaria, J., Gogvadze, V., Johnsen, J. I., Kogner, P., and Sveinbjornsson, B. (2012) Autocrine prostaglandin E2 signaling promotes tumor cell survival and proliferation in childhood neuroblastoma. *PLoS One* 7, e29331.
50. Tamiji, J., and Crawford, D. A. (2010) Prostaglandin E(2) and misoprostol induce neurite retraction in Neuro-2a cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 450-456.
51. Katoh, H., Negishi, M., and Ichikawa, A. (1996) Prostaglandin E receptor EP3 subtype induces neurite retraction via small GTPase Rho. *J. Biol. Chem.* 271, 29780-29784.
52. Ozawa, T., Araki, N., Yunoue, S., Tokuo, H., Feng, L., Patrakitkomjorn, S., Hara, T., Ichikawa, Y., Matsumoto, K., Fujii, K., and Saya, H. (2005) The neurofibromatosis type 1 gene product neurofibromin enhances cell motility by regulating actin filament dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-cofilin pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 39524-39533.
53. Cui, Y., Costa, R. M., Murphy, G. G., Elgersma, Y., Zhu, Y., Gutmann, D. H., Parada, L. F., Mody, I., and Silva, A. J. (2008) Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. *Cell* 135, 549-560.
54. Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S., and Matsubara, Y. (2008) The RAS/MAPK

- syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum. Mutat.* 29, 992-1006.
55. Brown, J. A., Gianino, S. M., and Gutmann, D. H. (2010) Defective cAMP generation underlies the sensitivity of CNS neurons to neurofibromatosis-1 heterozygosity. *J. Neurosci.* 30, 5579-5589.
56. Tong, J., Hannan, F., Zhu, Y., Bernards, A., and Zhong, Y. (2002) Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nat. Neurosci.* 5, 95-96.
57. Gottfried, O. N., Viskochil, D. H., Fults, D. W., and Couldwell, W. T. (2006) Molecular, genetic, and cellular pathogenesis of neurofibromas and surgical implications. *Neurosurgery* 58, 1-16; discussion 11-16.
58. Parrinello, S., Noon, L. A., Harrisingh, M. C., Digby, P. W., Rosenberg, L. H., Cremona, C. A., Echave, P., Flanagan, A. M., Parada, L. F., and Lloyd, A. C. (2008) NF1 loss disrupts Schwann cell-axonal interactions: a novel role for semaphorin 4F. *Genes Dev.* 22, 3335-3348.
59. Le, L. Q., and Parada, L. F. (2007) Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene* 26, 4609-4616.