

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06818

研究課題名(和文) 成長円錐における局所的蛋白合成と細胞骨格の動態との関係解析

研究課題名(英文) Analysis of local protein synthesis in growth cones in relation to dynamics of cytoskeleton

研究代表者

星 治 (Hoshi, Osamu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10303124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の成長円錐において脳由来神経成長因子(BDNF; brain-derived neurotrophic factor)により、mTORシグナルを介して局所的な蛋白合成が亢進することを明らかにした。また、細胞膜剥離フリーズエッチングレプリカ法により成長円錐の内部の構造を電子顕微鏡により観察し、アクチン線維の形態が、成長円錐の部位により異なっていることを明らかにした。さらに、BDNFとNGFの刺激により成長円錐における局所的な蛋白合成を促すと、アクチン線維近傍に存在していたリボソームがポリソームとなりアクチン線維から離れていくことが示唆される所見を超解像顕微鏡観察により得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞体から離れた部位で刺激に応じて迅速な機能変化が必要な神経細胞では、細胞体から合成された蛋白を輸送するのは必ずしも効率的ではない。細胞体から離れた部位での刺激に対する構造・機能変化においては、局所的蛋白合成が重要な役割を担っている。本研究では、神経細胞の成長円錐において脳由来神経成長因子の刺激により、局所的な蛋白合成が亢進することを定量的に明らかにした。また、それに伴ってアクチン線維の近傍に多く存在していたリボソームが、アクチン線維から離れて会合し、ポリソームを形成していくことを示唆する所見を得た。これらは、成長円錐の構造・機能解析を進めていく上で、意義ある知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We revealed that brain derived neurotrophic factor (BDNF) rapidly activates translation and enhances novel protein synthesis in growth cones of rat dorsal root ganglion (DRG) neuron through the mTOR signaling. We found that ribosomes, many of which colocalized with actin filament, moved away from actin filament when BDNF and nerve growth factor (NGF) enhanced novel protein synthesis in growth cones of DRG.

研究分野：解剖学

キーワード：成長円錐 局所的蛋白合成 細胞骨格 アクチンフィラメント

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

伸長中の神経突起の先端に存在する成長円錐は、手のひらをひろげたような扇形をしており、神経発生や神経再生の過程で重要な機能を有している。成長円錐が標的細胞を見出してシナプスを形成する過程は軸索ガイダンスと呼ばれ、神経回路網の形成において大切な現象である。

近年、成長円錐に存在する分子、成長円錐が感受するガイダンス因子、誘発因子、反発因子などが明らかにされ、成長円錐の運動に関係する分子のはたらきが明らかにされてきた。さらに、局所的な蛋白質合成が神経細胞の機能に関わることが明らかになり、なかでも発達期の成長円錐では局所で蛋白質合成が起こり、成長円錐の方向性を変える機能に関与することが示唆されている。局所翻訳される蛋白質として、Rho などの細胞骨格制御因子のほかミトコンドリア機能の調節因子などが報告されている。しかし、翻訳装置(リボソームおよび翻訳因子群)によって局所的蛋白質合成が起こっている部位と細胞骨格との相互作用については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、成長円錐における刺激に伴う局所的蛋白質合成と、微小管やアクチンフィラメントとの相互関係を形態学的に明らかにし、成長円錐の運動制御の一端を明らかにすることにある。その相互作用の解明は成長円錐の転向運動のメカニズムの理解に重要である。観察には、原子間力顕微鏡を用いて細胞膜表面の 3 次元の微細構造を解析するとともに、細胞膜剥離法(unroofing)による処理も細胞に施して、電子顕微鏡により細胞内部の微細構造も解析する。さらに、超解像顕微鏡も使用して、成長円錐のナノレベルの構造を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) ラット初代培養の脊髄後根神経節細胞の成長円錐の部分に脳由来神経成長因子(BDNF; brain-derived neurotrophic factor)や神経栄養因子(NGF; nerve growth factor)の刺激を与えて、局所的に蛋白質合成が促進されることを定量的に証明する。蛋白質合成部位を可視化するには、ピューロマイシンを用いた SUnSET 法を用いる。

(2) ラット初代培養の脊髄後根神経節細胞の成長円錐に対して、超音波による細胞膜剥離フリーズエッチングレプリカ法(unroofing freeze-etching replica)による処理を施して、その内部の構造を電子顕微鏡により解析する。

(3) ラット脊髄後根神経節細胞の成長円錐の部分に BDNF と NGF の刺激を加えて局所的な蛋白質合成を促し、それに伴ってリボソーム蛋白 S6 および P0/1/2 とアクチンフィラメントの局在がどのように変化するのか、超解像顕微鏡により解析する。

