

平成 25 年度
博士論文

Growth arrest specific protein 7b (Gas7b) の
細胞骨格構造と神経細胞形態制御機能の解析

東北大学大学院農学研究科
応用生命科学専攻

後藤 愛那

指導教員 内田 隆史 教授

目次

目次	1
凡例	4
序論	6
方法	9
(i) 細胞培養・遺伝子導入・薬剤処理	
(ii) 細胞ライセートを用いた Western blotting	
(iii) 細胞固定・免疫染色	
(iv) 牛脳からの tubulin 精製	
(v) His-Gas7b 精製	
(vi) MT 重合解析	
(vii) MT 共沈降解析	
(viii) 暗視野顕微鏡観察	
(ix) G-actin 精製	
(x) F-actin 重合	
(xi) EM 観察	
(xii) pull down 解析	
(xiii) Blue Native-PAGE (BN-PAGE)	
(xiv) ゲルろ過解析	
(xv) マウス組織ライセートを用いた Western blotting	
結果・考察	13
1 Gas7b 高発現細胞における形態変化	13

1-1	緒言	
1-2	PC12 細胞における形態変化誘導評価	
1-3	Neuro 2A 細胞における形態変化誘導評価	
1-4	考察	
2	Gas7b による tubulin 溶液の濁度上昇	16
2-1	緒言	
2-2	濁度法および DAPI 蛍光法評価	
2-3	共沈降解析	
2-4	PTX-MT を用いた濁度法評価	
2-5	考察	
3	Gas7b による MTs 束化	19
3-1	緒言	
3-2	暗視野顕微鏡観察	
3-3	EM 観察	
3-4	考察	
4	Gas7b による MT と F-actin 架橋	21
4-1	緒言	
4-2	EM 観察	
4-3	考察	
5	Gas7b の機能分子形態	22
5-1	緒言	
5-2	共沈降解析	
5-3	pull down 解析	
5-4	EM 観察	

5-5	BN-PAGE	
5-6	ゲルろ過解析	
5-7	考察	
6	生体における Gas7b の役割	25
6-1	緒言	
6-2	組織別発現解析	
6-3	週齢別発現解析	
6-4	考察	
	総合考察	27
	参考文献	30
	謝辞	34

凡例

本論文で用いた略語を以下に示す。

A β	amyloid β protein
AD	Alzheimer's disease
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
BN-PAGE	Blue Native-PAGE
CBB	coomassie brilliant blue
CT	computed tomography
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
D-MEM	dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EM	electron microscope
F-actin	actin filament
FBS	fetal bovine serum
G-actin	globular actin
Gas7	growth arrest specific protein 7
HS	horse serum
MAPs	microtubule associated proteins
MeOH	methanol
MRI	magnetic resonance imaging
MT	microtubule
NGF	Nerve growth factor
NOC	nocodazole
NP-40	P-40, polyoxyethylene(9)octylphenyl ether

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PD	Parkinson disease
PFA	paraformaldehyde
PTX	paclitaxel
PVDF	poly vinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
2-Me	2-mercaptoethanol

その他の一般化学物質は通例に従った。

本研究で用いた試薬類は、特に断りのない限りナカライテスクの特級試薬を用いた。試薬を調製する際は精製水、MiliQ 水または 120° C で 20 min オートクレーブ処理した滅菌水を適宜用いた。

序論

【背景】

近年、医療技術は著しい発展を遂げており、重篤疾患に対する画期的な新薬や治療法が開発されてきた。しかし、Unmet Medical Needs（未だ満たされていない医療ニーズ、未だ有効な治療法がない医療ニーズ）という言葉がある通り、生活習慣病、癌、老人病、精神疾患をはじめ、確実な治療方法が確立されていない疾患も数多く残されている。中でも、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)といった神経変性疾患に対する治療薬は、疾患発症後にその進行を遅らせる効果に留まっている。これら疾患については、発症メカニズム解明も未だ充分でないこと、脳という特殊な部位における診断や解析の困難さ、主な病理学的所見であるタンパク質変性の不可逆性といった要因が、決定的な治療法確立を妨げている。

【AD 症状と現在の治療法】

AD とは、認知症を引き起こす疾患のひとつである。AD の症状は、「中核症状」（記憶障害、見当識障害、理解・判断力障害、実行力障害）と、「周辺障害」（幻想・妄想、徘徊、興奮・暴力、不潔行為、せん妄、不安・焦燥、鬱）に分けられ、病状の進行により徐々に日常生活を送ることが困難となる。

これらの症状の主な原因が、脳神経細胞の減少であると考えられている。AD 患者脳においては、変性した過剰リン酸化 Tau や A β などのタンパク質の凝集・蓄積が見られる（神経原繊維変化・老人斑）。この変性タンパク質の凝集体が毒性を持ち、中枢神経細胞を死滅させるため、脳組織の萎縮を引き起こすと考えられてきた。

AD は問診、神経心理検査に加え、MRI や CT 等の画像診断、血液検査、尿検査でも診断が可能となった。薬物治療としては、「中核症状」に対する脳内伝達物質増加剤、「周辺症状」に対する精神安定剤や抗うつ剤の投与が行われる。また、非薬物治療として、患者の活動性の向上、不安・ストレスの緩和などが行われる。しかしながら、これらの治療は疾患を完治させるものではなく、進行を

遅らせ、これまで通りの日常生活を送る時間をできる限り引き延ばすだけである。

【AD 治療に対する新たなコンセプトの提案】

前述した通り、AD の病理学的特徴は変性タンパク質の凝集とそれに伴う神経細胞死と考えられている。しかしながら、これらの変性タンパク質凝集が疾患発症のそもそものトリガーであるか、それとも神経細胞機能不全によって現れる症状のひとつであるか、はっきりとした証明はない。

