

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 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700329

研究課題名（和文） 成長円錐における神経成長関連蛋白質群の機能

研究課題名（英文） The role of neuronal growth-associated proteins in the growth cone

研究代表者

野住 素広 (NOZUMI MOTOHIRO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00420323

研究成果の概要（和文）：ラット成長円錐のプロテオーム解析から同定した 17 種類の軸索伸長に必要な神経成長関連蛋白質（nGAPs）の役割を探るため、PC12 細胞への NGF 添加によって誘導される神経突起と nGAPs の関係を調べた。その結果、NGF 誘導性の成長円錐にも全ての nGAPs が濃縮されており、RNAi ノックダウン解析により、NGF によって誘導される神経突起伸長には nGAPs が必要であることが明らかになった。さらに一部の nGAPs の発現量に比例して成長円錐のアクチン繊維の量が増減することが分かった。これらの結果は nGAPs がアクチン細胞骨格の再編を介して成長円錐形態を制御することで、軸索伸長を調節していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Continuous rearrangement of cytoskeletons and recruitment of transport vesicles to plasma membrane are thought to be essential to the growth cone motility, however, it is unclear how the proteins are directly involved in processes of axonal growth. We have recently reported of identifying 17 proteins as the functional marker proteins in the mammalian growth cone, as neuronal growth-associated proteins (nGAPs). However, it remains to be determined whether these marker proteins are widely involved in neuritogenesis in various neuronal cell types. We showed that all of the nGAPs were concentrated in the growth cone of PC12 cell. RNAi knockdown of each nGAPs also inhibited neurite elongation induced by NGF. These results indicate that nGAPs are involved in NGF-induced neurite outgrowth, and that nGAPs are very useful as generalized marker of the growth cone. To investigate the roles of nGAPs for the growth cone behavior further, we analyzed the changes of morphology of the growth cone and cytoskeletal distribution there using RNAi. We found that knockdown of some nGAPs caused significant reduction of the growth cone area and the amount of F-actin there. These results suggest that these nGAPs regulate growth cone morphology through rearrangement of F-actin and thereby control the axon outgrowth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

1. 研究開始当初の背景

成長円錐はガイダンス分子に応じて軸索の伸長経路を先導する運動性に富んだ構造体で、神経回路網の形成に欠かすことのできない役割を果たす。成長円錐は発達期だけでなく、可塑的なシナプス形成や軸索の再生・変性にも関わっており、成熟脳でも重要な機能をもつ。したがって成長円錐の分子機構を明らかにすることは、神経科学の大きな課題の1つである。

我々は成長円錐の蛋白質を網羅的に同定する目的で、ラット新生仔前脳から成長円錐を分画し、プロテオミクス解析を行った。同定した 945 種の蛋白質の中から約 150 種に対して免疫染色を行い、そのうち 100 程度程度の蛋白質が、成長円錐のマーカー分子である GAP-43 と同様に成長円錐に濃縮していることを明らかにした。成長円錐に濃縮した 100 種類の遺伝子に対する RNAi 解析の結果、軸索形成に関係する 18 種の神経成長関連蛋白質 (neuronal growth-associated proteins; nGAPs) を同定した (Nozumi ら, 2009; Nozumi ら, 2008)。18 種の nGAPs は GAP-43 同様に成長円錐機能に非常に重要であると考えられるが、が示唆されるが、その大部分がこれまでに神経成長に関する報告がない。既知の遺伝子情報および成長円錐での分布に基づいて、nGAPs に細胞骨格制御、小胞輸送、脂肪酸合成に関わる蛋白質が含まれていることが示唆された。

2. 研究の目的

申請者は、プロテオミクスで成長円錐に濃縮する 18 種類の蛋白質が軸索形成に不可欠であることを明らかにし、それらを神経成長関連蛋白質群 (neuronal growth-associated proteins; nGAPs) とした。nGAPs は細胞骨格制御、小胞輸送、脂肪酸合成に関わる蛋白質であることが予想される。本研究では発生工学および分子細胞生物学的手法を組み合わせ、成長円錐における nGAPs の機能解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および免疫化学染色

PC12 細胞は 10% 牛胎児血清を含む DMEM 培地を用いて 5%CO₂ を含む 37°C の培養器で培養した。培地中に NGF を添加 (50ng/mL) するこ

とで神経突起伸長を誘導した。ポリ L リジンでコートしたカバーガラス上に細胞を培養し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。PBS で洗浄したのち、0.1% Triton-X100 で透過処理した。PBS 洗浄の後、1%牛血清アルブミンでブロッキング処理して、1次抗体を反応させた。抗 α -チューブリン抗体または蛍光ファロイジンとの共染色により、目的とする蛋白質の2重蛍光染色像を得た。顕微鏡画像の取得は蛍光顕微鏡 Zeiss Axiovert 200 を用いた。

(2) 遺伝子導入および RNAi

PC12 細胞への発現プラスミドまたは siRNA の導入は Lipofectamine 2000 またはエレクトロポレーション装置 CUY21 Pro-Vitro を用いて行った。ポリ L リジンコートのカバーガラスで 24 時間培養ののち、NGF を添加して 24 時間に細胞を固定もしくは回収して免疫化学染色またはウェスタンブロット解析に用いた。

