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

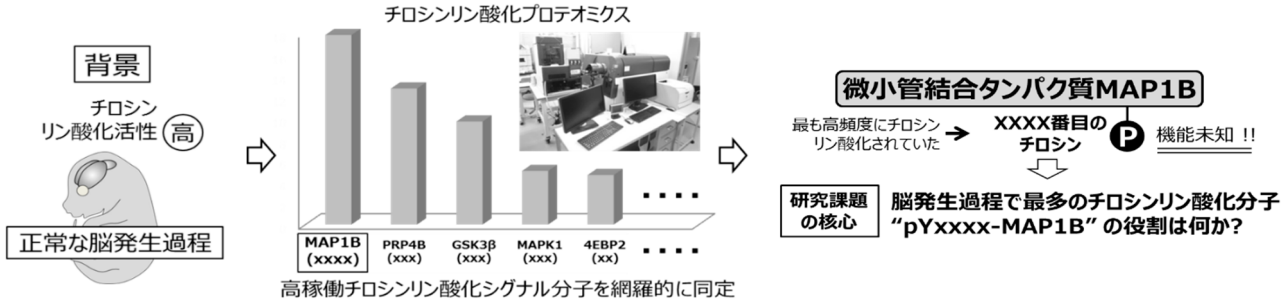
【目的】我々は準備実験でマウス脳の発生過程におけるリン酸化プロテオミクスを行い、微小管タンパク質（MAPs）の MAP1B の 4 箇所のチロシンが高頻度にリン酸化されていることを確認した。中でもリン酸化された Yxxxx は胎仔全脳のリン酸化チロシンの中で最も存在量が多く、胎生期 15 日目でピークを迎えていたことから、pYxxxx-MAP1B は脳の発生過程で重要な存在である可能性が高い。チロシンのリン酸化は細胞の発生･増殖･分化といった生命活動の厳密な制御に関わるが、タンパク質配列やリン酸化部位データベースの UniProt、Phospho SitePlus に pYxxxx の機能報告は一切無い。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、微小管先導端マーカー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導端に形成される成長円錐のフィロポディアに濃縮され、日数を経るごとにより強く濃縮された。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、ラメリポディアが狭い成長円錐が多い、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



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

新潟大学 大学院医歯学総合研究科 分子細胞機能学分野

Key words：成長円錐，リン酸化プロテオミクス，チロシンリン酸化，MAP1B

緒　言

翻訳後修飾の 1 つであるチロシンのリン酸化は細胞の発生、増殖、分化、神経の可塑性といった重要な細胞機能を司り、創薬においては分子標的薬のターゲットにもなることから、臨床医学の観点からもシグナルの分子基盤を明らかにする意義は大きい。特に、発生過程の脳はチロシンリン酸化が最も活性化する場所の 1 つであるが［1］、我々のリン酸化プロテオミクスから 微小管結合タンパク質 MAP1B の xxxx 番目のチロシン が 発生過程の全脳で最も高頻度にチロシンリン酸化されることを突き止めた。MAP1B は MAPs の中で最も初期に発現し始め、発生過程の脳で高発現して正常な神経回路を形成するための必須の分子とされる［2，3］。リン酸化は MAP1B の主要な翻訳後修飾であり、分子機能を調節するメカニズムとして最もよく研究されてきた［4］。しかし、これまでチロシンリン酸化 MAP1B の機能が報告された例は存在しない。そこで本研究では、*in vivo* 生体内機能解析を含めたより詳細な検討を行い細胞内における pYxxxx-MAP1B の役割を明らかにする。