本研究室では、まだ明らかにされていない他の要因が神経細胞機能不全を引き起こし、その結果としてタンパク質変性・凝集、神経細胞死が起こるという可能性を提唱した。その場合、「変性タンパク質の凝集防止」は根本的な解決にならず、可逆的な可能性が残される「神経細胞機能不全」のステージが新たな治療のターゲットとなる。この新たなステージに注目することで、不可逆性の強い「変性タンパク質の凝集」より早期段階での診断・治療が可能となる。

そこで我々が注目したのが「細胞骨格」、特に「Microtubule (MT) 構造」である。神経細胞に特徴的な突起伸長にも深く関わる MT 構造の崩壊が、神経細胞機能不全を引き起こす可能性があるという観点から、MT 構造を制御するタンパク質、特に当研究室で見出された新規 MT 関連因子 Growth arrest specific protein 7b (Gas7b) (1-3) の機能解析を行って来た。

【神経細胞成熟と AD】

正常な記憶や学習に重要な神経新生 (4) においては、細胞形態変化を伴う“神経細胞の成熟”過程が必要不可欠である。この神経細胞形態変化については、海馬神経細胞やプルキンエ細胞の神経突起 (axon、dendrite) 伸長について主に研究されてきた (5, 6)。AD 患者脳においては、神経細胞の増殖と成熟が正常でないこと (7-9)、その一方で神経細胞成熟を促進することで症状が改善すること (10) が報告されている。

【細胞骨格】

MT と actin filament (F-actin) は細胞分裂、分化、運動、細胞内輸送など様々な細胞活動を制御する細胞小器官である (11)。MT は α -tubulin と β -tubulin が、F-actin は G-actin が基本単位であり、必要に応じてそれらが重合と脱重合を繰り返す“動的不安定性”を持つ (Fig.1-A)。

また、細胞骨格構造は microtubule-associated proteins (MAPs)、N-WASP、fascin といった多様なタンパク質により制御されており、これらは癌や AD 治療のターゲットとなり得る (12)。実用化例としては、抗癌剤として用いられる MT 安定化剤 paclitaxel (PTX)、細胞周期 M 期同調剤として用いられる MT 重合阻害剤 Nocodazole (NOC) などがある (Fig.1-A)。

【Gas7b】

Gas7b は大脳皮質神経細胞、海馬神経細胞、小脳プルキンエ細胞で発現するタンパク質であり (13)、細胞形態変化に関わることが報告されている (13–15)。また、我々は AD 患者脳において Gas7b のタンパク質レベルが低いことを発見した (2)。これらの報告は、Gas7b が AD の発症・進行に関わる可能性を示唆している。

Gas7b は WW domain と F-BAR domain を持つ (Fig.1-B)。WW domain は、リン酸化 Tau と相互作用することが知られている Peptidyl prolyl cis/trans isomerase (Pin1) (16) と高い相同性を持つ。一方、F-BAR domain は細胞膜構造を制御するタンパク質で保存されており (17)、BAR domain super family タンパク質は、細胞膜、細胞膜結合細胞骨格を介して、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、細胞運動などに関わる (18, 19)。

Gas7b は F-BAR domain を介して F-actin の重合を促進することが報告されており (20)、それに加え、我々は Gas7b が MT にも直接結合すること、過剰量で kinesin の運動性を阻害することを報告した (3)。

なお、human Gas7b は mouse Gas7bc、human Gas7b は mouse Gas7d と等しいが、本論文では human Gas7 のアイソフォーム名に統一して表記する。

方法

(i) 細胞培養・遺伝子導入・薬剤処理

PC12 細胞はコラーゲンプレートで 10% FBS、5 % HS、penicillium streptomycin 含有 High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) で、Neuro 2A 細胞は 10% FBS、penicillium streptomycin 含有 High Glucose D-MEM 中で培養した。

HT4 (human Tau)、GFP、GFP-Gas7b 発現ベクターおよび Control siRNA、Gas7b siRNA 導入ベクターは、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用い、推奨 protocol に従って導入した。ベクター導入の際は 無血清 Opti-MEM (Life Technologies) を用いた。ベクター導入後、PC12 細胞は 5 % FBS、50 ng/ml NGF 含有 D-MEM で、Neuro 2A 細胞は通常の生育培地で 48 hr 培養した。

薬剤処理を施す場合、ベクター導入 48 hr 後の Neuro 2A 細胞の培地に 5 μ M NOC (in DMSO) を加え、37°C で 30 min 処理した。Control の細胞は DMSO で処理した。

(ii) 細胞ライセートを用いた Western blotting

細胞を Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian cell and tissue extract (nacalai tesque) 含有 NP-40 lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 5 mM EDTA] に懸濁、超音波破碎した後、3 min ボイルした。4°C、15,000 rpm で 30 min 遠心分離し、上精をサンプルとして回収した。

SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、anti-Gas7b antibody (2)、anti-EGFP antibody (abcam)、tau5 antibody (BD Biosciences)、monoclonal anti- α -tubulin antibody (Sigma-Aldrich) と HRP 標識二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いてそれぞれのタンパク質を検出した。

(iii) 細胞固定・免疫染色

細胞の固定は 4% PFA で行った。

その後 monoclonal anti- α -tubulin antibody (Sigma-Aldrich) と Alexa 594-labeled secondary antibody (Life Technologies) により免疫染色した。核は DAPI により染色した。