4. 研究成果

申請者らはラット胎仔脳の成長円錐を対象にプロテオーム解析を行い、945 種の蛋白質を同定した。明らかになった成長円錐蛋白質に対し、系統的免疫染色および RNAi によるスクリーニングで軸索伸長に関与する成長円錐蛋白質を 17 種類同定した。これを神経成長関連蛋白質 (nGAPs) と名付けた。nGAPs は唯一の成長円錐マーカーであった GAP43 と同程度もしくはそれ以上に成長円錐に濃縮されており、成長円錐の新しい機能的マーカーの候補になり得ると考えた。しかし、nGAPs が本当に神経組織、細胞種で共通して発現するかどうかは明らかになっていなかった。

本研究では PC12 細胞を用いて、NGF 刺激で誘導される成長円錐における nGAPs の分布および神経突起形成における nGAPs の機能解析を行った。PC12 細胞を nGAPs または GAP43 に対する抗体で免疫染色を行ったところ、17 種全ての nGAPs が GAP43 と同様に成長円錐に強く分布していた (図 1)。

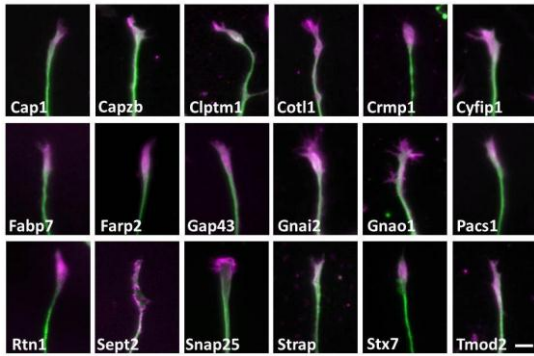


図1 PC12細胞の成長円錐に濃縮するnGAPs

さらに nGAPs に対する siRNA を PC12 細胞に導入し、NGF 刺激による神経突起誘導を行い、突起の長さを測定した結果、有意に神経突起の伸長を阻害することが nGAPs 全てで確認できた (図2)。

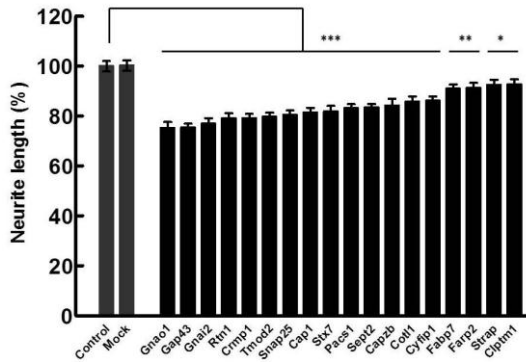


図2 NGF による神経突起伸長は nGAPs に対する RNAi ノックダウンにより阻害される

これらの結果は、nGAPs が PC12 細胞における NGF 誘導性の神経突起形成に関与することを示すものであり、nGAPs が一般的な成長円錐の機能的マーカーとして有用であることを強く示唆している。nGAPs の成長円錐における役割を明らかにするため、nGAPs の RNAi ノックダウンによる成長円錐のアクチン繊維の影響を調べた。その結果、一部の nGAPs のノックダウンで成長円錐のアクチン繊維が大幅に減少することが明らかになった。この結果は、NGF が誘導する成長円錐のアクチン細胞骨格再編のシグナル伝達に nGAPs が関与することを示唆している。

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2件)

①Lu J, Nozumi M, Takeuchi K, Abe H, Igarashi M. Expression and function of neuronal growth-associated proteins (nGAPs) in PC12 cells. *Neurosci Res.* 2011; Vol. 70: pp. 85-90. (査読有)

②Kobayashi T, Terajima K, Nozumi M, Igarashi M, Akazawa K. A stochastic model of neuronal growth cone guidance regulated by multiple sensors. *J Theor Biol.* 2010; Vol. 266: pp. 712-722. (査読有)

[学会発表] (計6件)

① Nozumi M, Kato K, Igarashi M. Two different ways of vesicle transport are mediated by actin cytoskeleton and microtubules in the growth cone. 第54回神経化学学会大会 2011年9月27日 瑠璃光 (石川県加賀市)

②野住素広、呂嘉、武内恒成、五十嵐道弘 成長円錐の形態を制御する神経成長関連蛋白質 (nGAPs) 第84回日本生化学会大会 2011年9月23日 京都国際会議場 (京都府京都市)

③Nozumi M, Lu J, Takeuchi K, Igarashi M. Neuronal growth-associated proteins (nGAPs) regulate growth cone morphology. IBRO 2011 2011年7月16日 バッソ要塞 (イタリア共和国・フィレンツェ)

④Nozumi M, Lu J, Takeuchi K, Igarashi M. Neuronal Growth-Associated Proteins (nGAPs) Regulate the Growth Cone Morphology. 第50回米国細胞生物学会 2010年12月14日 フィラデルフィアコンベンションセンター (アメリカ合衆国・フィラデルフィア)

⑤Lu J, Nozumi M, Takeuchi K, Igarashi M. Neuronal growth-associated proteins (nGAPs) regulate the growth cone morphology through rearrangement of F-actin. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010年12月9日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

⑥野住素広、呂嘉、武内恒成、五十嵐道弘 成長円錐プロテオームに基づいた神経成長関連蛋白質 (nGAPs) の同定 平成22年度日本生

化学会関東支部例会・第 51 回新潟生化学懇
話会合同研究集会 2010 年 5 月 29 日 長岡
技術科学大学（新潟県長岡市）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：抗 GAP43 抗体

発明者：五十嵐道弘、武内恒成、野住素広

権利者：国立大学法人新潟大学

種類：特願

番号：2011-230577

出願年月日：2011 年 10 月 20 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野住 素広 (NOZUMI MOTOHIRO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00420323

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし