

機関番号：22701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770190

研究課題名 (和文) PAR-aPKCによるmRNAの局在化と翻訳制御機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of translation machinery and mRNA localization by PAR-aPKC complex

研究代表者

林 健二 (HAYASHI KENJI)

横浜市立大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号：50512349

研究成果の概要 (和文)：マウス海馬神経細胞における樹状突起スパインの形態維持に、PAR1b が機能することを初めて解明した。PAR1b は樹状突起に局在し、成熟後の神経細胞においてノックダウン(KD)を行うと、スパインの形態がフィロポディア様に変化した。さらに、PAR1b の KD により微小管ダイナミクスが低下しており、アクチン重合に関わる p140Cap のスパイン内の局在が異常になっていた。以上の結果から、PAR1b は微小管のダイナミクスを制御することで、スパインの維持に関わると結論づけた。

研究成果の概要 (英文)：We revealed that PAR1b participates in the maintenance of mature dendritic spine morphology in mouse hippocampal neurons. PAR1b localized in the dendrites of mature neurons, and PAR1b knockdown cells exhibited decreased mushroom-like dendritic spines, as well as increased filopodia-like dendritic protrusions. We revealed that microtubule growth distance in dendrite region is decreased following PAR1b knockdown. In addition, reduced accumulation of GFP-p140Cap, an actin reorganizing protein, in dendritic protrusions was confirmed in PAR1b knockdown neurons. In conclusion, the present results suggested a novel function for PAR1b in the maintenance of mature dendritic spine morphology by regulating microtubule growth and the accumulation of p140Cap in dendritic spines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：PAR1b/MARK2, Microtubule, Dendritic spine, +TIPs

1. 研究開始当初の背景

PAR-aPKC とは、Protein Kinase C (PKC)

の一種である atypical PKC (aPKC)、スキヤホールド蛋白質である PAR-3、活性調節因子である PAR-6 などが、細胞に極性を持って形成する蛋白質複合体のことである。上皮細胞の apical-basal 極性、神経細胞の軸索-樹状突起決定など、表面的には全く異なる現象と思われるような多様な細胞の極性化のイベントが PAR-aPKC 複合体によって決定される。

一方、mRNA の局在化、さらにそれに引き続く局所的なタンパク質の翻訳が、様々な細胞の生理機能に関与するという知見が蓄積しつつある。神経細胞においては、長期可塑性に関与する CaMKII β などの mRNA がスパインに局在化することなどの報告がある。しかしながら、どのようにして輸送された mRNA が局在化させられるのかという最も根源的な問題は解明されていない。mRNA の局在化は、細胞の不均一性を増加させることに他ならず、PAR-aPKC 複合体が mRNA の局在化に対して制御を行っている可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

細胞の極性化及び維持の制御装置である PAR-aPKC 複合体による mRNA 及び翻訳装置の局在化制御機構を目的とした。

3. 研究の方法

マウス成熟神経細胞を用いて、①主として生化学、分子生物学的な手法を用いた、形態の解析と、②イメージング技術の解析による、分子機構解明を目指した。

4. 研究成果

我々は、細胞の極性化の制御因子である PAR-aPKC 複合体が、神経細胞において mRNA 及び翻訳装置の局在化を担う可能性を検証することを目的として、本研究を開始した。

現在までに mRNA の局在化がスパインの形

態形成、維持に密接に関与することが明らかとなっている。そこで、PAR-aPKC システムと mRNA の局在化との関連性を調べるために、海馬神経細胞のスパインの形態への影響を指標としたノックダウンのスクリーニングを行った。

その結果、aPKC によりその活性が抑制されることが知られ、微小管の安定性に関わる PAR1b/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2) のノックダウンにより、スパインがフィロポディア様に変化することが明らかとなった(図 1)。

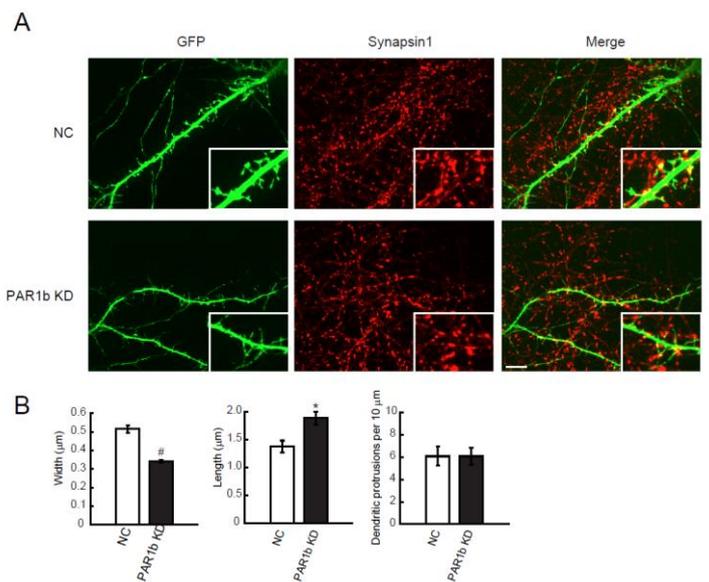


図 1 PAR1b ノックダウンによるスパイン形態の異常

シナプス前終末との共染色などから、この構造変化はスパインの維持の異常によるものであり、さらに免疫染色法による解析で、

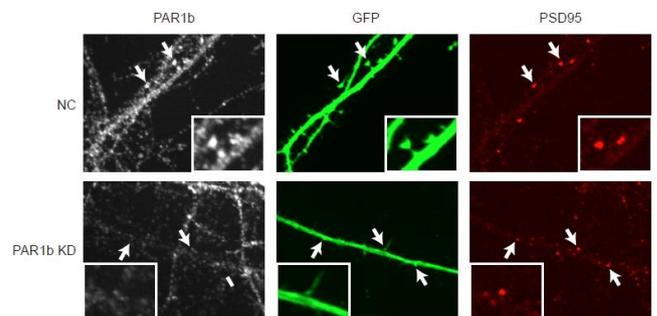


図 2 PAR1b の樹状突起及びスパインへの局在

PAR1b は通常、樹状突起、とりわけスパインに強い局在を示すことを明らかにした(図 2)。

しかしながら、PAR1b による mRNA、翻訳装置の局在化に対する作用、或いは分子間相互作用などを見出すことは出来なかった。

一方、近年になり、微小管ダイナミクスによってアクチン骨格系の再編成を担う p140Cap のスパイン内の局在化が制御され、そのことによりスパインの形態が維持されることが示されている(Jaworski J et al., Neuron 61, 85-100, 2009)。

PAR1b は、tau を始めとする微小管結合タンパク質をリン酸化し、微小管との親和性を制御するセリン/スレオニンキナーゼとして働くことが知られており、PAR1b の高発現は CHO 細胞などにおいて微小管の消失を引き起こすことなどから、PAR1b は微小管の不安定性を正に制御することが推測されている(Drewes G et al., Cell 89, 297-308, 1997)。また、PAR1b ノックアウトマウスは、空間学習と記憶に障害を持つことが報告されている(Segu L et al., Neurobiol Aging 29, 231-240, 2008)。これらのことは、PAR1b が微小管のダイナミクスを介してスパインの形態形成、維持に関与するという可能性を想起させる。

そこで我々は、PAR1b ノックダウンによる微小管ダイナミクスへの影響を解析することにした。EB3-GFP を用いて神経細胞における微小管の挙動を解析してみると、予期した通り、PAR1b をノックダウンした神経細胞において微小管のダイナミクスが低下することを明らかにした(図 3)。さらに、GFP-p140Cap のスパイン内の局在が PAR1b ノックダウンにより、顕著に抑制されることを見出した(図 4)。以上の結果から、PAR1b は微小管のダイナミクスを制御することで、スパインの形態維持に関わると結論した。

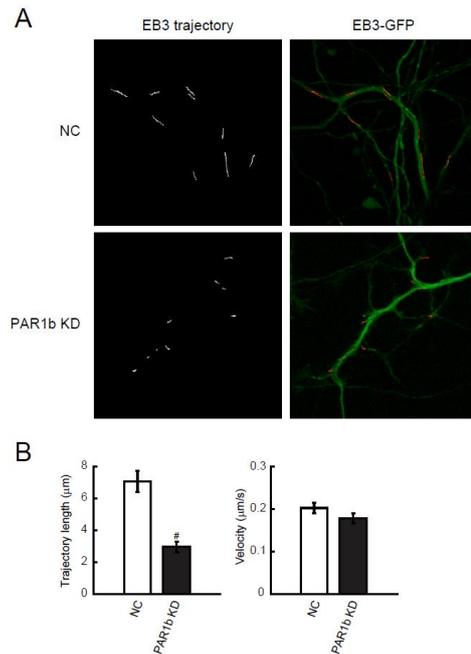


図 3 PAR1b ノックダウンによる微小管ダイナミクスの低下

本研究により、スパインの形態に微小管ダイナミクスの制御因子が積極的に関与することで、安定的なシナプス構造が維持されるということを明らかにすることができた。

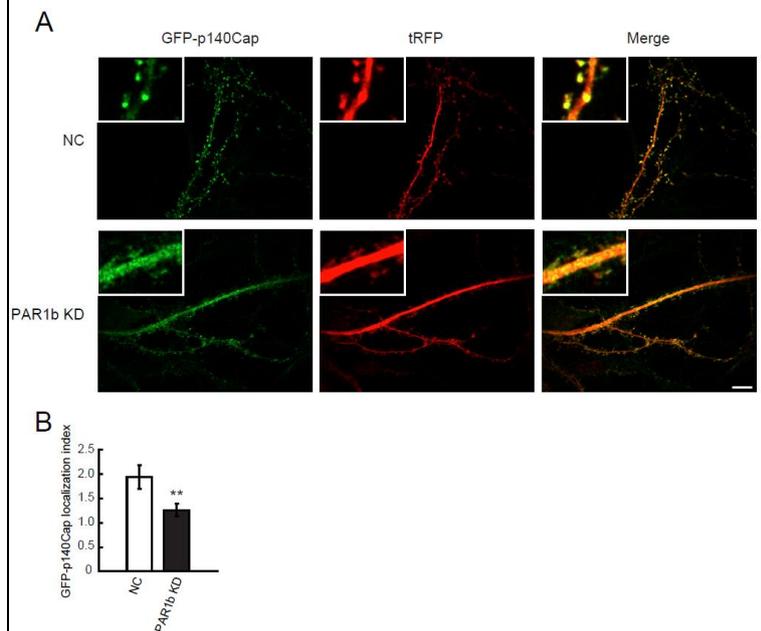


図 4 PAR1b ノックダウンによる GFP-p140Cap の局在異常

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)

〔学会発表〕（計 2 件）

①林健二、鈴木厚、大野茂男、Maintenance of dendritic spine morphology by PAR1b through regulation of microtubule Dynamics, 第 6 3 回日本細胞生物学会大会、北海道大学クラーク会館, 2011 年 6 月

②林健二、鈴木厚、大野茂男、Maintenance of dendritic spine morphology by PAR1b through regulation of microtubule Dynamics, 第 3 3 回日本分子生物学会年会 第 8 3 回日本生化学会大会 合同大会, ポートアイランド, 2010 年 12 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 健二 (HAYASHI KENJI)
横浜市立大学・医学研究科・博士研究員
研究者番号：50512349

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：