

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15897

研究課題名(和文) 高頻度チロシンリン酸化MAP1Bによる神経成長円錐のアクチン骨格制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of the actin dynamics by high-frequency tyrosine phosphorylation of MAP1B in the neuronal growth cone.

研究代表者

伊藤 泰行 (Ito, Yasuyuki)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70710573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳発生過程は翻訳後修飾の1つであるチロシンリン酸化が最も活性化される場面の1つであり、申請者らは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Y1685が高頻度にチロシンリン酸化されることを見出した。pY1685-MAP1Bは機能未知であったが、リン酸化変異体は成長円錐内のアクチン骨格の形態に異常が生じることから、必ずしも微小管ではなく、過去にも報告があるようにMAP1BのF-アクチン上での分子機能の存在が示唆された。その結果、細胞機能としては神経軸索の伸長方向の制御に関わることや、個体レベルにおいては発生過程の脳全体において広く分布し、神経回路の正常な構築に関わる可能性も得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生過程の脳はチロシンリン酸化が活発な場であることは古くから知られていたが、どの分子が良くリン酸化されているのかという定量的なアプローチは行われておらず、その意義は不明なままであった。本研究課題の遂行により、pY1685-MAP1Bが成長円錐の形態制御を介して、正常な脳発生過程の進行や正しい神経回路を構築するために貢献している分子である可能性が得られたことから、なぜ脳発生過程ではチロシンリン酸化活性が高い必要があるのか、その答えを出す一助になることが強く期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein tyrosine phosphorylation is known to be strongly activated in the developing neuron. I found that microtubule-associated protein 1B (MAP1B), was highly phosphorylated at Y1685 (pY1685-MAP1B) in the embryonic mouse brain. Although functions of pY1685-MAP1B were unclear, I found that overexpression of phosphomimetic MAP1B caused the abnormal morphology in growth cone, suggesting that pY1685-MAP1B interact with F-actin there. Furthermore, I revealed that the axon of phosphomimetic MAP1B-overexpressed neuron grew in the abnormal directions. Since phosphoproteomic results showed that pY1685-MAP1B was identified in the various regions of the developing brain, I concluded that this phosphorylation contributes to the construction of normal neuronal circuits.

研究分野：神経科学

キーワード：脳発生過程 リン酸化プロテオミクス 微小管結合タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

脳発生過程はチロシンリン酸化が生理的に最も活性化される場面の1つであることが分かっていた。申請者は特定の翻訳後修飾を網羅的に検出できるリン酸化プロテオミクスを用いて、まずこの過程で最も多く存在するチロシンリン酸化を受ける分子を探索し、微小管結合タンパク質 MAP1B の 1685 番目チロシン残基のリン酸化体 (pY1685-MAP1B) が発生過程のマウス胎仔脳で最も高頻度にチロシンリン酸化されることを見出した。MAP1B は発生過程の脳に特異的に高発現し、正常な神経回路を形成するための必須分子であり、さらに MAP1B の分子機能を制御する主な方法はリン酸化であるとされるが、pY1685-MAP1B の役割については一切報告が無かった。そこで本研究課題では、脳の発生過程特異的に増大する pY1685-MAP1B の機能を明らかにすることに取り組んだ。

## 2. 研究の目的

これまで pY1685-MAP1B の機能報告は皆無であったが、内因性の細胞内局在が神経成長円錐のフィロポディアに濃縮される傾向にあること、並びに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することが判明したため、申請者は“pY1685-MAP1B はアクチン繊維の重合や分岐、または束化に関わることで成長円錐の形態制御に関わる”と仮説を立てた。本研究課題では本仮説の検証も踏まえてより詳細な細胞内、生体内機能解析を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では pY1685-MAP1B の脳内分布とアクチン骨格形成における役割を明らかにするため、以下の実験を実施した。

- (1) 発生過程における pY1685-MAP1B の脳内分布をリン酸化プロテオミクスで同定。
- (2) アクチン重合阻害剤による成長円錐構造の破綻がもたらす pY1685-MAP1B の挙動。
- (3) リン酸化変異体過剰発現における神経軸索伸長解析

### (1) 発生過程における pY1685-MAP1B の脳内分布をリン酸化プロテオミクスで同定。

これまでのリン酸化プロテオミクスのデータは全脳で行ってきたが、胎仔脳の各部位、または神経成長円錐における pY1685-MAP1B の含有量を明らかにするため、いくつかの部位に裁断した胎仔脳や、胎仔全脳から精製した成長円錐画分を調製し、リン酸化プロテオミクスを行った。

①胎生 15 日目のマウス胎仔脳を 5 つの部位 (大脳、中脳、小脳、間脳・視床下部、橋・延髄) に分け phase-transfer surfactant (PTS) 溶液で可溶化した。成長円錐画分は胎生 15 日目のマウス全脳から密度勾配遠心法にて精製した。

