

研究プロジェクト名：

成長円錐のプロテオミクスから脳構築と損傷修復の過程を探る

研究プロジェクト構成員（職・氏名）

五十嵐 道弘 医歯学系・教授（代表者）

横山 峯介 脳研究所・教授

柴田 実 医歯学総合病院・教授

佐藤 俊哉 脳研究所・助教（平成 19 年 1 月よりメンバー）

渡部 通寿 医歯学系・助教

野住 素広 医歯学系・助教

渡邊 裕美 医歯学系・科研費研究員

大湖 健太郎 大学院医歯学総合研究科・博士課程学生（平成 20 年 3 月修了）

（榊原 順 医歯学系・助手；平成 18 年 12 月退職のため、佐藤俊哉に交代）

学外構成員

加藤 薫 独立行政法人産業技術総合研究所（つくば）・主任研究員

田岡 万悟 首都大学東京・大学院理学研究科・助教

研究成果概要

① プロジェクトにおいて目標としたもの

本超域研究機構の第一期の目的は、神経回路の構築および修復に必須の構造体である成長円錐のプロテオミクスで見出した、神経回路の形成とリモデリングに関与する多数の蛋白質群の役割を、発生工学で作成したマウスや、リアルタイムの各分子の挙動解析を用いて明らかにし、神経回路の構築・修復の分子情報を飛躍的に広げることであった。またこれらの研究を通じて、網羅的に神経系分子群の機能を研究する技術を確立することがもう1つの目標であった。これらの諸点は、後述の通り、基本的には概ね達成した。

② 目標に到達するために選択した方法・手段

主たる研究手段として、蛋白質を網羅的に同定するプロテオミクスの手法をまず用いた。またこの系に空間的な情報を導入するため、新たに同定された分子に対して多数の新規抗体を作成し、それらに対する系統的な免疫染色を施した。これによって、空間的に成長円錐に濃縮されている分子を定量的に、かつ効率的に見出すことに成功した。さらに RNAi (RNA 干渉) を多数の遺伝子に適用する新手法を、EGFP トランスジェニックラットを使用して開発した。神経成長における分子動態のリアルタイム解析は種々のバイオイメージングを駆使して行われた。またシナプス関連分子の解析、軸索再生関連のモデルマウスの作成に成功した。これらは遺伝子改変動物であり、発生工学の手法を用いている。さらに遺伝子改変マウスの行動実験では、同週齢の個体を多数必要とするが、本学独自の技術ともいえる凍結保存精子からの作出を、メンバーの横山、佐藤の全面的協力で行った。

③ これまでの研究で得られた成果

I. 成長円錐のプロテオミクス解析

プロテオミクスの結果、945 種類の蛋白質を同定したが、系統的免疫染色で特に成長円錐に濃縮された 98 種類に着目した。さらに成長円錐マーカー分子候補の系統的 RNAi 法を確立した結果、20 種類の分子が成長円錐の神経成長機能を担うことを完全に証明できた。系統的 RNAi による新しい方法は、論文として発表済みである。

II. 成長円錐内の分子挙動の解析

神経系の株細胞である NG108 細胞をモデル系として遺伝子導入法を確立し、これに GFP 融合蛋白質のリアルタイム解析を行った。その結果、従来は成長円錐の C 領域のみに存在すると思われた小胞蛋白質が、一部は P 領域にも移動することを証明した。

III. 成長円錐の分子間相互作用の研究

また成長円錐における分子間相互作用の研究も、昨年からは開始した M6a とその新奇結合蛋白質 X の結合部位の同定に成功したほか、さらに同蛋白質 X が 2 種類の低分子量 GTP 結合蛋白質によって機能的に調節されることをほぼ明らかにした。

IV. シナプス伝達の解析

Syntaxin-1A に関するノックインマウスを完成し、生理学実験を東京大学・真鍋グループ、行動実験を京都大学・宮川グループと、シナプス小胞の分布を北海道大学・渡辺

グループと共同で解析した。この結果、シナプスの伝達や構造、行動の無動時間延長など、ヒトの高次機能の異常のモデルと考えられる結果が得られた。

V. 軸索再生モデル動物の作成と軸索再生阻害因子の情報伝達系の研究

軸索再生のモデル動物として期待されるコンドロイチン硫酸合成酵素のうち、GalNAcT-1 ノックアウトマウスの作成に成功し、脊髄損傷の定量化実験を開始した。また末梢神経系の再生時及び中枢神経系の機能的再生に関与する分子群について、成果 I. の新たな神経成長分子群から候補探索を開始し、末梢神経再生の際に、それらの 1 つが発現上昇していることを確認した。

VI. 細胞内への組換え蛋白質導入

細胞への蛋白質導入(protein transduction; PTD)は組換え蛋白質に形質膜を透過するタグを結合させて直接、蛋白質を細胞内に導入する手段であり、一般的な遺伝子導入(transfection)に比較すると時間的に優れているが、蛋白質を本来の部位に導入することが難しい。この欠点を解消するために、通常の PTD タグ R11 に形質膜蛋白質 syntaxin-3 の H3 domain 由来の 50 アミノ酸残基を結合させることで、形質膜に導入蛋白質が局在化することがわかった。この方法は蛋白質を可溶性に保ったまま、形質膜に局在化できるため、効率も高い理想的方法である。

④ 更新する期間(3年間)で目標とする事項およびその研究計画

第一期では数多くの課題を達成したが、予想よりもはるかに多くの異常が観察された遺伝子変異マウスの解析や、軸索再生に寄与していることが証明された、3年前の予想よりかなり多数の分子の役割解析が残された。3年間でその点をさらに深く追求する。具体的には、1) 成長円錐の機能的分子マーカー20種類の蛋白質間相互作用に基づき、神経成長に貢献する機構の証明、2) これらの分子の軸索再生能決定に関する寄与の証明、3) シナプス伝達異常の分子メカニズムの解析、4) 軸索再生阻害因子の発現制御、の4つの項目を重点に行い、個々の分子の役割をさらに包括的に理解することで、当初の目標をはるかに超える成果が期待できる。既に解析の基本段階は終了しているものの、データが膨大であるために論文としてはまだ完成していない内容を、今年度から順次、発表していく予定である。

⑤ 研究発表実績(別紙参照) 論文 31 編; 著書 10 冊【共著を含む】; 学会発表 23 件

⑥ 研究成果による知的財産権の出願・取得状況

現状ではまだないが、次期においては考慮中である。

⑦ 新聞等のメディアに掲載された事項(別紙添付)

- 1) Mol Biol Cell 16: 4519-30 [‘05]に関するアメリカ細胞生物学会(ASCB)会報(ASCB Newsletter 2005, No. 10, p. 20)に関する紹介記事