方法および結果

1.　内因性 pYxxxx-MAP1B の細胞内における発現、局在の変化

pYxxxx-MAP1B に対する抗体の作製をユーロフィンジェノミクス株式会社に外注し、リン酸化を特異的に認識するポリクローナル抗体を得た。この抗体を用いて神経細胞内における局在を確認した。細胞はマウス胎仔の大脳由来である初代培養神経細胞を用いた。分散培養開始から 3、24、48、72 時間後の神経細胞を 4%PFA で固定し、蛍光免疫染色を行い観察した。その結果、3 時間後では pYxxxx-MAP1B の分布は神経細胞の細胞質と、細胞から伸張する軸索先導端に形成される成長円錐内のフィロポディアに確認された。その後、時間経過による神経細胞の形態変化に伴い、72 時間後には成長円錐のフィロポディアへのより強い局在を示した（図 1）。

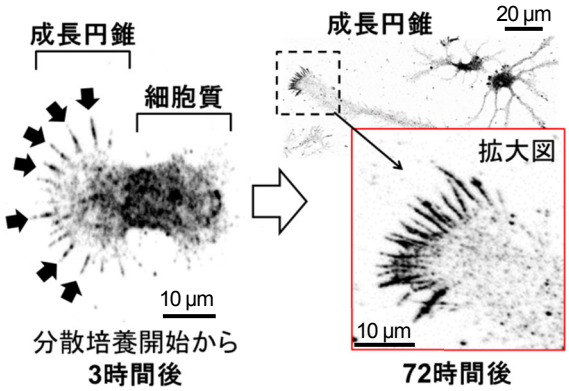


図 1.　pYxxxx-MAP1B は神経成長円錐のフィロポディアに濃縮される
マウス胎仔（E15）大脳皮質由来の初代培養神経細胞を、分散培養開始から 3 時間後と 72 時間後、4%PFA で固定し、pYxxxx-MAP1B に特異的な抗体で蛍光染色を行った。

2. 内因性 pYxxxx-MAP1B とチューブリン、アクチンの細胞内分布

MAP1B は微小管結合タンパク質であり、主な役割は微小管の安定性の調節である。成長円錐の微小管は非常に動的であり、そこへ我々が見出した内因性 pYxxxx-MAP1B が局在していたことから、まずは動的な微小管のマーカー分子であるチロシン化チューブリンと pYxxxx-MAP1B の局在を初代培養神経細胞の免疫蛍光染色で確認した。また pYxxxx-MAP1B の局在が成長円錐内の、特にフィロポディアに偏っていたことから、F-アクチンに特異的に結合するファロイジン蛍光染色を用いて、pYxxx-MAP1B との局在も確認した。その結果 pYxxxx-MAP1B は成長円錐において微小管よりも遠位に分布しており、むしろフィロポディア内の F-actin との強い共局在を示した（図 2）。

