

## 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5月30日現在

機関番号：82626	
研究種目：基盤研究（C）	
研究期間：2010～2012	
課題番号：22500305	
研究課題名（和文）	BDNFプロドメインの新しい生理作用に関する構造生物学と神経生理学の融合研究
研究課題名（英文）	The BDNF pro-peptide is a novel facilitator of hippocampal LTD and the biological action is altered by a common BDNF polymorphism Val66Met
研究代表者	
小島 正己（KOJIMA MASAMI）	
独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長	
研究者番号：40344171	

## 研究成果の概要（和文）：

成長因子をはじめとする生体タンパク質は、活性化型になるまでにプロセッシングと呼ばれる酵素反応を受けるものが存在する。本研究においては神経栄養因子のプロセッシングに反応  $\text{proBDNF} \rightarrow \text{mature BDNF} + \text{BDNF pro-peptide}$  に注目した。その結果、BDNF pro-peptide には BDNF 伝達を抑制する活性があること、その活性発現に必要な受容体等を決定した。プロセッシングは多くの成長因子の活性化に共通するメカニズムであるが、本研究の成果は成長因子研究分野に新たなメカニズムの存在の可能性を示唆する。

## 研究成果の概要（英文）：

Most growth factors are initially synthesized as precursors and subsequently processed into their mature form and its pro-peptide by proteolytic cleavage in the secretory pathway and extracellular spaces. Compared to that of the mature form, the biological role of the pro-peptide is not well understood. In the present study, we found a new role of the BDNF pro-peptide in the central nervous system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：神経栄養因子・神経細胞・神経伝達・プロセッシング・分泌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) BDNF プロドメインの新機能の発見

① BDNF プロドメインは BDNF と強く相互作用する (図 1B)

BDNF プロドメインのピアコアチップを作

製しプロドメイン相互作用分子を検索してきた。

その結果、BDNF 自身はそのプロドメインに強く相互作用することを見いだした

(図 2B :  $K_d = 10^{8-9}$  M)。

② BDNF プロドメインは NGF とは相互作用しな

い (図 1 C : BDNF vs NGF)

BDNF を含む神経栄養因子ファミリー (ニューロトロフィンファミリー) の中で、NGF は BDNF と最も分子進化的に遠縁であり、BDNF プロドメインとは相互作用しなかった。

③BDNF プロドメインは LTD を促進する (図 1 D 灰色 : BDNF prodomain)

BDNF プロドメイン (100 ng/ml) を還流した海馬スライス標本において、CA1-CA3 興奮性シナプス伝達の LTD を誘発すると、コントロール標本に比べて LTD が一時間以上促進された。

④BDNF プロドメインは BDNF による LTD 回復作用を阻害する (図 1 D 緑 : matureBDNF +BDNFprodomain) BDNF プロドメインと BDNF を 10 分間インキュベートした後、3) と同様に投与し LTD への効果を見た。その結果、BDNF が行う LTD の回復効果 (図 1 D : BDNF) は、BDNF プロドメインの同時投与により阻害されされた。

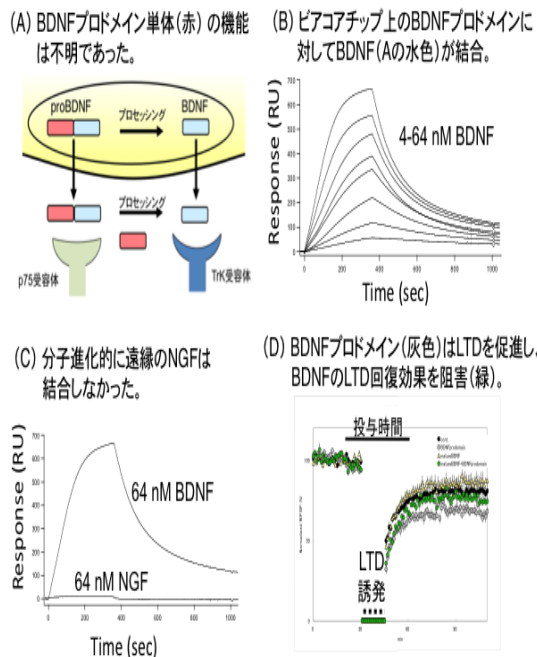


図1 研究背景 その1

(2) BDNF プロドメインに関する国内外の研究動向

前駆体から成熟体へと細胞内外プロテアーゼにより変換された BDNF (mBDNF) が、神経細胞の成長、生存、シナプス機能を促進することはよく知られているが (Reichardt, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006)、BDNF