染色した細胞は蛍光顕微鏡 (Biozero; Keyence) で観察した。

(iv) 牛脳からの tubulin 精製

Tau などの MAPs を含んだ状態の crude-tubulin は、既知の protocol (21) に従って精製した。

MAPs を含まない pure-tubulin は、high-molarity buffer protocol (22) に従って精製した。

牛脳は、本学農学研究科の渡邊庸一先より提供して頂いた。

(v) His-Gas7b 精製

Gas7 (Gas7b、Gas7a、F-BAR) (Fig.10-B) を His-tag 付加タンパク質として大腸菌 (BL21 株) 中で発現させた。Sonication buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 8 M Urea] 中で超音波破碎し、4°C、15,000 rpm で 30 min 遠心分離した。回収した上清から、目的タンパク質を Ni-NTA resin (QIAGEN) によりアフィニティ精製した。精製後のタンパク質はその後の解析 (重合解析、結合解析、ゲルろ過等) に応じた buffer で透析した。

(vi) MT 重合解析

MT 重合は PM buffer [100 mM PIPES (pH 6.9), 5 mM EGTA, 2mM MgCl₂, 1mM GTP] 中、37°C で行った。

濁度法は、MT 重合に伴う 350 nm 吸光 (O.D.₃₅₀) の上昇を測定する方法 (23) であり、100 μl [1.68 mg/ml pure-tubulin or 1.03 mg/ml crude-tubulin, x μM Gas7b or PTX in PM buffer] 反応液を 37°C で 1 hr、30 sec 毎の吸光度を測定した (V-650 spectrophotometer; JASCO)。

4.0 mg/ml pure-tubulin を PM buffer 中、37°C で 15 min 重合した。そこに 80 μM PTX を添加し、さらに 37°C で 10 min インキュベートしたものを“重合 MT” (=PTX-MT) とした。この PTX-MT を用い、反応液 100 μl [1.0 mg/ml PTX-MT, +/- 10 μM NOC, +/- 10 μM PTX, x μM Gas7b in PM buffer] の O.D.₃₅₀ を同様に測定した。

DAPI 蛍光法 (24, 25) は、MT 管構造特異的に結合する DAPI の性質を利用した方法である。濁度法と同じ組成の反応液 100 μl に、終濃度 5 μM DAPI を添加し、励起光 360 nm に対する発光 465 nm 強度を 37°C で 1 hr、30 sec 毎に測定した (F200; TECAN)。

(vii) MT 共沈降解析

濁度法測定後のサンプルを 15,000 rpm、20 min 遠心分離し、未重合 tubulin を上清、重合 MT

を沈殿として回収した。沈殿は PM buffer に再懸濁し、SDS-PAGE と CBB 染色により解析した。

あるいは、PTX-MT に G-actin と Gas7b を加え、PM buffer 中で 20 min インキュベートした後、同様に分離、解析した。

(viii) 暗視野顕微鏡観察

濁度法測定後のサンプルを暗視野顕微鏡により観察した (dark field microscope BX51; Olympus)。

(ix) G-actin 精製

actin は既知のプロトコル (26) に従い精製したものを、産業技術総合研究所・バイオメディカル部門・広瀬恵子先生の研究グループから提供していただいた。

(x) F-actin 重合

F-actin 重合は F buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.2 mM ATP] 中、室温で行った。

(xi) EM 観察

予め調整した PTX-MT に Gas7 タンパク質を添加し、グリッド上で 37 °C、20 min 以上インキュベートした後 Negative 染色した。

また、MT と F-actin との架橋を解析するために、各々適正条件下で重合させた PTX-MT と F-actin を混合し、37°C で 2 hr 以上インキュベートした。Gas7b を加え、グリッド上でさらにインキュベートした後 Negative 染色した。

MT および F-actin 上での Gas7b の局在を観察するために、His-tag を認識する Ni-NTA-Nanogold (Nanoprobes) を用いた。Nanogold の懸濁液は予め PM buffer に置換した。PTX-MT、F-actin および Gas7 混合液をグリッドに乗せ、Nanogold を加えた後、液化窒素により急速凍結した。

いずれのサンプルも Philips Tecnai F20 EM、Gatan cold stage、20 kV で観察した。画像は焦点 2000–2500 nm、拡大率 50,000× において、Kodak SO-163 フィルムに撮影した。

(xii) pull down 解析

170 pmol pure-tubulin あるいは 170 pmol G-actin、210 pmol His-tag 付加 Gas7 タンパク質、Ni-NTA resin を 50 μ l PM buffer 中で混合し、4°C で 1 hr 混和した。15,000 rpm、5 min 遠心分離し、Gas7 タンパク質と相互作用するタンパク質を Ni-NTA resin と共に沈殿として回収した。Wash buffer [10 mM Imidazole in PM buffer] で洗浄後、Elution buffer [1 M Imidazole in PM buffer] で溶出し、SDS-PAGE と CBB 染色により解析した。

(xiii) Blue Native-PAGE (BN-PAGE)

既知の方法 (27) に従って 7-15 % グラジエントゲルを作成した。

Gas7b を BN Sample buffer [0.5 % Coomassie, 75 mM 6-aminocap, 5 mM Bis-Tris, 1 % Glycerol]、あるいは SDS Sample buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH8.8), 1 % SDS, 5 % 2-Me, 5 % Glycerol] 中で 4 °C、1 hr インキュベートし、泳動した。

