

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500336

研究課題名（和文） 軸索ガイダンスにおける成長円錐の自律性と翻訳トランス因子の役割

研究課題名（英文） Role of growth cone autonomy and translational trans-acting factors in axon guidance

研究代表者

佐々木 幸生 (SASAKI YUKIO)

横浜市立大学・医学研究科・特任准教授

研究者番号：10295511

研究成果の概要（和文）：神経軸索先端の成長円錐内で mRNA と結合し局所翻訳を制御する二種の翻訳トランス因子について研究を行った。まず、RNA 結合タンパク質であるジップコード結合タンパク質 1 (ZBP1) は脳由来神経栄養因子 (BDNF) によるリン酸化を介して  $\beta$ -アクチン mRNA の翻訳を制御し、軸索伸長の方向を調節することが明らかとなった。さらに、mRNA と結合する非コード RNA であるマイクロ RNA が成長円錐に局在し、BDNF による軸索伸長の制御に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We have investigated two mRNA-binding, translational trans-acting factors to regulate local translation in axonal growth cones in neurons. We demonstrated that Zipcode-Binding Protein 1 (ZBP1), an mRNA-binding protein, regulates translation of  $\beta$ -actin mRNA, and then direction of axonal extension, via phosphorylation induced by Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). We also found that microRNAs (miRNAs), non-coding RNAs bind to mRNA, exist in growth cones. We indicate the possibility that axonal miRNAs are involved in axonal extension regulated by BDNF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：分子・細胞・神経生物学、成長円錐、翻訳調節、マイクロ RNA

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞の軸索先端の成長円錐は、遠く離れた細胞体からの指令なしに、自身が保持している mRNA から即座に翻訳を開始できる。成長円錐における特定の mRNA の局在と局所翻訳機構は、成長円錐が自ら翻訳のタイミングを決定し周囲の環境変化に即座に対応するための必要不可欠な基盤を与えている。この

過程で重要な役割を担うのが局在する mRNA に結合する二つの翻訳トランス因子、RNA 結合タンパク質とマイクロ RNA (miRNA) であると考えられる。しかし、成長円錐におけるこれらの因子による局所翻訳制御機構とその生理的役割は全く不明であった。

#### (1) mRNA 結合タンパク質

神経の軸索や樹状突起には特定の mRNA が

集積していることが明らかになりつつある。これらの mRNA の局在と翻訳調節には特定の配列に結合するトランス因子として RNA 結合タンパク質が決定的な役割を果たしている。例えば  $\beta$ -actin mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に存在する zipcode 配列を認識する zipcode binding protein 1 (ZBP1) は  $\beta$ -actin mRNA の軸索・成長円錐への局在に関与し、チロシンキナーゼ Src による ZBP1 のリン酸化は  $\beta$ -actin mRNA の翻訳を細胞全体では促進することが示されている。しかし、ZBP1 を含む RNA 結合タンパク質が成長円錐における局所翻訳に関与しているという直接的な知見は得られていなかった。

#### (2) miRNA

miRNA は約 18-25 塩基長からなる小さな RNA で、神経系においても mRNA の代謝や翻訳調節にトランス因子として重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。しかし、miRNA の軸索における局在や役割は全く不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は RNA 結合タンパク質として ZBP1、及び、miRNA の成長円錐における局在を検討し、これらのトランス因子による局所翻訳調節機構、及び軸索伸長や成長円錐回旋の制御機構の解析を行うことである。

#### (1) mRNA 結合タンパク質

ZBP1 とその標的 mRNA である  $\beta$ -actin mRNA の軸索・成長円錐における局在が BDNF 刺激によって変化するかを解析する。さらに、ZBP1 が BDNF 刺激による局所翻訳を調節するかを明らかにする。最後に、ZBP1 が BDNF による成長円錐回旋応答を制御するか否かを検討する。