②in solution digestion でトリプシン消化を行い、リン酸化ペプチドはキットを用いて濃縮・脱塩した後に、LC-MS/MS (Sciex; Triple TOF5600) 解析により同定した。

### (2) アクチン重合阻害剤による成長円錐構造の破綻がもたらす pY1685-MAP1B の挙動。

胎生 15 日目のマウス胎仔脳大脳皮質または海馬から単離した初代培養神経細胞を分散培養し、培養 2 日目の細胞に対して、アクチン重合阻害剤や脱重合阻害剤、分岐阻害剤の計 4 種の薬剤を短時間処置した。その後、4%PFA で細胞を固定した後に免疫染色を行い、成長円錐における F-アクチンの構造と、pY1685-MAP1B の分布について評価した。

### (3) リン酸化変異体過剰発現における神経軸索伸長解析

胎生 15 日目のマウス胎仔脳大脳皮質または海馬から単離した初代培養神経細胞に対して、FLAG タグ付きの野生型、リン酸化変異型 (Y1685F) MAP1B の発現遺伝子を導入し、分散培養を 2 日間行った。その後、4%PFA で細胞を固定した後に免疫染色を行い、神経軸索の伸長速度および方向性を評価した。

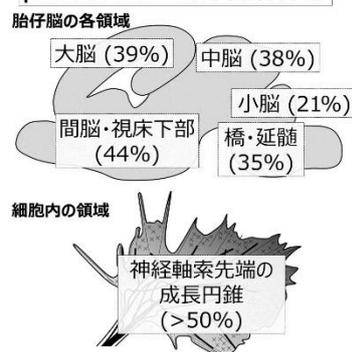
## 4. 研究成果

### (1) 発生過程における pY1685-MAP1B の脳内分布をリン酸化プロテオミクスで同定。

リン酸化プロテオミクスの結果、pY1685-MAP1B はマウス胎仔脳のあらゆる部位において最も多く存在するチロシンがリン酸化された分子であった【図 1】。また、その細胞内分布においては、細胞質よりも成長円錐画分により多く濃縮されており、総チロシンリン酸化分子中における割合は平均して 50%以上を占めていた。これらの結果は、pY1685-MAP1B が正常な脳発生過程の進行や神経回路を正しく構築することに関わっている可能性を示している。

また、リン酸化プロテオミクスの結果からは新たに MAP1B 以外

【図1】 総チロシンリン酸化分子中の pY1685-MAP1B が占める割合。



の微小管結合タンパク質についても、高頻度なリン酸化が発生過程の段階で同時多発的に生じることも判明しており、MAP1B だけでなく複数の微小管結合タンパク質の共通する役割についても新しい知見を得たため、解析を開始した。

(2) アクチン重合阻害剤による成長円錐構造の破綻をもたらす pY1685-MAP1B の挙動。

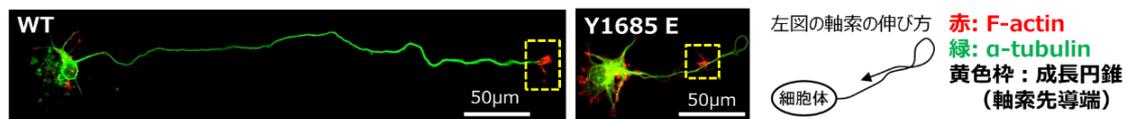
アクチン重合阻害剤 (CytochalasinD;0.1 $\mu$ M, 10min、LatrunculinB;0.5 $\mu$ M, 30min) を処置すると、どちらの薬剤においても、成長円錐内のアクチン骨格の崩壊が見られ、これに伴い pY1685-MAP1B の分布も成長円錐から消失し、神経軸索または細胞質への分布が確認された。

一方、アクチン脱重合阻害剤 (Jasplakinolide;0.05 $\mu$ M, 10min) を処置すると、F-アクチンは成長円錐の central domain (C-domain) に濃縮され、同じ挙動が pY1685-MAP1B にも見られた。さらにアクチンの分岐阻害剤 (CK-666;100 $\mu$ M, 30min) を処置した場合には、ラメリポディアの面積が著しく減少したが、pY1685-MAP1B の分布は F-actin と共局在したままで大きな変化は見られなかった。

(3) リン酸化変異体過剰発現における神経軸索伸長解析

野生型を過剰発現させた神経細胞と比較して、リン酸化変異型 (Y1685F) を過剰発現させた神経細胞の軸索伸長を評価した所、伸長速度には大きな差が見られなかったものの、伸長の方向性が著しく乱れる傾向にあることが判明した【図2】。

**【図2】リン酸化変異体の過剰発現は軸索の伸長方向の決定に関わる。**



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okada M, Kawagoe Y, Takasugi T, Nozumi M, Ito Y, Fukusumi H, Kanemura Y, Fujii Y, Igarashi M.	4. 巻 47
2. 論文標題 JNK1-Dependent Phosphorylation of GAP-43 Serine 142 is a Novel Molecular Marker for Axonal Growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2668-2682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-022-03580-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------