泳動後、PVDF 膜に転写し、膜を MeOH で 5 min、3 回洗浄した後、Amido Black 染色液中で、バンドが検出されるまで振とうした。

(xiv) ゲルろ過解析

Tris buffer [50 mM Tris-HCl (pH9.0), 150 mM NaCl] 中で、Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) を用いたゲルろ過による分子量解析を行った。流速 0.5 ml/min で 1 ml ずつフラクションを回収し、各々のフラクションについて Bradford 法によるタンパク質濃度定量、SDS-PAGE と銀染色 (SilverQuest™ Silver Staining Kit; Life Technologies) による解析を行った。

(xv) マウス組織ライセートを用いた Western blotting

マウスから摘出した各臓器を、液体窒素で急速凍結した。2xSDS buffer [125 mM Tris-HCl (pH6.8), 10 % Glycerol, 2 % SDS] を加え、超音波破碎した後、3 min ボイルした。4°C、15,000 rpm で 30 min 遠心分離し、上清をサンプルとして回収した。

SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、Gas7 Antibody C-15 (Santa Cruz Biotechnology) と HRP 標識二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて Gas7 タンパク質を検出した。

結果・考察

1 Gas7b 高発現細胞における形態変化

1-1 緒言

Gas7b は、脳の神経細胞で発現していること、神経細胞形態変化に関わることがすでに報告されており (13-15)、この機能は主に F-actin の重合促進作用から説明されてきた。しかしながら、その直接的な証明はなされておらず、神経細胞の突起伸長や形態変化は、F-actin 重合だけでは説明できない部分も多い。また、我々は Gas7b が F-actin だけでなく MT とも関わることを新たに発見したことから (1-3)、MT あるいは tubulin に注目して、細胞突起伸長能や突起形態を改めて検証することとした。

PC12 細胞 (ラット副腎髄質由来褐色細胞) は通常培養条件では突起を伸ばしておらず、何らかの刺激 (低血清条件、NGF 処理条件等) により突起を伸ばす性質を持つため、Gas7b による顆粒細胞からの新たな突起形成評価に用いた。また、一般的に MT は axon (軸索) の、F-actin は filopodia (糸状仮足) や reticulopodia (網状仮足) の主構成要素であると考えられているため、特に十分な長さを持つ axon 様突起に注目した。

一方、Neuro 2A 細胞 (マウス神経芽腫細胞) は神経由来細胞であり、通常状態でも突起を伸長している。従って、Gas7b が既に形成された突起にどのような変化・影響をもたらすかに注目し、神経細胞の成熟過程への作用を検討した。

1-2 PC12 細胞における形態変化誘導評価

内在性 Gas7b の発現を誘導するための培地 (5 % FBS, 50 ng/ml NGF) で PC12 細胞を培養しながら解析を行った。PC12 細胞に GFP-Gas7b および GFP/Gas7b siRNA 1-4、GFP/Control siRNA ベクターを導入した (それぞれを PC12-Gas7b、-siRNA、-Control とする)。細胞ライセートを Western blotting に供し、内在性 Gas7b の発現誘導、siRNA 導入による Gas7b 発現抑制、GFP-Gas7b 発現ベクタ

一導入による GFP-Gas7b 高発現を確認した (Fig.2-A)。次に、各々の条件の PC12 細胞を蛍光顕微鏡で観察し、細胞の形態から “Type. 1A (突起無し)”、“Type. 1B (小突起を伸ばしている)”、“Type. 1C (細胞体の倍以上に突起を伸ばしている)” に分類し (Fig.2-B)、それぞれの細胞数をカウントした。その結果、PC12-Control に比べ PC12-siRNA では “Type. 1A” が増加 (23 % から 30 %)、“Type. 1C” が減少 (7 % から 5 %) した。一方 PC12-Gas7b では、“Type. 1C” が増加 (7 % から 20 %)、“Type. 1A” が減少 (23 % から 3 %) した (Fig.2-C)。

1-3 Neuro 2A 細胞における形態変化誘導評価

Neuro 2A 細胞に GFP および GFP-Gas7b 発現ベクターを導入した (Neuro 2A-GFP、Neuro 2A-Gas7b) (Fig.3-A)。さらにその後、NOC 処理を施し、固定・免疫染色した細胞を観察し、突起の形態に応じて “Type. 2A (突起無し)”、“Type. 2B (通常の滑らかな突起)”、“Type. 2C (枝分かれや節のある不規則な突起)” で分類 (Fig.3-B)、それぞれの細胞数をカウントした (Fig.3-C)。無処理状態では、60 %以上の Neuro 2A-GFP および Neuro 2A-Gas7b で細胞突起が形成されていた (“2B” + “2C”)。Neuro 2A-GFP では NOC 処理により 60 % から 14 % まで突起を持つ細胞 (“2B” + “2C”) が減少した。Neuro 2A-Gas7b では 73 % から 31 % に減少し、Gas7b は NOC による突起消失に僅かに抵抗性を示した。

さらに細胞突起をより詳細に観察すると、Neuro 2A-Gas7b の突起形態は Neuro 2A-GFP のものとは大きく異なった。Neuro 2A-GFP のほとんどは、滑らかな突起を持つ細胞 “2B” であったが (60 % 中の 56 %)、Neuro 2A-Gas7b では枝分かや節のある突起を持つ細胞 “2C” が多く観察された (73 % 中の 56 %)。Neuro 2A-Gas7b 中の “2C” の不規則な突起を持つ細胞もまた、NOC 処理により減少した (56 % から 29 %)。

1-4 考察

PC12 細胞の解析 [1-2] では、Gas7b 発現 (培地による誘導あるいはベクター導入) により十分な長さの細胞突起形成が増加し、逆に siRNA によるノックダ

