

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590185

研究課題名（和文） 神経系細胞骨格蛋白質の細胞内動態の調節因子の探索

研究課題名（英文） Exploratory research on regulating factors for intracellular dynamics of neuronal cytoskeleton

研究代表者

寺田 純雄 (TERADA SUMIO)

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：00262022

研究成果の概要（和文）：

神経系細胞骨格蛋白質の細胞内動態を制御する実験条件を確立し、遺伝子チップを利用して発現状態の大きく変化する分子のスクリーニングを行い、細胞骨格動態調節因子の候補分子群をピックアップした。個別の検討に予想外の時間を要し、解析を続行中である。また同実験系を利用して新たにケミカルスクリーニングを行い、細胞骨格蛋白質の動態に影響を与える小分子を複数発見した。また一般的な細胞質性蛋白質の神経細胞内輸送時における動態調節因子を同定し、成果を発表した。

研究成果の概要（英文）：

We have established the screening system to identify the regulating factors for intracellular dynamics of neuronal cytoskeleton. By using gene chip and chemical screening system, we have identified several candidate factors or chemicals, and more detailed characterization is under way. We also reported that a chaperone molecule Hsc70 plays a role as a scaffolding factor during intracellular transport dynamics in neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：解剖学、細胞生物学、神経科学、生物物理学

科研費の分科・細目：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：細胞骨格蛋白質、神経、分子細胞生物学、調節因子

1. 研究開始当初の背景

情報伝達素子としての神経細胞の機能は、その特徴ある形態によく反映されている。神

経細胞の形態は主として三種の系統の細胞骨格蛋白質群に依存している。即ちアクチン系、微小管系、中間径フィラメント系である。

これらの細胞骨格蛋白質群の細胞内動態の調節は、形態や信号伝達機能、細胞内輸送、細胞移動などの生理機能調節に深く関与していることが知られているが、その全ての動態調節因子が解明された状態にはない。

研究代表者はこれまで細胞質性蛋白質の神経細胞内輸送—遅い軸索輸送—の研究に従事してきた。その過程でニューロフィラメント蛋白質やチューブリンが、神経軸索内において重合体を形成せずに輸送される直接的な所見を得ている (Terada et al., *Science* 273, 784-788, 1996; Terada et al., *Cell* 103, 141-155, 2000.)。これらの結果は、細胞骨格蛋白質の遅い軸索輸送に際し、重合体形成が輸送のための前提条件とするポリマー滑り仮説の立場が主体である学会内で、議論と反響を呼んでいるが (Bray, *Trend in Cell Biology* 7, 379, 1997; Baas et al., *Trends in Cell Biology* 7, 380-384, 1997; Hirokawa et al., *Trends in Cell Biology* 7, 384-388, 1997; Terada et al., *Current Opinion in Neurobiology* 10, 566-573, 2000.)、その一方で未だ知られていない細胞骨格蛋白質動態調節因子の存在を示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究の当初のねらいは、神経系細胞骨格蛋白質の細胞内動態及び調節機構と、神経細胞の形態形成・機能調節との相関関係について明らかにすることであった。

神経系細胞骨格蛋白質が、細胞内において多様かつ迅速な形態変化に対応して速い経過で重合、脱重合を行う事実から、生体内ではこの現象に何らかの調節因子が関与している可能性が高いことを推定し、これらの因子について所見を得ることを目的とした。

候補分子群を同定された場合、更にそれらが細胞内で実際の動態に関与しているか確

認し、関与が明らかになった分子について、その細胞内における機能を細胞生物学的に明らかにすることを最終目標とした。

3. 研究の方法

神経系細胞骨格蛋白質重合体が形成される実験条件と、重合体が形成されず細胞質内でモノマーあるいは小オリゴマーとして存在する実験条件の両者における培養細胞を採取し、メッセンジャーRNAを抽出し、遺伝子チップにより両者の間で発現状態の変化している遺伝子を網羅的にスクリーニングし、得られた候補分子について、細胞骨格蛋白質の動態に与える影響をモニターしつつ、それぞれの分子の細胞内機能について追究することを当初の方針とした。

