

130 高頻度チロシンリン酸化MAP1Bの神経発生における役割	伊藤 泰行
---------------------------------	-------

【目的】 我々は準備実験でマウス脳の発生過程におけるリン酸化プロテオミクスを行い、微小管タンパク質 (MAPs) の MAP1B の 4 箇所 (Yxxxx) のチロシンが高頻度にリン酸化されていることを確認した。中でもリン酸化された Yxxxx は胎仔全脳のリン酸化チロシンの中で最も存在量が多く、胎生期 15 日目でピークを迎えていたことから、pYxxxx-MAP1B は脳の発生過程で重要な存在である可能性が高い。チロシンのリン酸化は細胞の発生・増殖・分化といった生命活動の厳密な制御に関わるが、タンパク質配列やリン酸化部位データベースの UniProt、Phospho SitePlus に pYxxxx の機能報告は一切無い。そこで本研究課題では、Yxxxx を中心に pY-MAP1B の神経発生における役割を調べる。

【方法】 本研究では、発生過程の脳で発見した pYxxxx-MAP1B の細胞内における役割を *in vitro* で調べるため、マウス大脳皮質由来の初代培養神経細胞を用いて、下記の検討を行った。

1. pYxxxx-MAP1B に特異的な抗体を外注で作製し、細胞内分布とその経時的な変化を確認した。2. 上記特異抗体とチロシン化チューブリン、アセチル化チューブリン、F-アクチンに対する抗体を用いてこれらの細胞内分布を確認した。また、微小管先端マーカー EB3 (N 末 GFP タグ付) を過剰発現させて、神経成長円錐のフィロポディアにおける pYxxxx-MAP1B とチロシン化チューブリン、GFP-EB3 の分布を確認し、定量解析を行った。3. pYxxxx-MAP1B の細胞内機能を調べるために、リン酸化部位の野生型、擬似非リン酸化 (Tyr→Phe)、擬似リン酸化 (Tyr→Glu) を初代培養神経細胞に過剰発現させ、成長円錐の形態解析を行った。

【結果】 上記の検討 1~3 を行った結果、1. pYxxxx-MAP1B は神経細胞の軸索先端に形成される成長円錐のフィロポディアに濃縮され、日数を経るごとに強く濃縮された。2. pYxxxx-MAP1B は成長円錐内において、フィロポディアに強く染まり、微小管よりもアクチン繊維との共局在を示した。3. リン酸化変異体の過剰発現は成長円錐の形態形成に影響を与え、非リン酸化変異体の過剰発現は、一般的な扇形の成長円錐を減少させ、そのサイズも小さくなった。対照的に、擬似リン酸化の過剰発現は成長円錐のサイズを増大させるが、フィロポディアが長く、ラメリポディアが多い成長円錐が多い、異常な構造を持つ成長円錐が出現した。

MAP1B は脳発生過程で最も高頻度にチロシンリン酸化される