ウンでそれらが抑制された。したがって、Gas7b は、顆粒細胞からの新たな突起形成を促進することが示唆された。

また、Neuro 2A 細胞の解析 [2-2] から、Gas7b が既に形成された突起についても更なる形態変化を誘導しており、通常の滑らかな突起を、枝分かれを持つ不規則な突起へと変化させることが明らかとなった。この不規則な突起は、神経細胞成熟過程で形成される dendrite (5, 6) (スパイン) に類似した形態である。また、この dendrite 様突起が NOC 処理により減少したことから、これらの構成要素に MT が含まれていることが示された。

2 Gas7b による tubulin 溶液の濁度上昇

2-1 緒言

Gas7b 高発現細胞において著しい形態変化が観察され、それらが Gas7b と MT との関連からもたらされるという結果を受け、高濃度 Gas7b を用いて *In vitro* の MT 重合解析を行った。

濁度法は、MT 重合を評価する一般的な方法であり、重合物の増加に伴い上昇する溶液の濁度 (O.D. 350) を測定するものである (23)。時間分解能に優れ、定量的な解析方法であると言われているが、MT 重合以外の原因による濁度上昇を除外できずに同時に検出してしまう可能性がある。

一方、DAPI 蛍光法は、濁度法と同様の反応系に DAPI を添加し、蛍光を測定する方法である (24, 25)。DAPI は tubulin 上のひとつのサイトに結合し、蛍光強度が 14 倍に増強される。DAPI は tubulin ダイマーと重合 MT のどちらとも結合するが、重合 MT に 7 倍のアフィニティで結合するため、MT 管構造特異的な評価を行うことができる。

共沈降解析は、重合によって分子サイズが大きくなった MT およびその結合タンパク質を沈殿として、未重合の tubulin および非結合タンパク質を上清として分離する方法であり、Gas7b と MT の結合、濁度法・DAPI 蛍光法の結果の裏付け・確認を目的として行った。

いずれの方法も、MT 重合や構造を直接的に評価できるものではないため、これらの方法を組み合わせ、多方面から検証することで、Gas7b の影響を正しく明らかにすることができる。

2-2 濁度法および DAPI 蛍光法評価

pure-tubulin の重合条件に、0–6 μM Gas7b を添加し、37°C で経時的に O.D.350 を測定した (Fig.4-A)。その結果、濁度は Gas7b 濃度依存的に増加した。また、このグラフが二段階反応様であることに注目し、Phase I (0–450 sec) と Phase II (450–3600 sec) に分け、それぞれにおいて濁度上昇速度 ($\Delta \text{O.D.}_{350} = \Delta \text{Abs} / \text{sec}$)

を求めた (Fig.4-B)。Phase I の $\Delta O.D._{350}$ 増加は濃度依存的ではあるが、高濃度 Gas7b で飽和傾向が見られる (Fig.4-B left)。その一方、phase II では高濃度 Gas7b でも $\Delta O.D._{350}$ が増加し続けるという特徴が見られた (Fig.4-B right)。

次に、同条件のサンプルに DAPI を加え、DAPI 蛍光法を行った (Fig.4-C)。Positive control である PTX では蛍光が上昇したが、Gas7b 添加条件では変化がなかった。この結果は濁度法の結果と相反するものであった。

また、crude-tubulin を用いた濁度法 (Fig.4-D)、DAPI 蛍光法 (Fig.4-E) からも、同様の結果が得られた。

2-3 MT 共沈降解析

濁度法で 1 hr の測定後のサンプルを共沈降解析した (Fig.5-A)。その結果、重合 MT (Pre.) とともに回収される Gas7b は濃度依存的に増加した (Fig.5-A under/left)。一方、重合 MT (Pre.) 量自体は、Gas7b の添加によって変化しなかった (Fig.5-A under/right)。この結果は DAPI 蛍光法と相関するものである。

2-4 PTX-MT を用いた濁度法評価

PTX により予め安定化した MT (PTX-MT) を用いて、再度濁度法を行った (Fig.6-A)。PTX-MT の濁度は、PTX の添加あるいは NOC の添加により濁度が変化しなかった。その一方で、NOC により更なる重合を抑制した条件下で Gas7b を添加したところ、濃度依存的に濁度が上昇した。

2-5 考察

濁度法 [2-2] では、Gas7b 濃度依存的な濁度上昇が見られた。しかしながら、DAPI 蛍光法 [2-2] と共沈降解析 [2-3] から、Gas7b は MT の量あるいは長さを増加させる作用は持たないということが示され、濁度上昇はそれ以外の要因によって起こったと推測した。

濁度法 [2-2] において、MT 伸長が起こっている最中と考えられる Phase I (0-450 sec) と、MT 伸長が平衡に達していると考えられる Phase II (450-6000

sec) における濁度上昇速度 $\Delta O.D._{350}$ は異なる挙動を示した。注目すべき点は、Phase II で濁度が一定速度で上昇し続け、さらにその濁度上昇速度 $\Delta O.D._{350}$ が Gas7b 濃度依存的に増加していることである。これは、Gas7b が重合の完了した MT に作用し、濁度を上昇させていることを示唆している。

PTX-MT を用いた濁度法 [2-4] では、PTX を加えてもさらなる濁度上昇は見られなかった。それにも関わらず、NOC 添加で追加重合を抑えた条件下において Gas7b による濁度上昇が見られた。これは、Gas7b が重合 MT に作用し、繊維量増加以外の要因によって、濁度を上昇させるという仮説を裏付けるものである。

同時に、これらの結果は、濁度上昇が必ずしも繊維増加を反映しているとは限らないこと、複数の解析を組み合わせることで、MT 重合以外の新たな情報を得ることが可能であることを示している。