#### (2) miRNA

新規培養法「ニューロンボール法」を用いて、軸索に局在する miRNA を同定し、成長円錐における局在を明らかにする。さらに、成長円錐における局在が BDNF によって変化するか解析する。最後に、miRNA が BDNF による突起伸長応答を制御するか否かを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ニューロンボール法を用いた軸索 miRNA の発現解析

胎生期 16 日目のマウス大脳皮質より細胞を単離する。細胞懸濁液を 1 万細胞/10  $\mu$ l に調製し、hanging drop の状態で 3 日培養する。球状になった細胞塊 (ニューロンボール) を poly-L-lysine (PLL) でコートした培養皿に置き、軸索が放射状に伸びるまで五日間さらに培養する。ニューロンボール 1,000 個より細胞体と軸索画分を単離後、RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法にて 370 種の miRNA の発現を検討する。

(2) 翻訳トランス因子とその標的 mRNA の BDNF による軸索・成長円錐における局在変化分散培養あるいはニューロンボール法で培養したラットまたはマウス大脳皮質神経細胞に BDNF を加え、一定時間後に固定する。蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いて、 $\beta$ -actin mRNA、miRNA の軸索・成長円錐における局在の変化を解析する。miRNA の局在は安定性、特異性が高い Locked Nucleic Acid (LNA) 修飾されたプローブを用いた高感度 FISH で検出する。

#### (3) 翻訳トランス因子を介した BDNF による局所翻訳調節機構の解析

$\beta$ -アクチンの局所翻訳をタンパク質レベルで確認するために、成長円錐における発現が BDNF で上昇するかを蛍光免疫染色法で可視化し、定量する。この上昇が翻訳阻害剤で抑制されることを確認した上で、リン酸化部位変異 ZBP1 の導入で同上昇が抑制されることを検討する。加えて、GFP レポーターを用いた局所翻訳の解析を行う。 $\beta$ -actin cDNA の 3' UTR 領域を GFP レポーターベクターにサブクローニングし、翻訳リポーターを作製する。これをマウス大脳皮質細胞に電気穿孔法で導入し、ニューロンボール法を行い、BDNF 刺激で成長円錐内の GFP の蛍光強度が上昇することを確認する。また、同蛍光強度上昇がチロシンリン酸化阻害剤で抑制されるか検討する。

#### (4) 翻訳トランス因子を介した BDNF による突起伸長・成長円錐回旋応答の解析

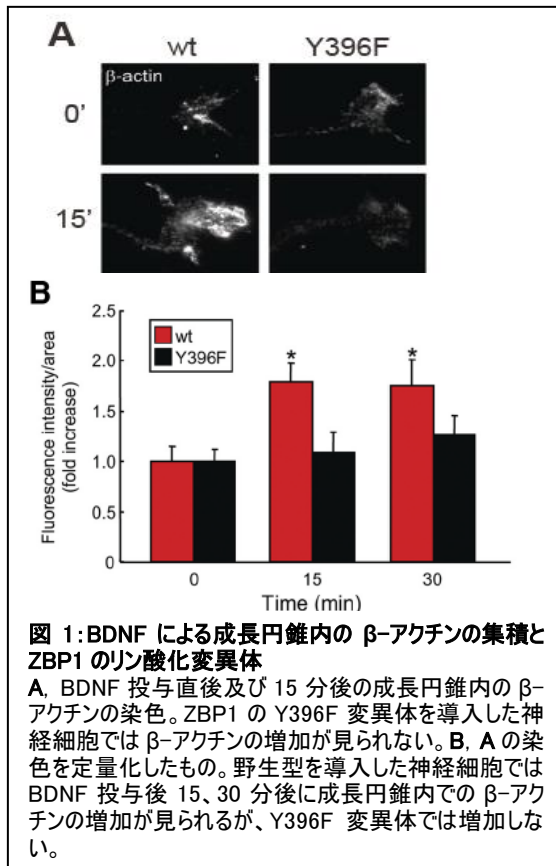
*Xenopus* 脊髄あるいはマウス大脳皮質ニューロンボールをライブイメージング用のチャンバーで培養後、顕微鏡のステージに設置し、突起伸長及び成長円錐回旋アッセイを行う。突起伸長アッセイではニューロンボールを B27 サプリメント欠損培地で 2 時間培養し、その後 BDNF を添加し、一時間の軸索伸展を計測する。成長円錐回旋アッセイでは BDNF を成長円錐の伸長方向の右 45° からガラスピペットを用いてパルス的 (間隔:2Hz、持続時間:20 ms) に放出し、成長円錐の伸長を 30 分間記録し、回旋の角度を求める。リン酸化部位変異 ZBP1 及び miRNA のアンチセンスオリゴを導入したニューロンボールを用いて上記の突起伸長・回旋応答アッセイを行い、軸索・成長円錐の応答が抑制されるかを検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) ZBP1 による $\beta$ -アクチンの局所翻訳と軸索伸長方向の制御