しかしながら、後述するように研究期間内に当初の想定通りの因子を同定するに至らなかったため方法を変更し、ケミカルスクリーニングを利用した実験系を新規に採用し、解析を進める他、細胞骨格蛋白質だけでなく、一般の細胞質性蛋白質群の動態が、特に神経細胞内輸送過程においてどのように調節されているか、調べる実験も並行して行うこととした。

4. 研究成果

遺伝子チップを利用した調節因子の探索のための実験系を確立することに成功した。実験条件の検討に時間を要したが、神経系細胞骨格蛋白質の動態を制御する実験条件が確定したので、この実験系を利用し、発現状態の大きく変化する蛋白質分子のスクリーニングを行い、候補分子群をピックアップした。候補となる分子が見つかったが、分子機能に関する情報が乏しく、明確な選択基準のない状態で動態変化への影響を評価せざるを得ない状態で、機能同定に苦労した。個別の検討に予想外の時間を必要としてお

り、順次使用する細胞株や導入遺伝子等の実験条件を変更して試行を重ねているが、十分な検討を尽くす段階に到達していない。単独で明らかに有意な所見を呈する分子は見つかっていないが、解析のすんだ分子は部分的にとどまるので、今後も残る候補分子について解析を続行する予定である。

確立した実験系を利用し、遺伝子チップと異なる手法で因子を探索することを目的として新たにケミカルスクリーニングの実験系を開発した（京都大学上杉志成教授、学内ケミカルスクリーニングセンターとの共同研究）。予備的実験として、現段階で細胞骨格蛋白質の動態に影響を与える小分子を複数発見することができた。こちらの薬剤の標的分子の機能は現在明らかになりつつあり、今後の細胞生物学的な解析につなげたい。特に当初のスクリーニングの系が最終的に奏功しない可能性を考慮し、小分子の標的分子の側から候補分子にアプローチする方向に方針を変更することも念頭に置きつつ、ケミカルスクリーニング自体について、より本腰を入れてスクリーニング対象を広げて実験を続行することを考慮している。

尚、このケミカルスクリーニング実験の副産物として、神経細胞の初代培養条件の改善に役立つ新規小分子化合物アドヘサミンを発見し、報告した。培養基質として新規小分子化合物アドヘサミンを使用すると、神経細胞の分化、生存率とも促進され、培養条件が大きく改善することが判明し、これに関して *Biochemical Journal*（雑誌論文①）に発表した（京都大学上杉志成教授との共同研究）。我々の今後の実験のみならず、広く有用な培養細胞用基質として汎用される試薬となることが期待される。同誌の Spotlight 欄で紹介されるなど注目を浴び、製薬会社から製品として販売が開始されている。

細胞骨格蛋白質に限らず、より一般的な細胞質性蛋白質の動態が、細胞内輸送時にどのように制御されているかについても研究を並行して進めた。その結果、解糖系酵素などの一般的な細胞質性蛋白質の遅い軸索輸送において、微小管依存性輸送モーター蛋白質がシャペロン分子を介して積荷蛋白質を運んでいる現象を見出し、成果を *EMBO Journal* に発表した（雑誌論文②）。この成果の反響は極めて大きく、論文発表後の評価システムである Faculty of 1000 でトップ 10 入りし、生化学と構造生物学部門で第一位の評価を受けた。また *EMBO Journal* のダウンロードランキングでもトップ 10 入りした他、第 55 回米国生物物理学会ではシンポジウム講演に採択された。国内でも正常眼圧緑内障の分子病態との関連から第 113 回日本眼科学会総会評議員会指名講演で話題として取り上げられるなど、極めて高い評価を受け、現在進行中の研究の方向性を支持する評価と受け止めている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- ① Hoshino M, Tsujimoto T, Yamazoe S, Uesugi M, Terada S. Adhesamine, a new synthetic molecule, accelerates differentiation and prolongs survival of primary cultured mouse hippocampal neurons. *Biochemical Journal*, 査読有、427巻2号、2010年、297-304頁
- ② Terada S, Kinjo M, Aihara M, Takei Y, Hirokawa N. Kinesin-1/Hsc70-dependent mechanism of slow axonal transport and its relation to fast axonal transport. *EMBO Journal*, 査読有、29巻4号、2010年、843~854頁
- ③ 寺田 純雄・小林 靖、軸索輸送の分子機構 (2)、臨床神経科学 *Clinical Neuroscience*, 査読無、27巻8号、2009年、844-845頁
- ④ 寺田 純雄・小林 靖、軸索輸送の分子

