

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10日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500329

研究課題名（和文） 中枢神経細胞における軸索内局所的蛋白合成の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanisms underlying axonal local protein synthesis in neurons

研究代表者 武井 延之（TAKEI NOBUYUKI）

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：70221372

研究成果の概要（和文）：

1) 軸索先端(成長円錐)における翻訳装置の存在。

翻訳装置として必須であるのはリボソームであるが従来軸索内にはリボソームは存在しないと言われてきた。成長円錐に関しては不明であり、局所翻訳が指摘されている今も明らかになっていない。本研究では各種リボソーム蛋白に体する抗体を用い、免疫染色を行った。初代培養した海馬神経細胞及び、後根神経節神経細胞の成長円錐において陽性反応が得られた。さらに成長円錐内には各種翻訳因子の存在も確認された。成長円錐の形態は原子間力顕微鏡で詳細に解析しており、リボソームの局在という新たな知見を得ることが出来た。

2) 軸索/成長円錐内局所的蛋白合成の証明とトリガーの探索。

成長円錐での翻訳活性化因子としてBDNF (brain-derived neurotrophic factor)とWnt3aを同定できた。これまでのRIラベルしたメチオニンの取込み実験に加え、ピューロマイシンとその抗体を用いた方法による免疫細胞化学染色によって成長円錐において刺激(BDNF,Wnt3a)応答性に蛋白合成の亢進することを見いだした。

以上の結果は神経細胞の成長円錐には翻訳装置が存在し、神経栄養因子などの刺激によって新規蛋白合成が局所で起ることを示している。このことは突起伸展、軸索誘導などの生理的現象の分子基盤の一つであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

1) **Translation machinery in growth cone.**

Existence of ribosomes in growth cone was investigated by immunocytochemistry with anti-ribosomal protein antibodies. Although it is widely believed that there is no ribosomes in axon, immunoreactivity against ribosomal proteins was recognized in growth cone of cultured dorsal root ganglia neurons and of hippocampal neurons. In addition, several translation factors were found in growth cone of these neurons. Precise morphological analysis of growth cone was performed by using atomic force microscopy.

2) **Triggers of local translation in growth cone.**

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and Wnt3a were identified as a trigger of local translation in growth cone. In addition to the [35S]methionin incorporation, puromycin-anti-puromycin immunocytochemistry method revealed that these factors activate novel protein synthesis in growth

cones.

These results indicate the existence of translational machinery in growth cone and strongly suggest that local protein synthesis occurs in growth cones in response to certain growth factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
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：細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は一本の軸索と複数の樹状突起をもつ形態的に特殊な細胞である。これらの突起は細胞体の何倍もの長さをもっている。また情報の送り手、受け手として重要で動的な機能を持っている。細胞体から離れた部位で、刺激に応答して、機能蛋白質の増加をとまなうような変化が起こる際、細胞体から合成された蛋白質を輸送してくるのは時間や特異性の面から効率的とは言えない。そこで「局所的蛋白質合成」という概念が生まれ、これまで主に樹状突起のポストシナプスで研究が進んできた。最近では軸索（あるいは成長円錐やプレシナプス）での局所的蛋白質合成の研究も注目されている。樹状突起での蛋白質合成が、中枢の比較的成熟した神経細胞におけるシナプス可塑性の分子基盤として研究されているのに対して、軸索/成長円錐のそれは、主に末梢神経細胞の発達、及び再生過程における突起伸展に関わる分子基盤として研究されている。しかしながら現象としては報告が相次いでいるものの、分子メカニズム、シグナル伝達機構に関しては、ほとんど研究されていない。

申請者はこれまで、樹状突起内での局所的翻訳機構の研究を行い、翻訳装置（リボソームや翻訳因子）が樹状突起に存在すること、神経栄養因子であるBDNFが主にmTOR(mammalian target of rapamycin)の経路を活性化して、局所的蛋白質合成を誘導することを見出している。本研究の課題は、中枢神経細胞の軸索内/成長円錐内の翻訳活性化の新たなト

リガーの探索と、翻訳活性化のシグナル伝達機構の解明にある。軸索内蛋白質合成が突起伸展とリンクして考えられていることから、トリガーとしても軸索ガイド因子(guidance cue)が研究されてきている。Wnt およびその下流で制御されているGSK3bは軸索の極性決定やガイダンスに働いていることが知られており、軸索内翻訳活性化のトリガーの新たな候補と考えられる。

樹状突起(ポストシナプス)での翻訳シグナルは、受容体型チロシンキナーゼあるいは代謝型(7回膜貫通型)神経伝達物質受容体からPI3K-Akt-TSC-Rheb-mTORを経由してeIF4F複合体の活性化とp70S6K-S6の活性化により翻訳を増強するシグナルフローをメインにしている。軸索/成長円錐内翻訳のシグナル系では断片的な情報しか無く、体系的なシグナル経路の解明が待たれている。軸索内翻訳活性化の生化学的メカニズムを明かにし、生理的機能である突起伸展(正確には誘引/反発の双方)との関係を解明することを目指す。

2. 研究の目的

細胞体から離れた部位で、刺激に応答した迅速な機能変化を求められる神経細胞では、「局所的蛋白質合成」が重要な働きをしている。軸索における局所的蛋白質合成は、中枢神経細胞ではあまり明らかではなく、特に刺激に応答した翻訳調節機構の分子基盤は全く不明といってもよい。本研究では、軸索、特に成長円錐内翻訳活性化の新たなトリガーを見つけると共に、ど

のようなシグナル系を通じて翻訳を活性化するのは、どのような翻訳因子、あるいは翻訳調節因子が関与しているのかを解明することを第一目標とする。さらに軸索の伸展(あるいは反発)過程への関与を明かにすることで、細胞内の生化学的变化と細胞の生物学的応答のミッシングリンクを繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 軸索及び神経終末における翻訳装置の存在の証明