ZBP1 と  $\beta$ -actin mRNA の成長円錐における局在を蛍光抗体染色法と FISH 法で確認したところ、BDNF 投与により両者とも 1.5 倍程度微増した (未掲載データ)。しかし、ZBP1 の 396 番目のチロシンのリン酸化を認識する抗

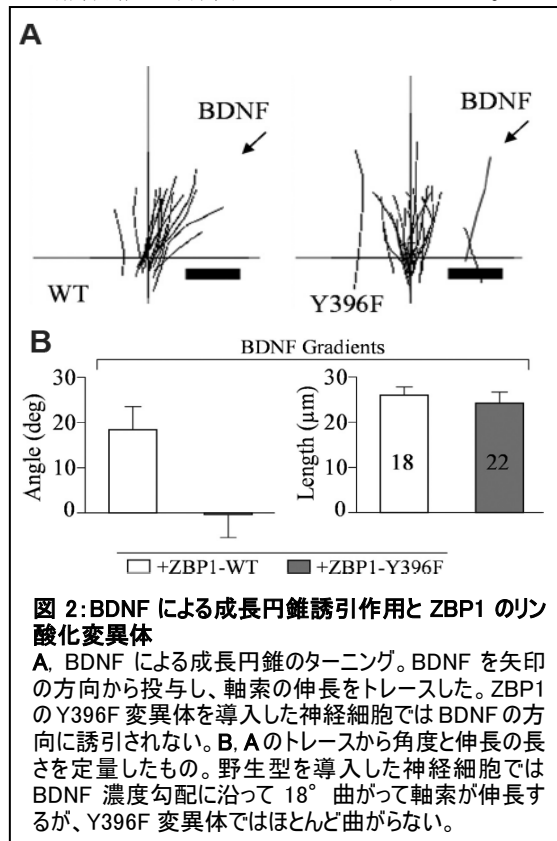
体を用いて成長円錐を染色したところ、2倍以上の増加が見られた（未掲載データ）。396番目のチロシンはSrcファミリーチロシンキナーゼでリン酸化され、mRNAに対する親和性が低下することが報告されている。従って、BDNF刺激によりZBP1がリン酸化され、 $\beta$ -actin mRNAがZBP1から放出されて翻訳可能となることが示唆された。



**図 1: BDNF による成長円錐内の  $\beta$ -アクチンの集積と ZBP1 のリン酸化変異体**  
 A. BDNF 投与直後及び 15 分後の成長円錐内の  $\beta$ -アクチンの染色。ZBP1 の Y396F 変異体を導入した神経細胞では  $\beta$ -アクチンの増加が見られない。B. A の染色を定量化したもの。野生型を導入した神経細胞では BDNF 投与後 15、30 分後に成長円錐内での  $\beta$ -アクチンの増加が見られるが、Y396F 変異体では増加しない。