3 Gas7b による MTs 束化

3-1 緒言

ここまでの結果より、Gas7b が重合完了後の MT に対し何らかの影響を及ぼし、重合促進 (MT 繊維の長さ、数の増加) 以外の理由から濁度を上昇させている可能性が示唆された。その機能の詳細を調べるために、暗視野顕微鏡、および EM により MT の構造を直接観察した。

3-2 暗視野顕微鏡観察

濁度法で 1 hr の測定後のサンプル [2-2] を暗視野顕微鏡により観察した (Fig.7-A)。+0 μM Gas7b サンプルと比較して、+6 μM Gas7b 条件では太い繊維や顆粒の増加が観察された。

また、crude-tubulin においても同様の結果が得られた (Fig.7-B)。

3-3 EM 観察

重合 MT に対する Gas7b の影響をより詳細に観察するために、PTX-MT と Gas7b を混合し、インキュベートしたサンプルを Native 染色、EM で観察した (Fig.8-A)。Control で観察される PTX-MT は繊維一本一本がそれぞれ単独で観察された (Fig.8-A left)。一方、Gas7b 添加条件では、複数本の PTX-MT 繊維が互いに平行に接着し、束化していた (Fig.8-A right)。

さらに、PTX-MT と Nanogold ラベル Gas7b を cryo-EM により観察した (Fig.8-B)。その結果、多くの Nanogold ラベル Gas7b が MT 表層に付着していた。また、Nanogol ラベル Gas7b の分布は、完全なランダムではなく、集合体を形成していた。

3-4 考察

暗視野顕微鏡 [3-2] と EM [3-3] 観察から、Gas7b は MT 表層に結合することで、MT 同士を接着・束化させていることが示された。ここで観察された MT の

束化が、濁度の上昇をもたらしていたと結論づけた。

また、crude-tubulin を用いた解析でも同様の結果が得られていることから、ここで観察された作用は、MT に対する Gas7b の直接的な機能であると考えられる。

4 Gas7b による MT と F-actin 架橋

4-1 緒言

ここまでの結果より、Gas7b が MT と結合し、束化する作用を持つことが示された。Gas7b は F-actin とも関わるということが報告されているため (20)、MT と F-actin という異なる 2 種類の繊維に対してどう機能するかを、EM 観察により検証することとした。

4-2 EM 観察

PTX-MT と F-actin をそれぞれの適正条件下で予め重合した。それらを F-actin 重合条件 (F buffer 中) で混合し、37°C で 2 hr 以上インキュベートした。そこに Gas7b を加え、インキュベート 10 min 後、30 min 後にサンプリングし、Native 染色、EM で観察した (Fig.9-A)。その結果、インキュベート 10 min 後では MT と F-actin は離れて存在しているものがほとんどであったが (Fig.9-A left)、30 min 後では MT に接着あるいは絡み付く F-actin が多く観察された (Fig.9-A middle and right)。

また、インキュベート 30 min 後のサンプルに Nanogold を加えて同様に観察したところ、Nanogold は MT と F-actin の接着部に局在していた (Fig.9-B)。

4-3 考察

Gas7b は、*In vitro* で MT と F-actin という異なる繊維に結合し、ヘテロな繊維の束を形成するアダプターの役割を持つことが示された。これにより、以前の報告にある F-actin の重合・束化作用と、本研究で新たに発見された MT の束化という 2 つの機能を同時に持ち得ることが確認された。

5 Gas7b の機能分子形態

5-1 緒言

Gas7b が、ホモ (MT-MT) あるいはヘテロ (MT-F-actin) な繊維を束化する原理について、タンパク質レベルの解析を行った。

まず、共沈降解析により、重合 MT と G-actin との相互作用に Gas7b が影響するかどうかを調べた。

次に、Gas7b は繊維化していない tubulin、G-actin と相互作用するか、またそれに重要な domain を探索するために pull down 解析を行った。

また、tubulin と actin という 2 種類のタンパク質と同時に結合するためには、2 種類の (あるいは共通の) 結合サイトを持つ必要が有る。そのため、実際に Gas7b 自身がどのような分子形態で機能性を持っているのか、より自然な状態を解析するために、Blue Native-PAGE (BN-PAGE) を行った。通常、タンパク質解析で用いられる SDS-PAGE では、タンパク質に SDS を強く結合、高次構造を崩壊させ、負の電荷を持たせながら泳動する。そのため、分子量依存的に各タンパク質を分離することができるが、複合体や高次構造が全てほどけているため、それについての情報を得ることはできない。それに対し、電荷を持たせず、複合体自身の持つ荷電によってタンパク質を泳動する Native PAGE は、泳動パターンから分子量を決定することができない。一方、BN-PAGE では、CBB G-250 をタンパク質 (複合体) の表面に弱く結合させ、全体を負に荷電しながら泳動する。そのため、タンパク質の高次構造や複合体構造を保持したまま、なおかつ分子量依存的に分離することができるため、自然な状態での情報を得るために極めて有用な手法である。

さらに、Gas7b が他タンパク質と相互作用しているかについてはゲルろ過で解析した。

5-2 共沈降解析

MT 重合条件下 (PM buffer 中) において PTX-MT を調整し、未重合の G-actin

を加えた。さらに 20 min インキュベートした後、共沈降解析した (Fig.10-A)。MT 重合条件下 (PM buffer 中) であっても一部の actin は沈殿 (Fig.10-A lane 1) として回収されたが、PTX-MT 存在下でもその量は変化しなかった (Fig.10-A lane 2)。一方、同条件に Gas7b を加えると、沈殿として回収される G-actin 量が増加した (Fig.10-A lane 3)。

