

機関番号：13802

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791028

研究課題名 (和文)

神経再生過程におけるアクチン細胞骨格形成-CLP36 と palladin の結合-

研究課題名 (英文)

Role of Actin associated cell skeletal protein in peripheral nerve regeneration

- CLP36 interaction with palladin-

研究代表者

長谷川 智彦 (HASEGAWA TOMOHIKO)

浜松医科大学・整形外科・助教

研究者番号：50402368

研究成果の概要 (和文)：

α-アクチン関連蛋白の一つであり、LIM ドメインを持つエニグマファミリーに属する CLP36 の神経再生での役割を調査するため、Yeast two hybrid 法を用いて、palladin との結合を新規に同定していた。今回、palladin との結合部位、実際の培養後根神経節細胞での結合、神経突起での共存を証明した。また、坐骨神経損傷時の後根神経節内では CLP36 の mRNA が palladin に比べ著明に増加する事が分かった。

研究成果の概要 (英文)：

CLP36, a member of the alpha-actinin-associated LIM protein (ALP)/enigma protein family, plays a role in neurite outgrowth in the peripheral nervous system. we had performed yeast two-hybrid screening, identified palladin as a CLP36-binding protein. A coimmunoprecipitation study showed that CLP36 and palladin formed a complex in the dorsal root ganglion (DRG). In addition, CLP36 and palladin were colocalized in the neurites and cell bodies of primary DRG neurons. Furthermore, sciatic nerve transection increased the expression of both CLP36 and palladin mRNAs in DRG neurons, with the increase in CLP36 mRNA being more prominent. This implies that CLP36 has a more specific role in nerve regeneration than palladin. Our results suggest that CLP36 may interact with palladin to influence neurite outgrowth

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学 (7305)

キーワード：

CLP36, Palladin, Yeast two hybrid, actin

PDZ domain, LIM domain

1. 研究開始当初の背景  
 神経損傷後のアクチン細胞骨格関連蛋白の働きを検討するため、マウス E18 library での Yeast two-hybrid screening を行い、ア

クチン細胞骨格関連蛋白の CLP36 に対する新規の結合蛋白 palladin を同定。ラット坐骨神経切断モデルを作製し、坐骨神経切断後にその支配領域の後根神経節を採取し、CLP36、

Palladin の oligo probe を用いた in situ hybridization にて、mRNA 発現の上昇を確認していた。

## 2. 研究の目的

CLP36 とその結合蛋白に焦点をあて、両者の結合が神経再生において細胞骨格形成で果たす役割を検討する。具体的には、両者の末梢神経障害後の動態、培養細胞での細胞内動態を知る。また、両蛋白および結合部位の欠損や、結合の障害が末梢神経再生に与える影響を検討する。

## 3. 研究の方法

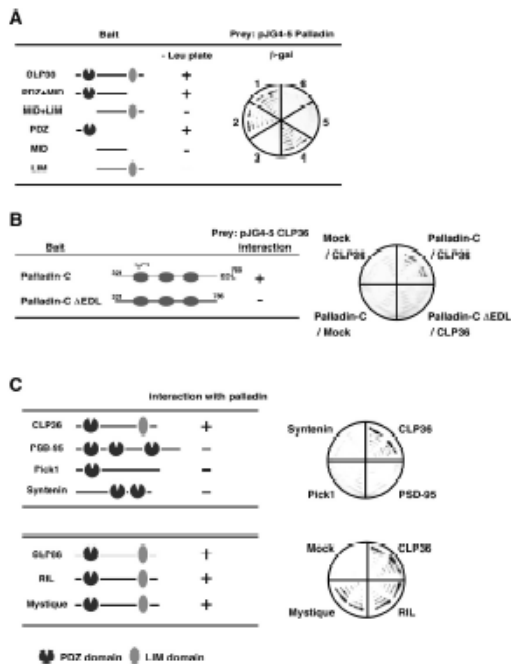
(1) CLP36 と palladin 両蛋白の結合(部位)の再確認。準備段階で行った yeast two-hybrid の結合評価以外に、新たに購入した Palladin 抗体と CLP36 蛋白を用いた免疫沈降にて、CLP36 と palladin の結合の再確認を行った。また、CLP36 の属する enigma family 蛋白と palladin の結合について、免疫沈降を用いて評価した。

(2) 坐骨神経損傷後のラット脊髄、後根神経節内での mRNA 変化について半定量的 realtime PCR を用いて評価した。

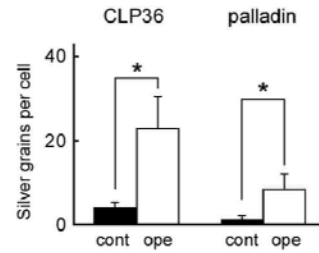
(3) 培養神経細胞、線維芽細胞に CLP36、palladin を発現させ、神経突起や、細胞での局在を評価した。

## 4. 研究成果

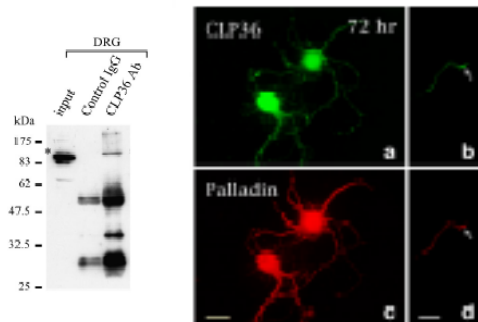
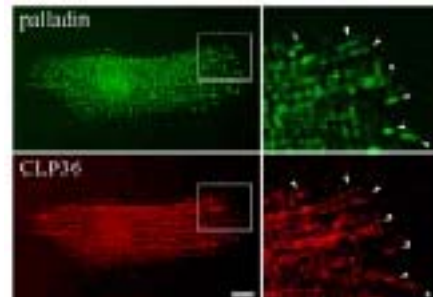
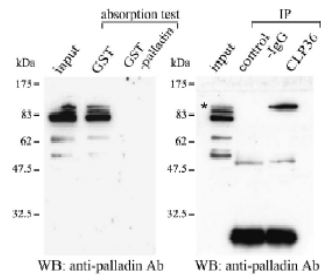
(1) CLP36 と palladin の結合部位は Palladin の C 末端 CLP36 の PDSdomain である事が判明した。CLP36 以外にも RIL, Mystique 等の Enigma family が palladin と結合することが分かった。



(2) CLP36 は palladin に比較しラット神経損傷後の後根神経節で著明に増加した。



(3) fibroblast における CLP36 と palladin の免疫染色を行い、両者が細胞骨格を形成する actin filament 上に存在する事を確認した。神経細胞での局在確認として、ラットより後根神経節細胞の抽出、初代培養を行い、この神経節細胞を用いて、神経栄養因子投与下での伸長神経突起先端での同抗体での免疫染色による免疫組織学的検討により、実際に伸長していく神経突起先端において両者の局在が認められる事を確認した。



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 1 件)

Hasegawa T, Ohno K\*, Funahashi S, Miyazaki K, Nagano A, Sato K: CLP36

interacts with palladin in dorsal root ganglion neurons. Neurosci Lett 476 (2): 53-7, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 智彦 (HASEGAWA TOMOHIKO)

浜松医科大学・整形外科・助教

研究者番号: 50402368

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

大野浩司 ( OHNO KOJI )

浜松医科大学・解剖学・准教授

研究者番号: 90263277

(4) 研究協力者

船橋 伸司 (FUNAHASHI SHINJI)

研究者番号: 10402364