次に、ZBP1 のリン酸化が局所翻訳を制御するか否かを検証した。野生型と 396 番目のチロシンをフェニルアラニンに変えた (Y396F) 変異体を神経細胞に導入し、BDNF 添加後の成長円錐内の  $\beta$ -アクチンタンパク質の発現量を免疫染色で可視化した。野生型を導入した神経細胞では BDNF 刺激で成長円錐内の  $\beta$ -アクチンは増加したが、Y396F 変異体では増加が見られなかった (図 1A)。これらを定量化したところ、野生型では BDNF 刺激後 15、30 分で有意に増加が見られたが、変異体ではほぼ変化が見られなかった。この  $\beta$ -アクチンの増加は翻訳阻害剤であるアノマイシンで抑制されたことから、局所翻訳によるものであることが示唆された。また、 $\beta$ -アクチンの 3' UTR 領域を GFP レポーターにつないだ翻訳リポーターを用いて局所翻訳を解析したところ、BDNF は成長円錐における GFP シグナルを増強した (未掲載データ)。この増強が Src ファミリーキナーゼの阻害剤で抑制されたことから、Src キナーゼによる ZBP1

のリン酸化が成長円錐における  $\beta$ -アクチンの局所翻訳を制御することが示唆された。

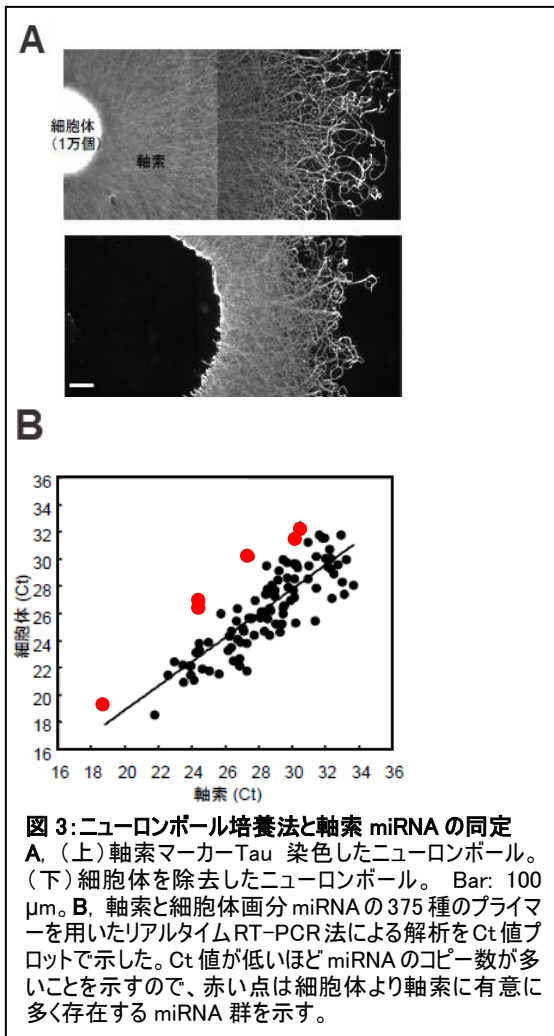


**図 2: BDNF による成長円錐誘引作用と ZBP1 のリン酸化変異体**  
 A. BDNF による成長円錐のターニング。BDNF を矢印の方向から投与し、軸索の伸長をトレースした。ZBP1 の Y396F 変異体を導入した神経細胞では BDNF の方向に誘引されない。B. A のトレースから角度と伸長の長さを定量化したもの。野生型を導入した神経細胞では BDNF 濃度勾配に沿って 18° 曲がって軸索が伸長するが、Y396F 変異体ではほとんど曲がらない。

