

脳機能解析にバイオインフォマティクスは有効か？

脳神経系細胞の比較プロテオームデータベース構築の試みとねらい

と だ と し ふ さ | 東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム (〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2)
戸田年総 | E-mail: ttoda@tmig.or.jp

SUMMARY

従来の生命科学研究は、主に特定の遺伝子やタンパク質を標的として各論的に行われ、個々の研究で利用される情報量は限られていた。しかし近年の -omics 研究により、生命科学研究で利用できる情報量は飛躍的に増大した。このような中で、in-silico biology や system biology などの生命情報科学が生まれた。脳機能研究においても情報を活用し、脳機能の全体像に迫ろうとする動きがあり、それに利用できるデータベースの充実が望まれている。プロテオミクスはタンパク質レベルで脳機能を解明する上で有効な手段であり、神経系の各細胞が発現するタンパク質を網羅的にデータベース化しておくことは重要である。

KEY WORDS

ニューロン
オリゴデンドロサイト
アストロサイト
プロテオーム
データベース

1. バイオインフォマティクスとデータベース

バイオインフォマティクスは、コンピュータ技術の発達によって生まれた生命情報科学であり、いわゆる in-silico biology, computational biology あるいは system biology^{1,2)} などと多くの点で重なりを持っている。

従来の生命科学研究では、主に特定の遺伝子やタンパク質、生物学的プロセスを標的とした各論的研究が行われており、それぞれの研究グループごとの情報量は限られていた一方で、生命科学研究の全体では、タンパク質のアミノ酸配列に見られるように膨大な情報量に達し、生命情報科学のデータベース化が余儀なくされている。これに加え 20 世紀の終わりから 21 世紀の初頭に掛けて実施された国際ヒトゲノムプロジェクトの推進により、ゲノム塩基配列に関する情報量が指数級数的に増加し、さらにプロテオーム解析が加わることによって、タンパク質の発現プロファイルや相互作用、翻訳後修飾等に関する情報量も急増した。

このように爆発的な情報量の増加の中で、コンピュータによる情報処理技術を駆使することによって生物の仕組みを丸ごと理解しようという試みが始まり、これが上述の in-silico biology や computational biology あるいは system biology と呼ばれる研究領域をさらに発展させる結果となった。当然のことながら脳機能の解明においても、このようなバイオインフォマティク

スは有効である。しかしながら、これまでに得られた生命科学情報は量的および質的に脳機能の解明に十分な水準に達しているのであろうか。またそれらは、研究者間で互いに利用できるような形で公開され共有されているのであろうか。表1に、現在インターネット上で公開されている脳機能、神経細胞機能関連の情報サイトの一部をリストアップした。ゲノム塩基配列情報やタンパク質アミノ酸配列情報は、その大部分がイ

ンターネット上で公開され、自由にアクセスできるようになっているのに対し、神経系細胞の分化段階別の発現タンパク質に関する情報や、様々な刺激が加わったときの細胞応答や分化、成熟、神経細胞機能の獲得や喪失に伴うタンパク質の発現変化に関する情報、さらにはリン酸化や糖鎖結合などの翻訳後修飾に関する情報に至っては、それぞれの研究組織が独自の情報として抱え込み、一般には公開されていないものが多

