

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 7 年 6 月 1 1 日現在

機関番号： 1 2 6 0 2

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2012 ~ 2014

課題番号： 2 4 5 9 0 2 4 8

研究課題名 (和文) 成長円錐の動態の制御機構解析 - 原子間力顕微鏡によるアプローチ -

研究課題名 (英文) Analysis of the dynamics of the growth cones by atomic force microscopy

研究代表者

星 治 (Hoshi, Osamu)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号： 1 0 3 0 3 1 2 4

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要 (和文) : ラット由来の脊髄後根神経節細胞を培養し、脳由来神経栄養因子などで刺激した後、細胞を固定し、細胞内における変化を免疫染色法により解明するとともに、原子間力顕微鏡による微細構造解析を行った。神経節細胞内のアクチンフィラメントやリボソーム蛋白などの分布と細胞表面の微細構造とは密接な関連があることが明らかとなった。また、脳由来神経栄養因子の刺激により、成長円錐では局所的な蛋白合成が増強していることが確認された。

研究成果の概要 (英文) : The presence of actin filaments and ribosomal proteins in the growth cones of rat dorsal root ganglion (DRG) neurons and the structure of growth cones were analyzed using atomic force microscopy (AFM). AFM images revealed that high regions of DRG tended to be rich in actin filaments and ribosomal proteins P0/P1/P2 and S6 compared with low regions of DRG. BDNF (brain-derived neurotrophic factor) decreased the phosphorylation of eEF2 (eukaryotic elongation factor2), indicating enhancement of translation in growth cones. Indeed, BDNF increased puromycin signaling, which suggests increased protein synthesis in growth cones.

研究分野： 解剖学一般 (含組織学)

キーワード： 成長円錐 原子間力顕微鏡 脳由来神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

本研究課題の研究代表者は、これまで原子間力顕微鏡によるヒト染色体やコラーゲンなどの生物試料の構造・機能解析の研究を行ってきた。原子間力原子間力顕微鏡はその観察原理に光を用いないで、探針と試料表面間に働く力が一定となるように試料台を動かしながら、試料表面の凹凸を画像化する。試料の表面構造だけでなく、試料の硬さなどの物性を測定する装置としても働くことができる。この顕微鏡は工学系・材料系の分野では分子や原子の可視化や操作の研究において盛んに利用されているが、医生物分野での応用はまだ黎明期にあり、本研究課題の代表者は先端的な研究の報告をしてきた。特に、生体構造物の液中観察においては、生きた細胞や未固定染色体を液中で可視化・動的観察を可能にし、電子顕微鏡と同等の分解能を得ることに成功している。本研究ではこれまで開発した液中環境における原子間力顕微鏡による生物試料の先端的な観察技術を、神経細胞の成長円錐に応用することで、新たな研究の展開を志向するものである。

2. 研究の目的

伸長中の神経細胞の神経突起の先端に存在する成長円錐は、手のひらをひろげたような扇型をしており、神経発生や神経再生の過程で重要な機能を有している。成長円錐が標的細胞を見出してシナプスを形成する過程は軸索ガイダンスと呼ばれ、神経回路網の形成において大切な現象である。近年、成長円錐に存在する分子、成長円錐が感受するガイダンス因子、誘発因子、反発因子などが明らかにされ、成長円錐の運動に関わるさまざまな分子のはたらきが解明されてきた。

成長円錐は神経発生や神経再生の過程において活発に運動している。それには、糸状仮足の進展運動、葉状仮足の遠位先端部

の進展運動、成長円錐の全体の伸長、神経突起の伸長、と大きく4段階の過程からなっている。これらはガイダンス因子などのシグナルにより活性化される蛋白質や細胞骨格の再構成も関わり進行していく。糸状仮足はガイダンス因子に対するセンサーとしてはたらき、細胞の遊走方向を決定する役割を担っている。葉状仮足は遊走のための足場を構築する役割を果たしている。糸状仮足では直線状に束となったアクチンフィラメント、葉状仮足では網目状のアクチンフィラメントが形成されると考えられているが、アクチンフィラメントがどのように細胞膜の形態変化を制御しているかは、不明なところが多い。

本研究課題では、原子間力顕微鏡により成長円錐の微細構造を解析するとともに、成長円錐の動態と細胞内部に分布しているアクチンなどの細胞骨格との関わりを解明する。さらに、高速液中原子力顕微鏡により成長円錐をイメージングする方法を検討し、生きた状態で成長円錐を観察する方法を検討する。