プロドメイン (図 1 A) に関する知見は世界的にまだ乏しかった。

しかし、

①BDNF プロドメインの SNPs (Val166Met 変異) が BDNF 分泌能を低下させる

②proBDNF は mBDNF と相反する生理作用 (神経細胞死、スパイン退縮など) を行うという知見は、BDNF プロドメインの機能的重要性を強く示唆している (Barker, Nat. Neurosci., 2009)。

## 2. 研究の目的

神経栄養因子 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) のプロドメインに新しい機能を見いだした。そこで本研究においては、BDNF プロドメインの構造と機能の解明を目指し、構造生物学者および神経生理学者との分野融合研究を行う。

### 1) 分野融合研究による新しい BDNF パラダイムの検証

本研究は、構造生物学、神経生理学の研究者との融合的共同研究により、BDNF プロドメインの分子細胞機能を多角的に検証し、新しい BDNF パラダイムの提唱を目指している。

### 2) BDNF プロドメインの機能解明と BDNF の SNPs 研究への貢献

BDNF が発見されて以来、機能解明が進んでいなかった BDNF プロドメインについて進捗が期待されると同時に、プロドメインに存在する SNPs の機能解明につながる。

### 3) 現代構造生物学の重要課題に対する研究モデルの可能性

それ自体ではランダムであるが、ターゲットと相互作用したときヘリックス構造をとる蛋白質のメカニズムは現代構造生物学においても未解明である (桑島&後藤、蛋白質フォールディングの諸問題、蛋核酵、2002)。BDNF プロドメインは単独ではランダムであるが (未発表)、BDNF に相互作用したときヘリックス形成し安定化する可能性が考えられる。転写因子が取り上げられることが多いが、神経栄養因子でも同様の機能的構造

変化の可能性が注目される。

#### 4) シナプス可塑性における BDNF 仮説の新展開

BDNF は LTP を促進し LTD を抑制する ((Reichardt, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006)。一方、proBDNF は LTD を促進しスパイン密度を低下する (Woo et al., *Nat. Neurosci.*, 2005; Koshimizu et al., *Mol. Brain*, 2009)。本研究では、BDNF プロドメインが促進する LTD のメカニズムを解明し、シナプス可塑性における BDNF 仮説の新たな展開を目指している。

#### 3. 研究の方法

BDNF とそのプロドメインの分子内相互作用は、BDNF プロドメインが細胞内外プロテアーゼによる切断後も BDNF と共にヘテロダイマーを形成しうることを示唆する。一方、海馬スライス標本を用いた電気生理実験では、プロドメインが共存すると BDNF による LTD 抑制効果がコントロールレベルまで低下し、BDNF プロドメイン自身に LTD 促進効果を見いだした。これらの結果は、プロドメインが BDNF の機能を阻害するインヒビター蛋白質として働くことを強く示唆し、プロドメインに存在する SNP が BDNF プロドメイン機能に影響することも予想される。

本研究では、構造生物学、分子細胞生物学、神経生理学の手法を用いて、これらの可能性を検証していく。

#### 4. 研究成果

(1) Y.-A. Barde との共同研究により、内在性 BDNF pro-peptide がシナプス前部に存在することを示したが (Dieni et al., 2013)、BDNF pro-peptide が培養海馬神経細胞の培養上清にも存在することを確認した。

(2) ノックアウトマウス、特異的ブロッカーを用いた電気生理の研究から BDNF pro-peptide は神経伝達の長期抑制 (LTD) を促進する因子であること、そのメカニズムとして、p75 を介するシグナル伝達が重要であること LTD の分子メカニズムであるグルタミン酸受容体の細胞表層からの endocytosis、exocytosis を BDNF pro-peptide 自身が促進することを見いだした。

(3) BDNF pro-peptide は、プロセッシングに反応 proBDNF → mature BDNF + BDNF pro-peptide の反応残物ではなく、LTD の促進因子として機能することを明らかにした。

