

# 人工神経への流布を目的とした、神経伸長促進タンパクの作製

船 木 智

実施期間：令和4年7月1日～令和5年2月28日

担当教員：船木智

連携機関：東京理科大学 昆俊亮 准教授

## 1. はじめに

### 人工神経への流布試薬の作製について

末梢神経は中枢神経と異なり再生するが、末梢神経損傷後の治療成績は満足できるものではなく、効果的な末梢神経再生方法の開発が求められている。膜タンパクである GFRa1 (GDNF family receptor alpha-1) を損傷したラット末梢神経に局所投与すると、軸索再生促進を介して、末梢神経損傷後の機能再生が促進することを同定した。しかし、臨床応用への問題点として、可溶性ヒトタンパクの作成が未だ確立していない。そこで、今回はこのタンパク作製を目標として行った。

## 2. 方法・結果

膜タンパクである GFRa1 をタンパクとして作製するために、大腸菌を用いたタンパク作製方法で試みた。

最初にタンパク発現用 Vector である Pet21b に GFRa1 遺伝子を組み込み、DH5α で形質転換し、IPTG で誘導をかけ、CBB 染色にてタンパク発現の有無について調べたところ、誘導がかからず、タンパクが発現していないことがわかった。

そこで、GFRa1 は膜に結合する配列を有していることから、膜結合する配列部分、N 末 C 末部分を欠損させて（図 1）再度同様にタンパク発現を行った。DH5α では誘導がかからなかったが、



KRX, Rosetta2 大腸菌を用いて誘導をかけたところ、タンパクの発現が認められた。

さらに誘導がかかった大腸菌をニッケルカラムで精製することができた。

精製過程は、Takara Bio の Kit を用いた。

今回作製した、タンパクに、神経伸長反応効果の有無を、NSC34 細胞 (Mouse Motor Neuron) を用いて行った。

NSC34 細胞を一般培地で 2 日間培養し、-FBS 培地に変換することで、神経伸長反応を促進さ

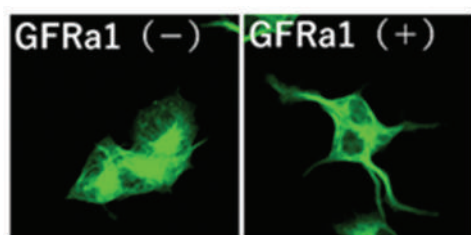


図2：NCAM-GFP発現NSC34神経細胞を用いて、作製したGFRa1-RFPを添加すると神経突起が伸長する。

せる状態下にし、精製タンパクを添加し、37℃24 時間後に4 %PFA で固定し、蛍光顕微鏡で観察を行った。結果神経伸長反応が、タンパクを含まないものと比較して、神経の伸びが確認された（図2）。

### 3. 今後の予定

今回作製したタンパクでの神経伸長反応効果が確認されたので、今後はより具体的な数値化のため神経突起の長さの計測をおこなう。