

Arf6 GAP ACAP2/3 による神経突起伸長機構の解明

山本 創 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 大林 典彦 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

考える葦と例えられるように、ヒトが人たる所以は正常な脳機能の獲得にある。多数の神経細胞が軸索伸長、軸索の誘因、シナプス形成など様々な発生過程を経ることで、脳は生存に適切なネットワークを構築していく。一方で、脳をはじめとする中枢神経系の神経細胞は、一度損傷を受けると回復・再生しにくいことが知られており、その詳細なメカニズムも分かっていない部分が多い。つまり、神経細胞内の分子メカニズムを明らかにすることは、発生プロセスの解明を見据えた生物学的にも、臨床に向けた医学研究においても非常に重要である。

神経回路形成を調節する因子の1つに、低分子量GTPaseであるADP-ribosylation factor 6(Arf6)が挙げられる。Arf6はエンドソームや細胞膜周辺に局在しており、活性化・不活性化のサイクルを繰り返す分子スイッチとして機能することで、アクチン細胞骨格の再編成、小胞輸送の調節をはじめ、多くの生理機能に関与することが知られている。Arf6の活性化調節には、GTPase-activating protein(GAP)やGuanine nucleotide exchange factor(GEF)が関わり、これまでの研究により多数のタンパク質がArf6のGAPやGEFとしての機能を持つことが報告されている。そして、GAPやGEFによるArf6の活性化調節とそれに関わる様々なシグナル経路は、Arf6が有する多彩な生理機能に必要不可欠な要素と考えられる。

近年Arf6 GAPであるACAP2及びACAP3がArf6の活性制御を介し、神経突起の伸長を促進することが報告されている²⁰⁾。しかしながら、これらArf6 GAPがどのような作用機序によって神経突起の伸長に関与しているかは未だ明らかにされていない。本研究では、神経分化のモデル細胞であるラット副腎髄質由来の褐色細胞腫PC12細胞を用いて、ACAP2及びACAP3それぞれの機能の解析を行った。

【方法】

1) 細胞培養

本研究で用いたPC12細胞はDMEM培地(10% HS, 5% FBS, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin)中で37°C, 5% CO₂条件下で培養した。HEK293T細胞はDMEM培地(10% FBS, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin)中で37°C, 5% CO₂条件下で培養した。トランスフェクションにはLipofectamine 2000(Invitrogen)を用いた。PC12細胞ではトランスフェクション前に抗生物質無添加DMEM培地に交換し、トランスフェクションの6時間後に抗生物質入りの培地に交換した。

2) 細胞突起の計測

トランスフェクションの24時間後、濃度が10 ng/mlになるようNGF(Alomone Labs)を添加し、36時間インキュベーター内で培養した。この細胞を免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、染色された細胞からランダムに10個以上選んで写真を

撮った。その後、ImageJにて突起の長さを測定し、Rを用いたダネット検定により突起の長さを定量した。

3) 免疫染色

HA, GFPタグのついたACAP及びACAP3をPC12細胞にトランスフェクションし、その24時間後にNGF処理を36時間行った。次いでPBSで細胞を洗浄し、4% PFA/PBSを用いて10分間室温で固定後、0.1% TritonX-100/High salt PBSTで10分間透過処理を行い、1% BSA/PBSで30分ブロッキングした。その後適切な1次抗体を1.5時間、2次抗体を1時間室温でそれぞれ反応させ、封入・乾燥を行った。

4) 作用ドメインの特定

ACAP2及びACAP3を構成する4つのドメインBAR, PH, ArfGAP, ANKRをPCRで増幅し、pEGFPにクローニングした。また、全長ACAP2, ACAP3をpcDNA3-HA, pEGFPにクローニングした。これらベクターを様々な組み合わせでHEK293T細胞にトランスフェクションし、共免疫沈降法とウェスタンブロット法を用いてACAP2とACAP3における相互作用の有無と関与するドメインの解析を行った。

【結果・考察】

卒研発表会にて報告させていただきます。

【参考文献】

- 1) 本宮 綱紀 *et al.* (2016) 低分子量Gタンパク質Arf6の個体における多彩な生理機能, *Journal of Japanese Biochemical Society* 88(1): 78-85
- 2) Kobayashi *et al.* (2012) Rab35 regulates Arf6 activity through centaurin-b2 (ACAP2) during neurite outgrowth, *Journal of cell science* 125: 2235-2243
- 3) Miura *et al.* (2016) ACAP3 regulates neurite outgrowth through its GAP activity specific to Arf6 in mouse hippocampal neurons, *Biochemical Journal* 473(17):2591-2602;