### 4. 研究成果

(1) ラット初代培養の脊髄後根神経節細胞の成長円錐におけるリボソーム蛋白 P0/1/2 および S6 の局在を調べたところ、原子間力顕微鏡像でみられた隆起部位により多く存在していることがわかった。さらに、BDNF による刺激を加え、ピューロマイシンを用いた SUnSET 法により蛋白質合成部位を可視化したところ、それも原子間力顕微鏡像での隆起部位に一致していた。また、蛋白質合成に不可欠な因子である真核生物伸長因子 2 (eEF2; eukaryotic elongation factor 2) のリン酸化は蛋白質合成を抑制するが、それについて定量的に解析したところ、BDNF の刺激によりそのリン酸化は減少しており、mTOR シグナルの阻害剤であるラパマイシンによってその効果は抑制された。さらに、BDNF の刺激による成長円錐における蛋白質合成について、ピューロマイシンを用いた SUnSET 法を用いて定量的に解析したところ、刺激により蛋白質合成は亢進し、ラパマイシンによりその効果は抑制されることが確かめられた。以上の成果は論文発表をした。

(2) ラット初代培養の脊髄後根神経節細胞の成長円錐に対して、超音波による細胞膜剥離フリーズエッチングレプリカ法(unroofing freeze-etching replica)による処理を施して、その内部の構造を電子顕微鏡により観察した。その結果、成長円錐部分のアクチンフィラメントの形態は、部位により異なっていることが明らかとなった。一つは、成長円錐の C-domain の細胞膜直下部分と考えられる部位に、cortical actin として、さまざまな方向に 1 本 1 本のアクチン線フィラメントが独立して走行しているものがみられた。他方で、糸状突起に向かって多数のアクチンフィラメントが集束していくものが認められた。前者のアクチンフィラメントは安定性が高く、後者は動的であると考えられるが、今後局所的蛋白質合成におけるアクチンフィラメントの役割を明らかにする上で、有用な知見を得ることができた。さらに、成長円錐の C-domain に多数のクラスリンコートが存在していた。クラスリンはエンドサイトーシスに関与する分子群として中核的な役割を担うことが想定されているが、細胞膜剥離フリーズエッチングレプリカ法はクラスリンの構造解析にも有用であることが示された。

(3) ラット脊髄後根神経節細胞の成長円錐の部分に BDNF と NGF の刺激を加えて局所的な蛋白合成を促し、それに伴うリボソーム蛋白 S6 とアクチンフィラメントの局在の変化を超解像顕微鏡により解析した。成長円錐の peripheral domain において、抗 ribosomal protein S6 抗体の陽性部位とファロイジン陽性部位の共局在率は、コントロール標本では平均 71% であった。BDNF と NGF の刺激を与えた標本では、その共局在率は平均 51% に低下し、t 検定でも有意差 ( $p < 0.05$ ) があり、さらにファロイジン陽性部位より離れた部位で、抗 ribosomal protein S6 抗体の陽性部位が集簇している様子が確認された。抗 ribosomal protein リン酸化 S6 抗体および抗 ribosomal protein P0/1/2 抗体でも同様の解析をしたところ、同じ傾向が認められた。これにより、BDNF と NGF の刺激により成長円錐において局所的な蛋白合成を促すことで、アクチンフィラメント近傍に存在していたリボソームがポリソームとなり、アクチンフィラメントから離れていく現象が起きていることが示唆された。今後、蛋白合成が亢進しているような条件下では、リボソームはどこに存在し、アクチンフィラメントとの関係はどうなっているのかを、明らかにしていく上で有用な知見が得られた。具体的には、リボソーム蛋白 S6 と P0/1/2 の共染色から、リボソームの会合/ポリソームの形成の可視化の可能性を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshi Osamu, Sugizaki Ayana, Cho Yuichiro, Takei Nobuyuki	4. 巻 43
2. 論文標題 BDNF Reduces eEF2 Phosphorylation and Enhances Novel Protein Synthesis in the Growth Cones of Dorsal Root Ganglia Neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 1242 ~ 1249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-018-2541-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星 治
2. 発表標題 細胞膜剥離法を用いた原子間力顕微鏡による成長円錐の観察
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Hoshi, Nobuyuki Takei
2. 発表標題 Morphological analysis of dorsal root ganglion neuron growth cones by unroofing method
3. 学会等名 第62回神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Hoshi, Nobuyuki Takei
2. 発表標題 Changes in the relationship between ribosomal protein S6 and actin during local protein synthesis in growth cones
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	武井 延之  (Takei Nobuyuki)  (70221372)	新潟大学・脳研究所・准教授   (13101)	
研究 分担者	長 雄一郎  (Cho Yuichiro)  (90334432)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教   (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------