5-3 pull down 解析

His-tag 付加 Gas7 タンパク質 (Gas7b、Gas7a、F-BAR) を精製し (Fig.10-B)、His-tag と Ni-NTA resin 間の相互作用を利用した pull down 解析を行った (Fig.10-C)。その結果、Gas7 タンパク質いずれにおいても G-actin と tubulin が pull down された。

5-4 EM 観察

F-BAR タンパク質を用いて、前述の EM 観察 [2-6] と同様の方法により解析を行った。その結果、Gas7b の場合と同様、F-BAR タンパク質でも PTX-MT の束化が観察された (Fig.10-D)。

5-5 BN-PAGE

Gas7b を、BN Sample buffer あるいは SDS Sample buffer で処理し、7-15 % グラジェントゲルで BN-PAGE を行い、PVDF 膜への転写後、Amido Black 染色を行った (Fig.11-A)。その結果、Control である SDS Sample buffer 処理 Gas7b のバンドの位置と比較し、BN Sample buffer 処理 Gas7b は、ラダー状ではあるが明らかに Control よりも高分子側に広がるバンドパターンが見られた。

5-6 ゲルろ過解析

Gas7b、pure-tubulin、G-actin を混合、ゲルろ過により分離した。回収した各フラクションは Brad ford 法による全タンパク質濃度定量 (Fig.12-A)、SDS-PAGE と銀染色から Gas7b、tubulin、G-actin それぞれの定量を行った (Fig.12-B and C)。

Gas7b 単独の場合のピークの分子サイズは、210–380 kDa (elution time 22–24 min) であった (Fig. 12-C upper)。このことは、Gas7b (42 kDa) が水溶液中でテトラマーあるいはそれ以上の高分子複合体を形成していることを示しており、BN-PAGE の結果 [5-5] を裏付ける。また、tubulin と actin はいずれにおいても、Gas7b 添加でタンパク質量分布が高分子側にシフトしており、両者が Gas7b とそれぞれ相互作用するという pull down の結果 [5-3] と一致する。さらに重要な点は、Gas7b、tubulin、actin の三者混合状態では、分布のシフトがより大きくなっている点である。このとき、単独 tubulin は 80 % 以上が <209 kDa フラクシオンに存在し、actin 存在下でもその分布は変わらない (Fig. 12-C middle and 12-D upper)。同様に単独 actin の多くも <64 kDa フラクシオンに存在し、tubulin によりそれは変化しない (Fig 12-C lower and 12-D lower)。しかしながら、Gas7b 存在下でのみ tubulin および actin の分布が、>379 kDa の高分子側に大きくシフトした。

5-7 考察

共沈降解析 [5-2] から、Gas7b 存在下で PTX-MT とともに沈降する G-actin 量が増加したことから、Gas7b が重合 MT と未重合 actin を架橋することが確かめられた。

次に、pull down 解析 [5-3] の結果から、Gas7b は F-BAR domain を介して tubulin あるいは actin とそれぞれ結合することが示された。ゲルろ過の結果 ([5-6] もそれぞれ二者間の相互作用を裏付けている。加えて、Gas7b、tubulin、actin 混合特に注目したところ、それぞれの分布がさらに高分子側に移動することから、三者複合体を形成することが明らかとなった。このことは、Gas7b が tubulin、actin と同時に結合する機能を持っていることを示している。ここで重要なのが、BN-PAGE と単独 Gas7b ゲルろ過の結果である。これらの解析は、Gas7b 自身がオリゴマーを形成していることを示唆している。そのため、Gas7b が、複数の機能サイト (F-BAR domain) を持つ大きな機能性分子として存在していると推測できる。

6 生体における Gas7b の役割

6-1 緒言

これまで、Gas7b は Tau との相互作用に重要な WW domain を持つことから、脳、特に AD との関わりに注目して来た。しかしながら、ここまでの結果より、Gas7b 自体の機能における F-BAR domain の重要性が示唆された。また、Gas7b の機能を、神経細胞形態変化を含む「細胞分化」という面から捉えることもできる。そのため、脳以外の組織での Gas7b の発現解析、あるいは発生・成長過程でそれがどのように変化するかを改めて検証することとした。

ただし、結果で示す Gas7 アイソフォーム名は human Gas7 のものであり、マウスにおいては Gas7b = mouse Gas7 cb、Gas7a = mouse Gas7d である。

また、Negative Control として用いた Gas7b KO マウスは、Gas7b の WW domain を欠損させたマウスであり、Gas7a は発現する系統である。

6-2 組織別発現解析

WT および Gas7b KO マウス (週齢およそ 50–60) から各臓器 (脳、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、卵巣、精巣、前立腺) を摘出し、ライセートを調整した。Western blotting により Gas7 タンパク質を検出した (Fig.13-A)。その結果、WT マウスでは、脳以外にも、心臓、肺、卵巣、精巣、前立腺でバンドが検出された。特に、精巣では脳に次いで明確なバンドが見られ、特に Gas7b の割合が多かった。また、心臓と肺では、脳の Gas7b と比べバンドの位置が完全には一致していなかった。

KO マウス脳では、Gas7b のバンドが消失し、Gas7a のみとなり、KO マウス精巣では、Gas7b が消失した代わりに Gas7a の発現が見られた。心臓、肺で見られたバンドは、KO マウスでも消失していなかった。

6-3 週齢別発現解析

週齢別の WT マウス (Newborn (1 週齢以内)、Young (約 4 週齢)、Adult (約

27 週齢)) について、脳を採取し、Western blotting により Gas7 タンパク質の発現を解析した (Fig.13-B)。その結果、Gas7 タンパク質の発現は「Young」マウス以降で上昇しており、その変化は特に Gas7a で顕著であった。