3. 研究の方法

ラット胎児より脊髄後根神経節細胞を採取し、トリプシン、DNase 処理後、poly-L-lysine コートディッシュ上で、8-(4-chlorophenylthio)adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (CPT-cAMP)を含む培地で48時間培養した。その後、CPT-cAMPを含まない培地に戻し1時間培養をした後、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor; BDNF) を含む培地で30分培養し、さらに一部の培地にはピューロマイシンも同時に添加した。4%パラホルムアルデヒドで固定後、抗 S6 ribosomal protein 抗体、抗 ribosomal P0/P1/P2 抗体、抗ピューロマイシン抗体による免疫染色を行った。Alexa488 phalloidin でアクチンフィラメントの標識も行った。蛍光顕微鏡による観察を

行った後、一部は液中原子間力顕微鏡により観察した。

また、脊髄後根神経節細胞の高速原子間力顕微鏡による観察も試みた。

4．研究成果

神経節細胞を培養する培地に cAMP を加えることで軸索の伸長と成長円錐の形成の促進が認められた。

神経節細胞の同一標本を蛍光顕微鏡と原子間力顕微鏡により観察することで、成長円錐でアクチンフィラメントが多く分布する領域では、細胞膜が隆起しその高さが高い傾向にあることが明らかとなった。また、抗 S6 ribosomal protein 抗体と抗 ribosomal P0/P1/P2 抗体による免疫染色の結果、成長円錐ではリボゾーム蛋白が共局在していると考えられた。そして、それらの局在部位は成長円錐の高さと関連していることが原子間力顕微鏡による解析で明らかとなった。すなわち、成長円錐が Z 方向に高く伸びている部分にはより多くのリボゾーム蛋白の存在が認められた。

抗ピューロマイシン抗体や抗 P-eEF2 (Phosphorylated eukaryotic elongation factor 2) 抗体による免疫染色を行ったところ、脳由来神経栄養因子で刺激した成長円錐においては、刺激しなかったものと比較して抗ピューロマイシン抗体の陽性部位のシグナルは増強しており、ピューロマイシンのついた蛋白の合成が増強されていた。また抗 P-eEF2 抗体の陽性部位のシグナルは、刺激した成長円錐では低下していた。それらの結果は脳由来神経栄養因子の刺激に应答して、成長円錐では蛋白の合成が増強されていることを示唆する。

脊髄後根神経節細胞の液中環境における高速原子間力顕微鏡観察については、さまざまな走査条件を検討した結果、パネ定数 0.3N/m のカンチレバー（探針）を用いて、液中での Q 値を 20 - 30 とし、タッピングモー

ドによって明瞭なイメージング像を取得することに成功した。走査速度をイメージング像を損なわない範囲で上昇させ、16 秒/フレーム（画像解像度 256 × 256）の画像取得時間で、成長円錐の液中原子間力顕微鏡像を得ることができた。固定標本ではあるもの高速原子間力顕微鏡による明瞭なイメージング像の取得のための走査条件が明らかとなったことから、今後生きた細胞での観察につながる足がかりとなる基礎データを得ることができた。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

1) Osamu Hoshi, Yuichiro Cho, Nobuyuki Takei : Translational machinery and protein synthesis in growth cones of rat dorsal root ganglion neurons; atomic force microscopic and fluorescence microscopic analysis. 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists. 2015.3.21-23. Kobe, Hyogo, Japan.

2) Osamu Hoshi, Yuichiro Cho, Nobuyuki Takei : Atomic force microscopic imaging of growth cones from rat dorsal root ganglion neurons. 6th Conference of the international society for neurochemistry. 2014.9.20-22. Tokyo, Japan.

3) Osamu Hoshi, Yuichiro Cho, Nobuyuki Takei : Structure of growth cones of rat dorsal root ganglion neurons observed by atomic force microscopy. XX International Symposium on Morphological Science. 2013.9.10-13. Niigata, Japan.

4) 星 治、長 雄一郎、武井延之：ラット
脊髄後根神経節細胞の成長円錐の神経栄養
因子による構造変化. 第 118 回日本解剖学会
総会・全国学術集会. 2013.3.28-30. 香川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星 治 (Hoshi Osamu)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・教授

研究者番号：10303124

(2) 研究分担者

武井 延之 (Takei Nobuyuki)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：70221372

長 雄一郎 (Cho Yuichiro)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・助教

研究者番号：90334432