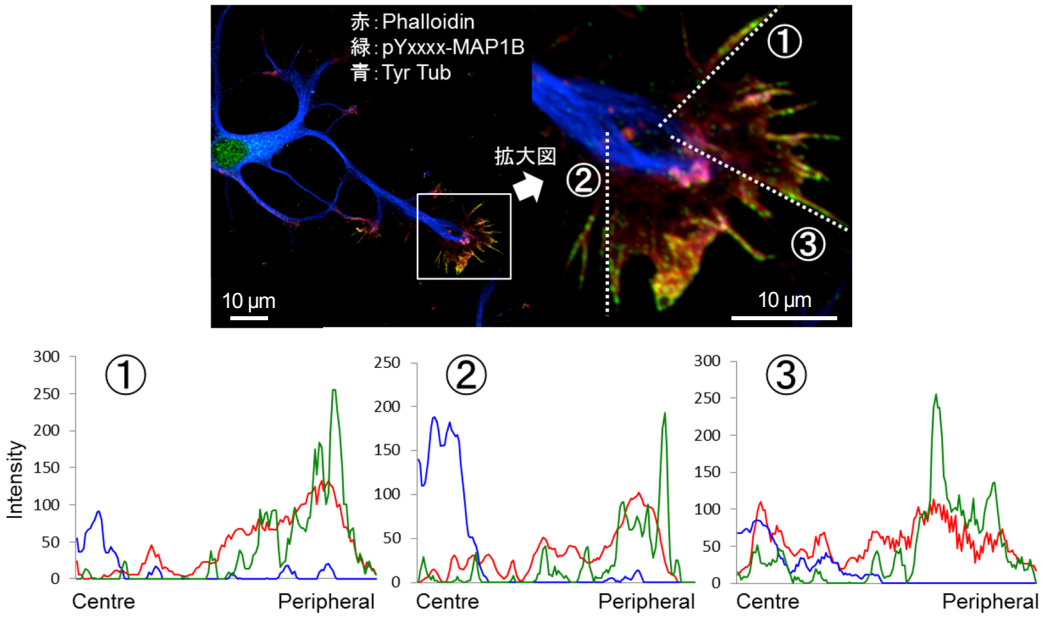


図 2. pYxxxx-MAP1B は神経成長円錐のフィロポディアにおいて F-アクチンと共局在する
マウス胎仔（E15）大脳皮質由来の初代培養神経細胞を、分散培養開始から 24 時間後に 4%PFA で固定し、pYxxxx-MAP1B、F-アクチン、チロシン化チューブリンを蛍光染色した。

また、微小管の伸長端マーカー分子である EB3（N 末 GFP 付）を過剰発現させた神経細胞では、EB3 よりも pYxxxx-MAP1B の方がより遠位に分布しており、pYxxxx-MAP1B が微小管よりもアクチンを相手に何かしらの役割を担っていることをより支持するデータが得られた（図 3）。

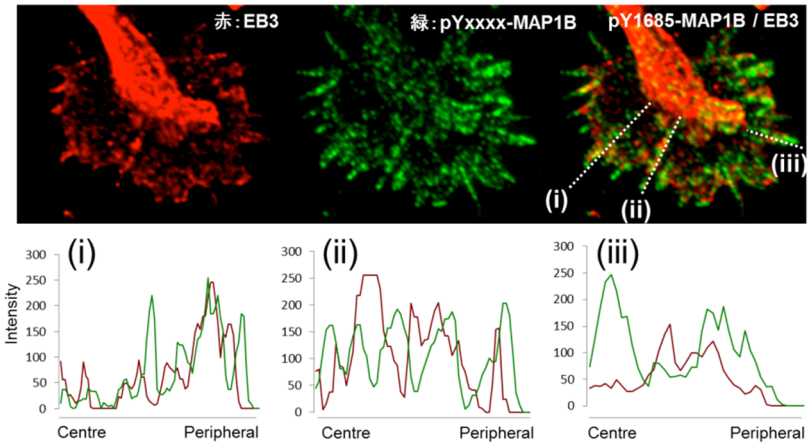


図 3. pYxxxx-MAP1B は神経成長円錐のフィロポディアにおいて、微小管の伸長端よりも遠位まで分布する
マウス胎仔（E15）大脳皮質由来の初代培養神経細胞に対して、N 末 GFP タグ付 EB3 をエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、その後の分散培養開始から 24 時間後、4%PFA で固定し、pYxxxx-MAP1B を蛍光染色した。

3.　pYxxxx-MAP1B のリン酸化変異体の過剰発現による細胞形態解析

ここまでの検証から pYxxxx-MAP1B が神経成長円錐のフィロポディアにおいて、F-アクチンと直接的または間接的に相互作用して何かしらの細胞機能を担っている可能性が推察されるが、では MAP1B は微小管との相互作用以外にアクチンを標的に何をしているのか？この疑問に対して手がかりを得るために、野生型、変異型（非リン酸化型 or 擬似リン酸化型）MAP1B を神経細胞に過剰発現させて成長円錐の形態を確認した。野生型 MAP1B と比べて、Yxxxx-MAP1B の非リン酸化型変異体（Tyr→Phe）を発現させた神経細胞は成長円錐のフィロポディア形成能が低下して成長円錐が細くなること、また擬似リン酸化型変異体（Tyr→Glu）を発現した神経細胞はフィロポディア形成能が促進されるがラメリポディアが著しく減少する異常な成長円錐構造が見られた（図 4）。