翻訳にはリボソーム、翻訳因子群、アミノアシル tRNA、mRNA が必須である。この中で軸索での存在が多く報告されているものはいくつかの mRNA にすぎない。リボソームに関しては従来は存在しないとされていたが、成長円錐に関しては不明である。一方、アミノアシル tRNA と翻訳因子群に関しては全く報告がない。これら全ての存在が確認されない限り、翻訳機構を明らかにすることはできない。

そこで後根神経節神経細胞及び海馬培養細胞を用い、軸索マーカー/成長円錐マーカー (tau-1, GAP43 など) とリボソーム蛋白、翻訳因子群の 2 重免疫細胞化学染色により各分子の分布を調べる。

2) 軸索/成長円錐内局所的蛋白合成の証明とトリガー因子の探索

I) 軸索、プレシナプス、成長円錐で新規蛋白合成が行われていることをピューロマイシンテクノロジーを用いた SUnSET 法により明らかにする。

II) 軸索/成長円錐に受容体が存在する分子を候補としてトリガーの探索を行う。発達期の軸索の突起伸展や極性の決定に働く軸索ガイド因子などについて検討を加える。

4. 研究成果

1) 軸索先端(成長円錐)における翻訳装置の存在。

軸索マーカー (tau-1) や神経突起マーカー (neurofilament150K) との二重免疫染色により、成長円錐にリボソーム蛋白の存在を認めた。リボソームは巨大蛋白 RNA 複合体であり、単一の構成蛋白の存在だけでリボソームの存在を証明することは出来ない。本研究では少なくとも P0/1/2 抗体、L7a 抗体、S6 抗体で陽性反応が得られた。また翻訳因子に関しては eIF2a, eEF2 の存在を確認している。詳細な形態に関しては AFM(原子間力顕微鏡)で解析しており、少なくとも成長円錐に関しては翻訳装置の存在が確認された。一方、軸索に関しては一貫した結果が得られず、陽性像は成長円錐への輸送途中のモノの可能性もあり、更なる検討が必要とかがえられた。

2) 成長円錐内での局所的蛋白合成

ピューロマイシンを添加し、ペプチド鎖(新規合成中の蛋白)にピューロマイシンを結合させ、その抗体を用いることで新規合成された蛋白が同

定できる(SUnSET 法)。これを免疫細胞化学法に応用し、成長円錐マーカーとの 2 重染色によって成長円錐での局所蛋白合成を示すことに成功した。

また局所翻訳のトリガーとしては後根神経性神経細胞では NGF, BDNF が、海馬神経細胞では BDNF, Wnt3 を同定した。特に Wnt3a に関しては eIF2Bε のリン酸化の低下を介したものであることを明らかにした。

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) Kitaura H, Oishi M, Takei N, Fu YJ, Hiraishi T, Fukuda M, Takahashi H, Shibuki K, Fujii Y, and Kakita A (2012) Interactions between subcortical heterotopia and overlying hippocampus mediated by NMDA receptors in human brain slices. *Epilepsia* Jul;53(7): e127-131.
- 2) Kakiya N, Saito T, Nilsson P, Matsuba Y, Tsubuki S, Takei N, Nawa H, Saido TC. (2012) Cell-surface expression of the major A β degrading enzyme, neprilysin, depends on phosphorylation by MEK and dephosphorylation by protein phosphatase 1a. *J Biol Chem*. 287(35):29362-72
- 3) Iwakura Y, Wang R, Abe, Y., Piao, Y., Shishido, Y., Higashiyama, S., Takei N, and Nawa, H. (2011) Dopamine D1-like Receptor-dependent Ectodomain Shedding and Release of Epidermal Growth Factor in Developing Striatal Neurons: (Part 2) Target-Derived Neurotrophic Signaling. *J Neurochem* 118:57-68
- 4) Iwakura, Y., Zheng, Y., Abe, Y., Piao, Y., Yokomaku, D., Wang, R., Takei N, and Nawa, H. (2011) Qualitative and Quantitative Re-evaluation of Epidermal Growth Factor-ErbB1 Action on Developing Midbrain Dopamine Neurons in vivo and in vitro; (Part 1) Target-Derived Neurotrophic Signaling. *J Neurochem* 118:45-56
- 5) Wang R, Iwakura Y, Araki K, Sotoyama H, Takei N and Nawa H (2011) Protein Production of an Active Neurotrophic Factor, Neuregulin-1; Qualitative Comparison of In Vitro Translation Systems. *Neurosci Lett*. 497:90-93

- 6) Qi, S., Mizuno, M., Yonezawa, K., Nawa, H. and **Takei, N.** (2010) Activation of mammalian target of rapamycin signaling in spatial learning. *Neurosci Res.* 68 88-93 (CA)
- 7) Reijonen, S., Kukkonen, J.P., Kairisalo, M., **Takei, N.**, Lindholm, D. and Korhonen, L. (2010) Downregulation of NF- κ B signaling by N-terminal mutant huntingtin proteins induces oxidative stress and cell death. *Cell Mol. Life Sci.* 67:1929-194

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) **武井延之**、那波宏之「神経細胞における翻訳調節:活動依存性と空間的特性」
84回生化学会シンポジウム「翻訳制御の多様性」京都(オーガナイザー):2011.9.22

〔図書〕(計 4 件)

- 1)神経細胞特異的翻訳調節機構(**武井延之監修**)細胞工学312012.5

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

武井 延之 (TAKEI, NOBUYUKI)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 70221372

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

難波 寿明 (NAMBA HISAAKI)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 90332650