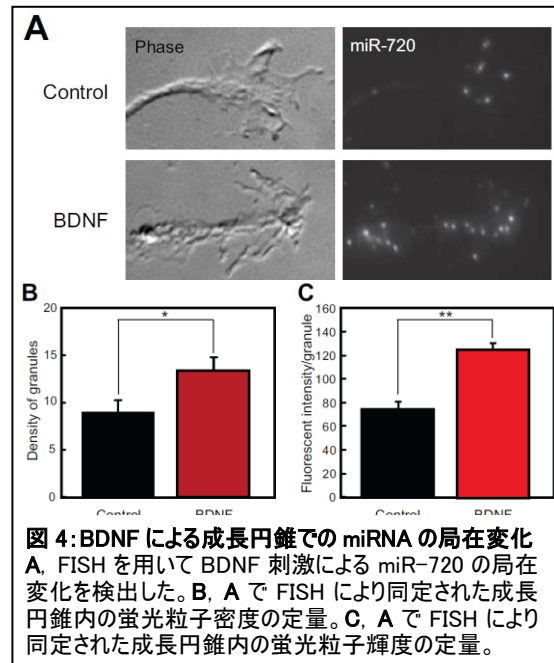
さらに、ZBP1 のリン酸化が成長円錐のターニングを制御するか否かを検討するために、野生型と Y396F 変異体を神経細胞に導入し、ターニングアッセイを行った。野生型を導入した神経細胞ではピペットによる BDNF の濃度勾配に誘引され、神経軸索はピペットの方向に 18° 曲がって伸長した (図 2)。一方、Y396F 変異体を導入した神経細胞ではほとんど曲がらなかった。両方とも軸索伸長自体はほぼ変わらなかったことから、ZBP1 のチロシンリン酸化は軸索の伸長方向のみを制御することが示唆された。以上より、翻訳トランス因子である ZBP1 はそのリン酸化により  $\beta$ -アクチンの局所翻訳を制御し、軸索ガイダンスに関与することが示唆された。

## (2) 軸索・成長円錐における miRNA の局在と軸索伸長の制御

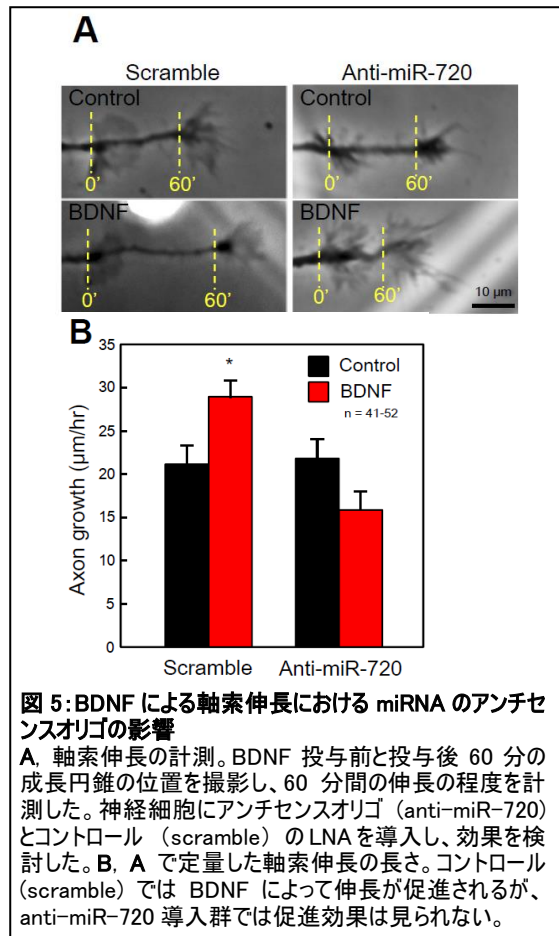
神経軸索には miRNA のプロセッシングや機能発現に必要な Dicer や Argonaute タンパク質の局在は報告されているものの、軸索や成長円錐における miRNA の局在は全く不明であった。そこで、我々は軸索を高純度、高収率で単離できる新規培養法「ニューロンボール法」を用い、マウス大脳皮質神経細胞の軸索 miRNA のプロファイリングを行った (図 1A)。1,200 個のニューロンボールより細胞体と軸索を単離し、RNA を抽出後、375 種類の miRNA の発現をリアルタイム RT-PCR を用いて定量