表1 インターネット上で公開されている脳機能関連の情報サイト（一部非公開のものも含む）

公開サイト名	URL	コンテンツ
データベース／アトラス		
BrainMap	http://www.brainmapdbj.org/	A Functional Neuroimaging Database
Mouse Brain Atlas	http://www.hms.harvard.edu/research/brain/	High Resolution Mouse Brain Atlas
Human Brain Atlas	http://www.med.harvard.edu/AANLIB/home.html	MRI Atlas of the Human Brain-Harvard Medical School
Human Brain Atlas	http://www.msu.edu/%7Ebrains/humanatlas/	MRI Atlas of the Human Brain-Michigan State University
HBPDB	http://ycmi-hbp.med.yale.edu/hbpd/b/	Human Brain Project Database
CCDB	http://ccdb.ucsd.edu/CCDBWebSite/index.html	Cell Centered Database
DOQCS	http://doqcs.ncbs.res.in/	The Database of Quantitative Cellular Signaling
Neuron DB	http://senselab.med.yale.edu/senselab/NeuronDB/	Dynamically searchable database of three types of neuronal properties
プロジェクト		
BRAID	http://braid.uphs.upenn.edu/websbia/braid/	The Brain-Image Database Project
The Human Brain Project - NIH	http://www.nimh.nih.gov/Neuroinformatics/egordon03.cfm	Neuroinformatics
The Human Brain Project - Denmark	http://hendrix.ei.dtu.dk/home.html	Neuroinformatics
NEUROPAD	http://n002bsel.bios.uic.edu/	Identified Neuron Database Project
HBPP	http://www.hbpp.org/22980/?*session*id*key*=*session*id*val*	The HUPO Brain Proteome Project
データマネジメントシステム		
BAMS	http://brancusi.usc.edu/bkms/	BAMS contains four interrelated modules: Brain Parts (brain regions, major fiber tracts, and ventricles), Cell Types, Relations, and Connections.
NEUROSYS	http://neurosys.cns.montana.edu/	Data management systems for annotating querying and (password-protected) data sharing.
BrainML	http://neurodatabase.org/dataserver/goto.do?page=.brainml	Standard XML metaformat for exchanging neuroscience data.

い。企業等による営利目的の研究の場合には、医薬品の開発等知的所有権の問題も絡むために、やむを得ない面もあるが、今後の生命科学研究全体の発展を考えると大きなマイナスである。特に大学や非営利的研究機関において、公的資金の補助の下に実施された研究の成果については、ゲノムの塩基配列情報に見られるNCBIのGenBankの例のように、論文発表と同時にサーバー上でのデータベース化を行い、可能な限りインターネット上で公開されることが望ましい。バイオインフォマティクスの成否の鍵を握っているのはデータベースの充実とデータマイニングのためのソフトウェアの開発である。

II. 脳組織中および培養系における神経分化とタンパク質の機能的発現

近年、ES細胞を用いた研究が盛んに行われるようになり、ES細胞からニューロンやグリア系の細胞に分化させる研究^{3,4)}も報告されるようになってきたが、脳機能研究で利用するには多くの課題が残されている。培養系での分化が組織中での分化と同じであるのかという問題に答える前に、そもそも組織中においてニューロンおよびグリア系の細胞が発現しているタンパク質が全て明らかにされているのであろうかという疑問が残る。その意味で、リン酸化や糖鎖結合などの翻訳後修飾を受けたアイソフォームも含め、細胞内で発現される全タンパク質を網羅的に分離同定しようというプロテオーム解析^{5,6)}の試みは、脳機能のバイオインフォマティクスにおいて重要な意味を持つものであると考えられる。

これに対し、ヒトおよびマウスの脳組織レベルで全発現タンパク質を網羅的にプロテオーム解析しデータベース化しようという試みはHuman Proteome Organization (HUPO)のInitiativeとしてすでに始まっているが、分化細胞の系譜ごとに異なる発現をそれぞれ個別に解析しようという試みはまだ行われていない。その最大の理由は、タンパク質ではPCRのような増幅ができない上に、一つの遺伝子から発現されるタンパク質であっても翻訳後修飾によって二次元電気泳動上では複数のスポットに分かれるため、組織から直接分離できる細胞数で、全タンパク質を網羅的にプ

ロテオーム解析することはできなかったためである。そこで我々は、培養系での分化は組織中と全く同じではないということを十分に承知しながらも、培養系で分化させたニューロンおよびグリア系細胞において発現されるタンパク質を網羅的に比較解析、同定、および翻訳後修飾動態の解析を行い、得られた情報をデータベース化した上で、最終的にはそれらのタンパク質が脳組織中でも同じように発現し翻訳後修飾を受け機能しているということを検証するという手順を踏むことで、脳機能に関わるタンパク質の全容に迫れるのではないかと考えている。

III. ラット胎児脳由来の神経前駆細胞を用いた培養系におけるニューロンおよびグリア系細胞への分化とこれを用いた神経系細胞の比較プロテオーム解析

胎児脳組織からの初代培養法、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化能を有する個々の前駆細胞の選択的な増殖維持法、および終末分化の誘導と成熟法についての詳細は原著論文で報告するので、ここでは概要を述べるにとどめる。

