

日米科学技術協力事業「脳研究」分野
グループ共同研究実施報告書

[研究分野：細胞・分子]

1. グループ共同研究代表者

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授・竹居 孝二

2. 研究課題名

神経成長円錐における新規アクチン制御機構

3. 日本側グループ組織（代表者及び分担者の所属・職・氏名）

代表者：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授・竹居孝二

分担者：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授・山田浩司

分担者：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教・田邊賢司

4. 米国側グループ組織（代表者及び分担者の所属・職・氏名）

代表者：イェール大学医学部細胞生物学講座・教授・ピエトロ・デカメリ

分担者：同講座・ポストドクトラルフェロー・ショーン・ファーガソン

5. 研究期間

平成21年4月1日～平成24年3月31日

6. 研究の概要，成果及び意義（1000字）

神経細胞成長円錐の形成に関わるアクチン制御機構について調べた。まずダイナミン1がアクチン重合に必要であることを脳細胞質を用いた *in vitro* アクチン重合解析により示した。脳細胞質からのダイナミン1の枯渇、ダイナソア（ダイナミン阻害剤）添加、抗ダイナミン1抗体添加は、いずれもアクチン重合を減少させた。ダイナミン1はコルタクチンが結合することが質量分析により判明したので、両分子のFアクチンに対する影響を調べた。ダイナミン1とコルタクチンは *in vitro* でGTP存在下にアクチン線維を束化し、形成されたアクチン線維束に沿って両タンパクは点状に共局在することが蛍光免疫染色により認められた。線維束は数本から十数本のFアクチンで構成され、線維束に沿ってタンパク複合体のクラスターが断続的に局在し、しばしば、3、4本のアクチン線維にタンパク複合体が巻付く像が電顕により観察された。ダイナミン1/コルタクチン複合体は外形約50nmのリング状で、GTP γ S（非加水分解性GTP類似体）存在下ではリングが大きく開いた構造として観察された。ダイナミン1とコルタクチンは神経系細胞（NG108細胞、SH-SY5Y細胞）の成長円錐フィロポディアに点状に共局在し、アクチン線維束に局在することが免疫電顕により認められた。抗ダイナミン1抗体のマイクロインジェクション、ダイナソア添加により成長円錐は急激に退縮し、コルタクチンRNAiも成長円錐と神経突起の形成を阻害した。

次に、コルタクチンによる成長円錐のアクチン制御にPKCリン酸化が関与することを見だし、そのリン酸化部位をMALDI質量分析法により複数同定した。コルタクチンのリン酸化は、NG108細胞の成長円錐をLPAを用いて崩壊させることにより起こり、PKC阻害剤Ro-31-8220により阻害された。コルタクチンとPKC α （PKCのアイソフォーム）は、SH-SY5Y細胞の成長円錐フィロポディアにおいて共局在し、免疫沈降法により結合することが示された。両分子の結合は成長円錐を退縮させる

PMA (PKC アクチベーター)処理により増加した。以上より、神経細胞成長円錐フィロポディアの安定化にダイナミン1 / コルタクチン状複合体が関与し、このプロセスの制御にコルタクチンの PKC リン酸化が関与すると考えられた。

7. その他 (実施上の問題点, 特記事項等)

本研究の成果は以下の学会で発表された。

Hiroshi Yamada, Tadashi Abe, Yoshihiro Kawada and Kohji Takei: Novel mechanism of actin bundle formation by dynamin/cortactin ring complex. 49th Annual meeting, American Society for Cell Biology, San Diego, CA, 2009

竹居孝二、阿部匡史、川田慎浩、山田浩司: Dynamin 1/cortactin complex mechanically bundles actin filaments and supports the formation of growth cone filopodia、第33回日本神経科学、第53回日本神経化学、第20回日本神経回路学会合同年会、神戸、2010

Kohji Takei, Tadashi Abe, Hiroshi Yamada: Dynamin 1 / cortactin complex bundles actin filaments and supports growth cone formation. 50th Annual meeting, American Society for Cell Biology, Philadelphia, PA, 2010

山田浩司、阿部匡史、竹居孝二: Actin bundle formation by dynamin-cortactin complexes is important for filopodium stability of growth cone、日本薬学会第131年会、静岡、2011

山田浩司、勢井麻梨、阿部匡史、増本年男、菊池達也、池田 敏、富澤一仁、松井秀樹、竹居孝二: 成長円錐糸状仮足形成における Cortactin の PKC・によるリン酸化とアクチン制御の可能性、第84回日本生化学会大会、京都、2011

Hiroshi Yamada, Tadashi Abe, Toshio Masumoto, Teiichi Nishiki, Mari Sei, Tatsuya Kikuchi, Kazuhito Tomizawa, Satoshi Ikeda, Hideki Matsui, and Kohji Takei: PKC phosphorylation of cortactin is implicated in the regulation of actin dynamics: 51th Annual meeting, American Society for Cell Biology, Denver, CO, 2011

◎ 参考資料があれば、添付ください。