した。その結果、105 種類の miRNA の発現が認められ、そのうち 6 種類が細胞体に比べ軸索に有意に多く発現していた (図 1B)。



軸索に局在する 6 種の miRNA のうち、4 種類は FISH にて軸索と成長円錐に粒子状に局在することが確認できた (未掲載データ)。これらの miRNA が BDNF 刺激により局在が変動するかを確認するために、そのうちのひとつである miR-720 の局在を FISH で解析した (図 4A)。その結果、BDNF 刺激によって成長円錐内での miR-720 の局在を示す粒子数が増加するだけでなく、一粒子あたりの蛍光輝度も上昇していた (図 4BC)。これらのことより、miRNA は軸索や成長円錐に局在し、細胞外刺激に応じてその局在が変動することが明らかとなった。



成長円錐で局在が変動する miRNA が軸索機能に関与するか否かを明らかにするために、miR-720 のアンチセンスオリゴ (anti-miR-720) の軸索伸長における効果を検討した。コントロールオリゴ (scramble 配列) を導入した神経細胞では BDNF により軸索伸長が促進されたが、anti-miR-720 を導入した神経細胞では BDNF の効果が見られなかった (図 5)。従って、miR-720 は軸索伸長に関与することが示唆された。以上より、軸索に局在する miRNA は細胞外刺激によって成長円錐への局在が増加し、翻訳抑制を行うことにより、軸索伸長を制御する可能性がある。我々は本研究期間中に米国エモリー大学の

Zheng 研究室と共同研究を行い、miR-134 が BDNF による成長円錐の誘引応答に関与していることを明らかにした。miR-134 は我々の miRNA プロファイリングでも軸索に局在する miRNA として同定された。従って、我々が同定した miR-134 以外の軸索 miRNA も軸索伸長だけでなく軸索ガイダンスに関与している可能性がある。

本研究により明らかになったことは、

- (1) RNA 結合タンパク質の一つである ZBP1 が細胞外刺激に応じて成長円錐で  $\beta$ -アクチンの翻訳を調節する「翻訳トランス因子」として機能する。局所翻訳の調節により軸索伸長の方向が制御される。
  - (2) miRNA が中枢神経の軸索及び成長円錐に局在することを明らかにし、細胞外刺激により局在が変動し、軸索伸長を制御することを示唆する結果を得た。
- (1) に関しては期間中に論文として発表し (Sasaki et al, J Neurosci, 2010)、(2) に関しては現在投稿中である。特に、新規培養法「ニューロンボール法」を用いた miRNA のオミクス解析は他に例を見ない研究であり、その結果、中枢神経の成長円錐における miRNA の局在を世界に先駆けて見いだすことに成功した。今後、miRNA と RNA 結合タンパク質の両方が協調して局所翻訳に関与する可能性が注目される。これらによる局所翻訳調節が軸索ガイダンスだけでなくシナプス形成にどのような役割を果たすのか研究を行う予定である。

#### 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 7 件)

- (1) Iketani M., Iizuka A., Sengoku K., Kurihara Y., Nakamura F., Sasaki Y., Sato Y., Yamane M., Matsushita M., Nairn A. C., Takamatsu K., Goshima Y., Takei K. Regulation of neurite outgrowth mediated by localized phosphorylation of protein translational factor eEF2 in growth cones. *Dev. Neurosci.* 73: 230-246 (2013). 査読有。  
doi: 10.1002/dneu.22058.
- (2) Goshima Y., Sasaki Y., Yamashita N., Nakamura F. Class 3 semaphorins as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* 16: 933-944 (2012). 査読有。  
doi: 10.1517/14728222.2012.710201.
- (3) Hida T., Yamashita N., Usui H., Nakamura F., Sasaki Y., Kikuchi A.,

Goshima Y. GSK3  $\beta$  / axin-1/  $\beta$ -catenin complex is involved in semaphorin3A signaling. *J. Neurosci.* 32: 11905-11918 (2012). 査読有。doi: 10.1523/JNEUROSCI.6139-11.2012.