受精後16日目のラット大脳皮質をハサミで細かく碎きディスペーゼ処理およびDNase I処理後、ステンレスメッシュを通して細胞を単離。ニューロンに分化をさせる場合には、10%のウシ胎児血清を含むEagle Minimum Essential Medium (MEM)と500 μ M グルタミン、25 μ M グルタミン酸、2% B27を含むNeurobasal Medium (NBM)を1:1で混合した培地で細胞を懸濁し、poly-Lリシンでコートされたディッシュ上に蒔いて初代培養を行った。オリゴデンドロサイトあるいはアストロサイトに分化させる場合には、上記のものと異なる組成の培地で初代培養を開始した。

翌日、ニューロンに分化させる細胞に対しては500 μ M グルタミン、25 μ M グルタミン酸、2% B27を含むNeurobasal Medium (NBM)に培地交換して4日間培養。さらに500 μ M グルタミンと2% B27のみを添加したNeurobasal Medium (NBM)に交換、それ以後は3~4日ごとに半量の培地を交換しながら2週間程度培養を続けた。図1-aに、このようにして成熟分化させたニューロンを抗チューブリンベータIII抗体で蛍光染色した時の細胞形態を示す。

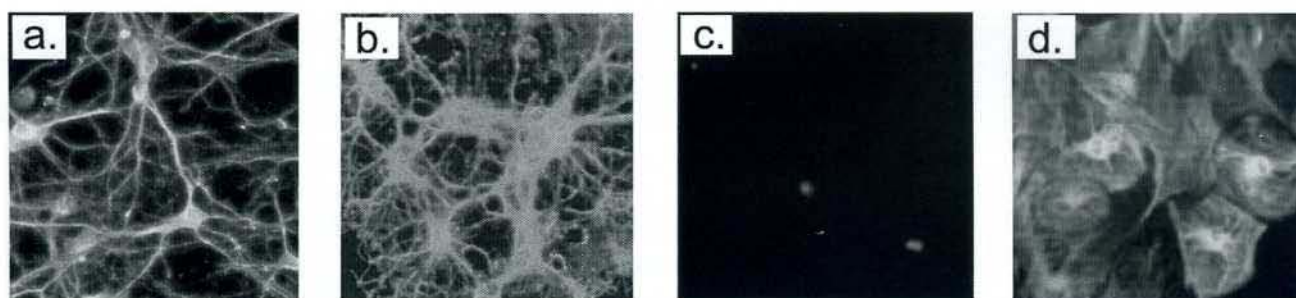


図1 培養系で分化成熟させたニューロン(a), オリゴデンドロサイト(b, c) およびアストロサイト(d). それぞれ次の抗体を一次抗体とし, 蛍光標識二次抗体を用いて染色を行った.

(a) 抗チュブリンベータ III 抗体, (b) 抗 GalCer 抗体, (c) 抗 GFAP 抗体, (d) 抗 GFAP 抗体

オリゴデンドロサイトに分化させる細胞に対しては, 初代培養で細胞数を増やした後にトリプシン処理によってハーベストし, 細胞接着性の異なるディッシュに蒔いて OPC (Oligodendrocyte Precursor Cells) のみを接着させ, 選択的な培養を行った. OPC の細胞数が十分に増えたところで数種類の分化誘導因子を含む培地に交換し, さらに3~5日間培養を続けてオリゴデンドロサイトへと成熟分化させた. この成熟オリゴデンドロサイトを抗ガラクトシルセラミド (GalCer) 抗体で蛍光染色した時の細胞形態を図1-bに示す. なお, この細胞はアストロサイトの特異抗体である抗 GFAP 抗体では染まらないことを確認している (図1-c).

アストロサイトに分化させる細胞に対しては, トリプシン処理によるハーベストと10% FCSを含むD-MEMでの蒔き直しを3回~5回繰り返し, 細胞数を増やしながら分化を誘導する方法をとった. このようにして分化させたアストロサイトを抗 GFAP 抗体で蛍光染色したものが図1-dである. 以後のプロテオーム解析はこれらの細胞を用いて行った.

