The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Local protein synthesis by BDNF is potentiated in hippocampal neurons exposed to ephrins
Author(s)	宮田, 信吾
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45476
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【116】

氏　　名	宮田信吾（みやたしんご）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　19349　号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Local protein synthesis by BDNF is potentiated in hippocampal neurons exposed to ephrins （ラット海馬の神経細胞におけるBDNFによる局所的翻訳はephrin処理により増強される）
論文審査委員	（主査） 教　授　遠山　正彌 （副査） 教　授　米田　悦啓　　教　授　三木　直正

論文内容の要旨

〔目　　的〕

最近、神経細胞の樹状突起や軸索に特定の mRNA が輸送されることが明らかにされ、神経ネットワークにおける活動依存的情報伝達として、神経細胞の樹状突起における局所的な翻訳機構は非常に重要な役割を担っていると考えられるようになってきた。しかし、これまでにこの局所的翻訳のリアルタイムな可視化という観点から様々な研究が行われてきたものの、未だに時間的・空間的に直接的な関連性を持って局所的翻訳を生細胞から検出するには至っていないのが現状である。真核生物の翻訳開始は少なくとも 11 の開始因子（eukaryotic initiation factor；eIF）によって促進される複雑な反応である。その中でも、ペプチド鎖伸長反応が開始される直前にその相互作用が解消される eIF2βサブユニットと eIF5 に注目し、FRET（Fluorescent Resonance Energy Transfer）法を利用して、これら開始因子の相互作用の変化を生細胞で時間的・空間的にリアルタイムに検出するシステムの構築を目指した。

〔方法ならびに成績〕

まず、分子内の N 端に YFP、C 端に CFP を配置し、その間に eIF2βと eIF5 を配置した融合蛋白質（V2b-5C）、または eIF2βの結合領域を欠失させた変異体を配置した融合蛋白質（VΔN-5C）を発現する probe を作製した。この probe が FRET を起こすかどうか確認するために 293 細胞を用いて、*in vitro* で吸収曲線の変化を観察したところ、蛋白質合成を惹起する血清刺激に応答して CFP/YFP の ratio の上昇が V2b-5C では観察され、VΔN-5C では観察されなかった。さらに V2b-5C では proteinase A 処理および RNaseA 処理により CFP/YFP の ratio の上昇は消失したことから血清刺激に応答した CFP/YFP emission ratio の増加がみられたものと考えられた。さらに NIH-3T3 細胞と COS 細胞を用いた *in vivo* での FRET の観察では、photo-breeching でこの emission ratio の増加が FRET によるものであることを確認した。次に、この ratio の増加と翻訳の開始との関連性を検討するために、蛋白質合成の阻害剤で前処理し、血清刺激による FRET の有無を観察した。翻訳の initiation の過程で作用する tunicamysin、rapamysin の前処理では ratio の増加は見られなかったが、initiation 終了後の ribosome に作用する cycloheximide の前処理では ratio の増加が観察され、V2b-5C が翻訳の initiation の過程に反応していることが確認された。また、免疫沈降法

により、このprobeが他のeIFsと複合体を形成していることも判明した。さらに、ショ糖密度勾配でeIF2βまたはeIF5が含まれる分画にV2b-5CおよびVΔN-5Cが存在することを確認した。以上のことから、生理的に翻訳のinitiationの過程を反映したFRET probeが得られたものと判断した。そこで、ラット海馬の初代培養細胞を用いて、蛋白質合成を惹起することが報告されているbrain derived neurotrophic factor（BDNF）を添加し、樹状突起でのFRETを観察した。この海馬の初代培養では約3週間培養しないと成熟したスパインの形成が見られない。ところが最近になって、細胞の境界形成に関与する細胞表面因子の一つであるEphのリガンドであるephrinを約1週間培養した初代培養細胞に添加すると、成熟したスパインを形成することが見いだされた。特に、EphB2は、成熟した脳のスパインにその発現が集中しており、発達段階での機能ばかりでなく、成熟後のスパインでの機能発現にEphシグナルが関与している可能性が示唆された。また、成熟後のスパインでは、局所的翻訳により刺激情報の伝達が制御される機構の存在が示唆されていることから、Ephシグナルと局所的翻訳の関連性について検討するためephrin B2で処理し、BDNFで蛋白質合成を惹起したところephrin B2処理により、FRETによるratioの増加が未処理時に比べ有意に上昇した。このことから、スパインでの機能発現にBDNFとともにEphシグナルも影響を与えていることが明らかとなった。

〔総　　括〕

神経ネットワークにおける活動依存的情報伝達として、神経細胞の樹状突起における局所的な翻訳機構は非常に重要な役割を担っていると考えられている。この局所的翻訳を時間的・空間的にリアルタイムに検出するシステムを構築することにより、本研究において、BDNFとEphシグナルがともにスパインでの局所的な翻訳機構に影響を与えることを見いだすことができた。

論文審査の結果の要旨

神経ネットワークにおける活動依存的情報伝達として、神経細胞の樹状突起における局所的な翻訳機構は非常に重要な役割を担っていると考えられている。しかし、未だに時間的・空間的に直接的な関連性を持って局所的翻訳をリアルタイムに検出するには至っていないのが現状である。そこで、真核生物の翻訳が開始された直後にその相互作用が解消される因子のひとつであるeIF2βサブユニットとeIF5のそれぞれをYFPおよびCFPと融合させた蛋白質を発現させ、これらの相互作用が変化する、すなわち翻訳が開始する瞬間を、FRET法により検出するシステムを構築した。このシステムにより、ラット海馬の神経細胞の樹状突起においてBDNFおよびephrin-B2処理によるスパイン膨大化に局所的翻訳が重要な役割を果たすことを解明した。

よって、本研究は博士（医学）の学位授与に値するものと認める。