- (4) 佐々木 幸生、五嶋 良郎 神経軸索・成長円錐における局所翻訳制御と機能調節 *細胞工学* 31: 677-682 (2012). 査読無。
- (5) Yamashita, N., Mosinger, B., Roy, A., Miyazaki, M., Ugajin, K., Nakamura, F., Sasaki, Y., Yamaguchi, K., Kolattukudy, P., Goshima, Y. CRMP5 (Collapsin Response Mediator Protein 5) Regulates Dendritic Development and Synaptic Plasticity in the Cerebellar Purkinje Cells. *J. Neurosci.* 31: 1773-1779 (2011). 査読有。  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.5337-10.2011.
- (6) Han, L., Wen, Z., Lynn, R. C., Baudet, M. L., Holt, C. E., Sasaki, Y., Bassell, G. J., Zheng, J. Q. Regulation of chemotropic guidance of nerve growth cones by microRNA. *Mol. Brain* 4:40 (2011). 査読有。  
doi: 10.1186/1756-6606-4-40.
- (7) Sasaki, Y., Welshhans, K., Wen, Z., Yao, J., Xu, M., Goshima, Y., Zheng, J. Q., Bassell, G. J. Phosphorylation of zipcode binding protein is required for BDNF signaling of local  $\beta$ -actin synthesis and growth cone turning. *J. Neurosci.* 30: 9349-9358 (2010). 査読有。  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0499-10.2010.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 佐々木 幸生 翻訳トランス因子による軸索局所翻訳制御と神経疾患との関連 日本生理学会 (招待講演)、平成 25 年 03 月 28 日、タワーホール船堀 (東京都)。
- (2) 佐々木 幸生、Xing, L., Gross C., 五嶋 良郎, Bassell, G. J. 神経軸索におけるマイクロ RNA オミクスにより同定された miRNA-720 は神経栄養因子による軸索伸長に関与する。日本 RNA 学会、平成 24 年 7 月 20 日、東北大学百周年記念会館川内萩ホール (宮城県)。
- (3) Sasaki Y., Xing L., Gross C., Goshima, Y., Bassell G. J. Identification of axonal microRNAs reveals involvement of miR-720 in neurotrophin-regulated axonal growth. The 22nd CDB Meeting, RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II、平成 24 年 6 月 11 日~6 月 13 日、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (兵庫県)。
- (4) 佐々木 幸生, Xing, L., Gross, C., 五

嶋 良郎, Bassell, G. J. Brain-derived neurotrophic factor regulates localization of microRNA-720 in growth cones. 第84回日本生化学会大会、平成23年9月24日、国立京都国際会館（京都府）。

(5) Sasaki, Y., Xing, L., Gross, C., Goshima, Y., and Bassell, G. J. Brain-derived neurotrophic factor regulates localization of microRNA-720 in growth cones. 第34回日本神経科学大会、平成23年9月16日、パシフィコ横浜（神奈川県）。

(6) Sasaki Y., Xing, L., Gross, C., Goshima, Y., Bassell, G. J. Profiling of microRNAs enriched in axons. 第33回日本神経科学大会、平成22年9月4日、神戸コンベンションセンター（兵庫県）。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 幸生 (SASAKI YUKIO)  
横浜市立大学・医学研究科・特任准教授  
研究者番号：10295511

### (2) 連携研究者

五嶋 良郎 (GOSHIMA YOSHIO)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：00153750