タンパク質の抽出, 二次元電気泳動および SYPRO Ruby による蛍光染色は, 我々の標準操作法 (http://proteome.tnig.or.jp/2D/J_2DEmethod.html で公開) に従って行ったので, そちらをご覧頂きたい.

IV. 脳神経系細胞の比較プロテオームデータベース

現在我々は, 上記の神経系分化細胞の比較プロテオ

ーム解析によって得られた情報をデータベース化する作業を行っており, データベースの概要を原著論文で発表した後に, 一定のアクセス権限を設けて全てのデータをインターネット上で公開する予定である. 図2~4に, 東京都老人総合研究所の所内 LAN 上で開発中のデータベース (現時点では非公開のベータ版) のトップページと, 掲載予定のデータの一部を示す.

今回行った網羅的比較プロテオーム解析で明らかになったことが幾つかあるが, その第1点目は, オリゴデンドロサイトとアストロサイトは同じグリア系の細胞であり, 細胞系譜的には近いと思われるが, 実際の発現タンパク質のパターンで見るとむしろオリゴデンドロサイトとニューロンの間に共通して発現されるタンパク質が多く, 機能的にはアストロサイトよりもニューロンに近い可能性がある. また今回プロテオーム解析で明らかになったもう一つのことは, 分化したオリゴデンドロサイトは, 抗 GFAP 抗体では染色されず, 従来いわれているように GFAP はアストロサイトの特異抗原であるということに矛盾はなかったものの, 尿素変性条件でタンパク質を抽出し, 二次元電気泳動で解析すると, 驚くべきことに GFAP の2つのアイソフォームスポットは, いずれもオリゴデンドロサイトにおいてアストロサイトよりも高い発現を示していた. 先に述べたように発現タンパク質のパターン上ではオリゴデンドロサイトとアストロサイトの間には大きな違いがありむしろニューロンに近い発現パターンを示すことを考えると, この結果は単なるアストロサイトの混入によるものではなく, オリゴデンドロ

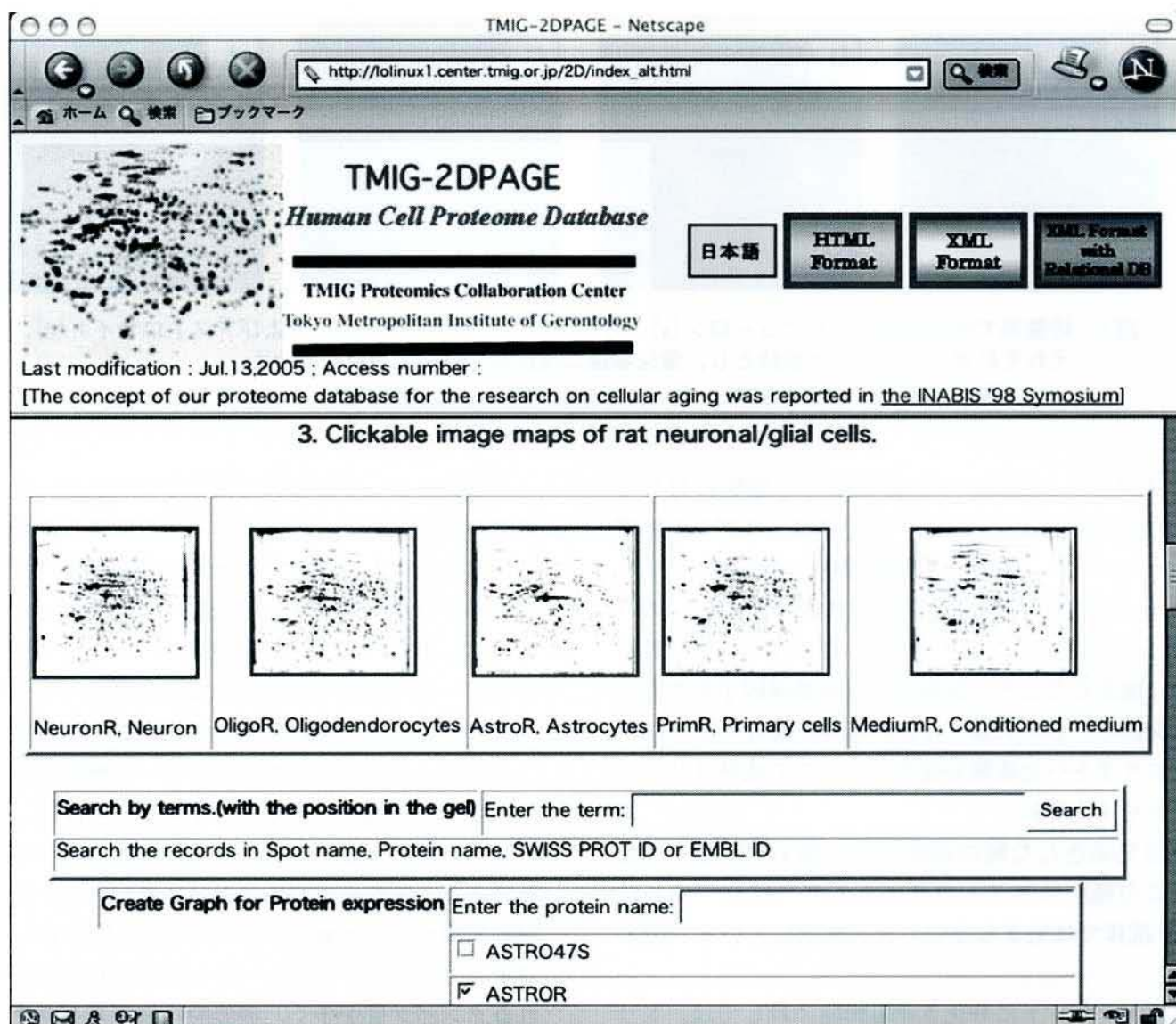


図2 現在作成中の「脳神経系細胞の比較プロテオームデータベース」のトップページ

ここでそれぞれのアイコンをクリックすると、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、初代培養細胞によって発現されるタンパク質、および初代培養の際に培地中に分泌されたタンパク質の二次元電気泳動パターンが表示される。さらにそのパターン上で十字のカーソルがついたタンパク質スポットをクリックすると、タンパク質名やスポット番号、発現レベルなどの情報が表示される。また、このトップページでは、タンパク質名やスポット番号などでデータを検索して表示させることもできるようになっている。

サイトにおいても GFAP が発現しているものの、何らかの理由で抗体による細胞染色では染まらない状態になっている可能性を示唆している。もしこれが事実であるなら、オリゴデンドロサイトとアストロサイトでは GFAP の生理機能が全く異なる可能性もあり大変興味深い。現在さらに詳しい解析を行っており、その結果については原著で報告する。

まとめ

今回構築を試みた比較プロテオームデータベースは、培養系で分化成熟させた神経系の各系譜の細胞のプロテオーム解析によるものであり、脳の組織内での発現や翻訳後修飾と全く同じではない。しかしその一方で、組織内で細胞種ごとに異なる発現タンパク質を

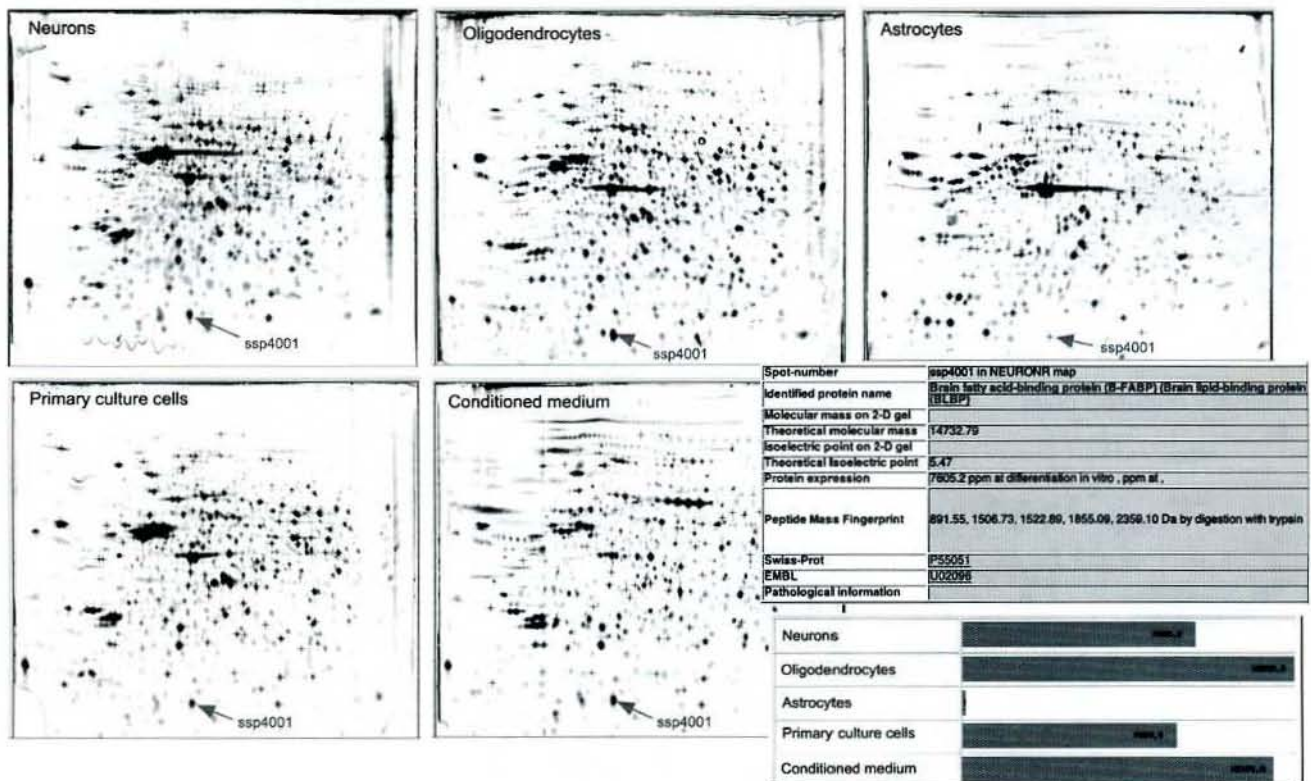


図3 それぞれのアイコンをクリックした時に表示される二次元電気泳動パターン

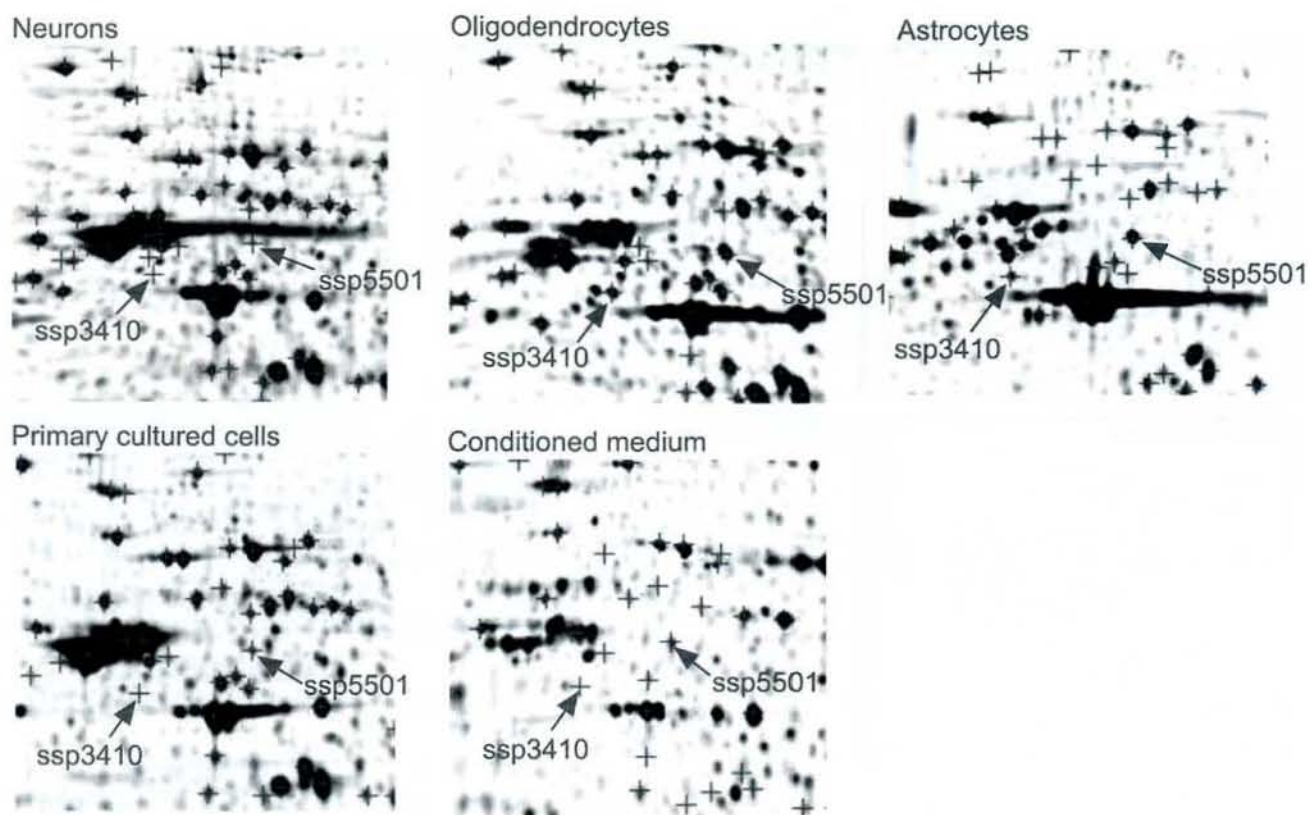
ここでたとえば矢印で示す ssp4001 のスポットをクリックするとタンパク質の同定結果（この例では Brain fatty acid-binding protein）などの情報が表示され、さらに「ssp4001」で検索することによって、それぞれの細胞種による発現レベルの違いが棒グラフで表示される。この ssp4001 のタンパク質はニューロンとオリゴデンドロサイトで高発現しているが、アストロサイトではほとんど発現されていないことがわかる。

網羅的に解析することは事実上不可能である。従って、培養系で分化させた細胞で得られたプロテオームデータを踏まえた上で、組織中での実体を把握するための確認作業をおこなうのが、現実的な道筋であると考えている。特に細胞表面、シナプス、ラフト等で機能的に発現している糖タンパク質の糖鎖については、細胞間の接着や細胞外基質との接着などの影響で大きく変化していることが予想されているので、組織内の構造に近づけた培養系を再構築することも重要となってくる。

参考文献

- 1) Kitano H: Systems Biology. Science **295**: 1662-1664, 2002.
- 2) Kitano H: Computational Systems Biology. Nature **420**: 206-210, 2002.

- 3) Yamazoe H, Iwata H: Efficient generation of dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells enclosed in hollow fibers. Biomaterials **27**: 4871-4880, 2006.
- 4) Yamazoe H, et al: One-step induction of neurons from mouse embryonic stem cells in serum-free media containing vitamin B12 and heparin. Cell Transplant **15**: 135-145, 2006.
- 5) Wilkins MR, et al: Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. Electrophoresis **17**: 830-838, 1996.
- 6) Packer NH, et al: Proteome analysis of glycoforms: a review of strategies for the microcharacterisation of glycoproteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis **18**: 452-460, 1997.



ssp3410

Neurons	238.2
Oligodendrocytes	2189.5
Astrocytes	1399
Primary culture cells	175.1
Conditioned medium	88.

ssp5501

Neurons	443.4
Oligodendrocytes	5835.91
Astrocytes	4882.28
Primary culture cells	1100.81
Conditioned medium	1682.5

図4 GFAPと同定された2つのスポット ssp3410 と ssp5501 付近の拡大図

ssp3410 と ssp5501 はニューロンではほとんど発現されていないが、オリゴデンドロサイトとアストロサイトで共に高く発現されている。抗GFAP抗体による細胞染色では、アストロサイトのみが染色され、オリゴデンドロサイトは染まらなかった（図1）ことから、細胞内での存在状態が異なることが予想される。（p.7, カラー図参照）