(4) BDNF pro-peptide が神経伝達を抑制する分子であることを見だし、その分子メカニ

ズムをさらに解明。

#### 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 6 件)

- ① Uegaki K., Ishikawa Y., Mizui T., Hirokawa T., Hara T., Suzuki S., Takahashi M., Shiosaka S., Itami C., Kumanogoh H., Kojima M.  
The BDNF pro-peptide is a novel facilitator of hippocampal LTD and the biological action is modulated by a common BDNF polymorphism Val66Met, in press
- ② S. Dieni, T. Matsumoto, M. Dekkers, S. Rauskolb, M. Ionescu, R. Deogracias, E. D. Gundelfinger, M. Kojima, S. Nestel, M. Frotscher, Y.-A. Barde, BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons, *Journal of cell Biology*, 2012, vol. 196 no. 6 775-788.
- ③ Yosuke Sato, Shingo Suzuki, Mako Kitabatake, Tomoko Hara, and Masami Kojima Generation of TrkA/TrkB Chimeric Receptor Constructs Reveals Molecular Mechanisms underlying BDNF-Induced Dendritic Outgrowth in Hippocampal Neurons. *CELL. MOL. NEUROBIOL.* vol. 31 2011, no. 605-614
- ④ Koshimizu, H., Hazama, S., Hara, T., Ogura, A., and Kojima, M. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons, *Neurosci Lett.* 2010, vol. 473 no. 229-232
- ⑤ 熊ノ郷晴子、水井利幸、高橋正身、小島正己  
うつ病に関する BDNF 研究：現状と課題、*実験医学*、28 巻、2010、89-95、
- ⑥ Koshimizu, H., Kiyosue, K., Hara, T., Hazama, S., Suzuki, S., Uegaki, K., Nagappan, G., Zaitsev, E., Hirokawa, T., Tatsu, Y., Ogura, A., Lu, B. & Kojima, M. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival, *Mol. Brain*, vol. 1, 2, 2009, no. 1-19

[学会発表] (計 4 件)

- ① Uegaki K., Ishikawa Y., Mizui T., Kumanogoh H., Kojima M. The BDNF pro-peptide is a novel facilitator of

hippocampal LTD and the biological action is modulated by a common BDNF polymorphism Val66Met, GRC, 2013, New Port

② Masami Kojima, BDNF and mood disorders, 第34回日本神経科学大会, 2011年9月17日, パシフィコ横浜(神奈川県)

③ Masami Kojima

The BDNF pro-peptide is a new modulator of synaptic plasticity in the nervous system NGF 2010, 10<sup>th</sup>, 6, 2010. Helsinki, Finland

④ 小島正己、神経栄養因子 BDNF の機能未知ドメインが行う脳機能調節、生理研研究会、2009年6月19日、生理学研究所(岡崎市)

[図書] (計2件)

① Y. Ishikawa, M. Kojima, The role of brain-derived neurotrophic factor as a modulator of synaptic plasticity, Brain Aging, Therapeutic Interventions,

② 熊ノ郷晴子、水井利幸、高橋正身、小島正己、実験医学、うつ病に関する BDNF 研究：現状と課題、2010年、7ページ

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：成長因子ペプチド

発明者：上垣浩一、水井利幸、熊ノ郷 晴子、原とも子、石川保幸、小島正己

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：2010-123957

出願年月日：2010年5月31日

国内外の別：国内

○取得状況(計1件)

名称：神経細胞死促進因子及び該因子を高感度に検出する方法

発明者：小島正己、原とも子、小清水久嗣、上垣浩一、柏原めぐみ

権利者：(独)産業技術総合研究所

種類：特許

番号：4457216

取得年月日：2010年2月19日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.aist.go.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島 正己 (KOJIMA MASAMI)

独立行政法人産業技術総合研究所  
健康工学研究部門・研究グループ長  
研究者番号：40344171

### (2) 研究分担者

上垣 浩一 (UEGAKI KOUICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所  
生体分子創製研究グループ

研究グループ長

研究者番号：00356544

石川 保幸 (ISHIKAWA YASUYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科

助教授

研究者番号：90346320