機構 (1)、臨床神経科学 Clinical Neuroscience、査読無、27巻7号、2009年、716-717頁

[学会発表] (計 12 件)

- ①寺田 純雄、細胞質性蛋白質輸送 (遅い軸索輸送) 障害と遅発性軸索変性、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム、2011 年 3 月 28~30 日、東日本大震災のため誌上開催
- ②星野 光伸・寺田 純雄、新規 Ras 類似低分子量 GTP 結合タンパク質 Rig の機能解析、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会ポスター発表、2011 年 3 月 28~30 日、東日本大震災のため誌上開催
- ③川岸 将彦・寺田 純雄、Palm intensity function による蛍光分子の拡散過程の解析、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会ポスター発表、2011 年 3 月 28~30 日、東日本大震災のため誌上開催
- ④寺田 純雄、Kinesin-1/Hsc70-dependent mechanism of slow axonal transport and its relation to fast axonal transport、第 55 回米国生物物理学会ミニシンポジウム、2011 年 3 月 5~9 日、米国ボルチモア
- ⑤寺田 純雄・金城 政孝・相原 一・武井陽介・廣川 信隆、Hsc70 に依存した細胞質性蛋白質輸送/膜器官輸送モード制御と細胞質性蛋白質輸送阻害による視神経軸索変性、第 33 回日本神経科学学会大会 (Neuro2010) 一般口演、2010 年 9 月 1~4 日、神戸
- ⑥寺田 純雄・金城 政孝・相原 一・武井陽介・廣川 信隆、軸索輸送における膜器官/細胞質性蛋白質輸送モードの振り分け機構、第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会ポスター発表、2010 年 3 月 28~30 日、盛岡
- ⑦寺田 純雄・金城 政孝・相原 一・武井陽介・廣川 信隆、Molecular mechanism of slow axonal transport and its putative relation with change-over regulation between slow/fast axonal transport、第 49 回米国細胞生物学会ポスター発表、2009 年 12 月 5~9 日、米国サンディエゴ
- ⑧寺田 純雄・金城 政孝・相原 一・武井陽介・廣川 信隆、軸索輸送における膜器官/細胞質性蛋白質輸送モードの振り分け機構、第 32 回日本神経科学学会大会 (Neuro2009) ポスター発表、2009 年 9 月 16~18 日、名古屋
- ⑨星野 光伸・山添 紗有美・上杉 志成・寺田 純雄、新規有機化合物 adhesamine はマウス海馬神経細胞の初代培養用基質として有用である、第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会ポスター発表、2009 年 3 月 28~30 日、岡山
- ⑩寺田 純雄・金城 政孝・相原 一・武井陽介・廣川 信隆、神経細胞における細胞質

性蛋白質輸送 (遅い軸索輸送) の分子機構、理化学研究所シンポジウム・蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達 (6)、2009 年 3 月 27 日、埼玉

- ⑪星野 光伸・山添 紗有美・上杉 志成・寺田 純雄、Adhesamine, a newly synthesized chemical compound, is a very useful substrate for culturing mouse primary-cultured hippocampal neurons、第 48 回米国細胞生物学会ポスター発表、2008 年 12 月 13~17 日、米国サンフランシスコ
- ⑫星野 光伸・山添 紗有美・上杉 志成・寺田 純雄、新規有機化合物 adhesamine はマウス海馬神経細胞の初代培養用基質として有用である、第 31 回日本分子生物学会年会一般口演、2008 年 12 月 9~12 日、神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/nana/index.html>

http://aqua.tmd.ac.jp/ResDB/DispRsch/dsp_resdata.php?id=1151&la=ja

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 純雄 (TERADA SUMIO)

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：00262022

(2) 研究分担者

川岸 将彦 (KAWAGSHI MASAHIKO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60323606

星野 光伸 (HOSHINO MITSUNOBU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60431962

(3) 連携研究者

なし