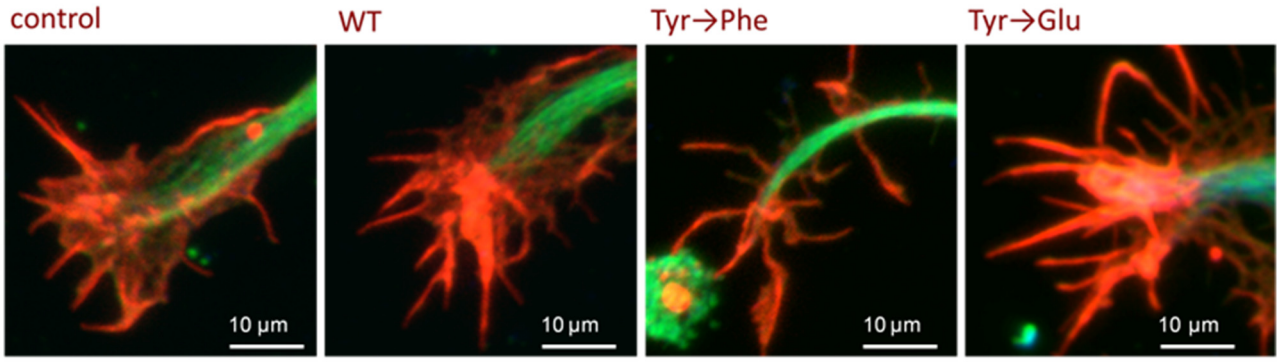


図 4.　MAP1B の xxxx 番目のチロシンのリン酸化変異体は、成長円錐の形態形成に影響を及ぼす。
マウス胎仔（E15）大脳皮質由来の初代培養神経細胞に対して、MAP1B の xxxx 番目のチロシンの野生型（WT）、擬似非リン酸化型（Tyr→Phe）、擬似リン酸化型（Tyr→Glu）をエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し過剰発現させた。その後の分散培養開始から 24 時間後に 4%PFA で固定し、チューブリンと F-アクチンの蛍光染色を行った。

考　察

フィロポディアは分岐していない直鎖状のアクチンが豊富であり、対してラメリポディアは分岐状アクチンに富んでいることが知られている［5］。故に現在までの結果から“pYxxxx-MAP1Bはアクチン繊維の重合や分岐に関わることで成長円錐の形態制御の役割を果たす。”という仮説を立てている。今後はこの仮説の検証も踏まえ、より詳細な細胞内に加え生体内機能解析を行う予定である。本研究課題の遂行により、リン酸化プロテオミクスにより見出した脳発生過程で最も高頻度にチロシンリン酸化されるYxxxx-MAP1Bが、成長円錐の形態制御を担い、正常な脳発生過程を構築する新規制御分子であることを証明できると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科の本多敦子特任助教、五十嵐道弘教授である。本研究課題を遂行するに当たり、ご支援を賜った上原記念生命科学財団には厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Hanley MR. Proto-oncogenes in the nervous system. Neuron. 1988 May 1(3):175-82. PMID: 2856093
2) Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, Vallee RB. MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. J Neurosci. 1989 May 9 (5): 1712-30. PMID: 2470876
3) Benoist M, Palenzuela R, Rozas C, Rojas P, Tortosa E, Morales B, et al. MAP1B-dependent Rac activation is required for AMPA receptor endocytosis during long-term depression. EMBO J. 2013 Aug 32 (16):2287-99. PMID: 23881099 DOI: 10.1038/emboj.2013.166
4) Villarroel-Campos D, Gonzalez-Billault C. The MAP1B case: an old MAP that is new again. Dev Neurobiol. 2014 Oct 74 (10):953-71. PMID: 24700609 DOI: 10.1002/dneu.22178
5) Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, et al. J Cell Biol. 2003 Feb 160 (3):409-21. PMID: 12566431 DOI: 10.1083/jcb.200210174