6-4 考察

組織別発現解析 [6-2] から、Gas7 タンパク質は、よく知られている脳以外の臓器でも発現していることが示唆された。心臓、肺で検出されたタンパク質は、KO マウスでも消失しなかったため、WW domain を持たない他のアイソフォームを検出したものであるか、あるいは非特異的なものであるか、慎重に検討する必要がある。

卵巣、精巣、前立腺において検出されたタンパク質は、脳の Gas7b と同じ位置であり、さらに KO マウスで消失した。そのため、これらの組織では脳の Gas7b と同一のタンパク質が発現していると考えられる。このことから、減数分裂といった生殖器系特有の機能に関わる可能性も示唆された。特に、精巣では脳に次いで発現が顕著であるため、非常に興味深い。

また、週齢別マウス脳を解析したところ、特に Gas7a タンパク質で変化が見られた。また、脳においては生後時間が経つにつれタンパク質量が増加する傾向が明らかとなり、「成長」が主な細胞分裂が盛んな生後初期よりも、増殖した細胞が「機能」するために分化・成熟する過程において発現が始まると推測できる。

総合考察

【Gas7b は MT 束化を促進する】

これまで、濁度法の結果から Gas7b が MT 重合促進作用を持つと考えて来た (1, 2)。しかしながら、DAPI 蛍光法および共沈降実験から、Gas7b は MT の“数”や“長さ”を増加させないことが示された。続く PTX-MT を用いた濁度法、暗視野顕微鏡、EM 観察から、Gas7b 存在下で複数の MT が互いに接着・束化し、太い繊維が形成されていることが新たに明らかになった。このとき Gas7b は MT の表層・繊維同士の接着部に局在していた。

このことから、Gas7b は MT の表層に結合し、束化する作用を持つことが示された。同時に、濁度法は MT 重合評価法として一般的ではあるが、それ以外の変化（束化等）を捉える可能性もあり、他の解析方法（DAPI 蛍光法、顕微鏡観察等）と組み合わせることでより詳細で確実な情報が得られると考えられる。

【Gas7b は MT と F-actin を架橋する】

PTX-MTs を F-actin、Gas7b と混合し EM で観察したところ、MT と F-actin が互いに接着されることが明らかとなった。また、pull down 解析と BN-PAGE から、Gas7b と tubulin あるいは G-actin との結合には F-BAR domain が重要であること、Gas7b 自身がオリゴマーを形成していることも発見した。これは、F-BAR domain によりテトラマー化することが知られている PACSIN 1 と類似した特徴でもある (28)。

また、ゲルろ過から Gas7b、tubulin、actin は水溶液中で三者複合体を形成する可能性が示された。これらの結果から、Gas7b は、オリゴマー化することで複数の機能サイト (MTs (tubulin) あるいは F-actin (actin) との結合サイト = F-BAR domain) をもつアダプター分子となる可能性を提示する。そのため、Gas7b のオリゴマー形成は、ホモあるいはヘテロな細胞骨格繊維の束化・接着に非常に重要であると考えられる。

【Gas7b は dendrite 形成に関連する】

神経細胞成熟は、未成熟な神経突起の形成、axon 形成（極性獲得）、dendrite 形成、さらなる elongation（伸長）と branching（枝分かれ）、という段階的な変化をたどる (29)。そのため、dendrite（スパイン）形成は、顆粒細胞から神経細胞への分化において非常に重要な成熟過程である。Gas7b が発現していない Neuro 2A 細胞は、“未成熟な神経突起の形成” ステージには進んでいるが、その先の形態変化は見られない。しかしながら、Gas7b 高発現細胞では、明確な axon 形成は無いものの、“denrite 形成”、“branching” ステージに類似した形態変化が促されることが明らかとなった。

Microtubule-associated protein 2 (MAP2) は dendrite のマーカータンパク質である。MAP2 高発現細胞は、NOC に抵抗性を持つ (30, 31)。MAP2 は、MT を中間径フィラメントや他の MT に架橋することで、MT 伸長を安定化することが知られている。これらの機能は今回発見された Gas7b の機能に類似している。dendrite 様突起や filopodia 形成において、F-actin は dendrite のシャフト部の MT 上あるいは MT 枝分かれ部分に存在する (32)。そのため、MT-F-actin 架橋因子は filopodia 形成に深く関わる可能性がある (33)。したがって、Gas7b 介在、複数本の MT 繊維あるいは MT-F-actin の束化は、細胞形態変化、特に dendrite 形成に極めて重要であると結論づけた (Fig. 14)。

【Gas7b の生物学的存在意義】

本研究の結果から、Gas7b は、MT と F-actin の両者に作用することが示された。したがって、「細胞骨格構造」を機械的・物理的に制御するタンパク質であると考えられる。MT と F-actin の相互作用は、前述した神経細胞成熟だけでなく、actin ベースの細胞運動調整にも必要であると考えられている (34, 35)。

以前の研究で、我々は Gas7b が AD 患者脳内において激減していることを示した。それに加え、本研究では Gas7b レベルの減少が、MT-MT あるいは MT-F-actin の架橋構造の減少・弱体化を介し、神経細胞の成熟過程を遅延させる可能性を示した。今後、Gas7b は AD を初めとする神経変性疾患治療確立に対

し、“細胞骨格構造制御”を基盤とした“神経細胞成熟”という観点からアプローチするための、新たなターゲットとなり得る。

さらに、Gas7 タンパク質は、脳だけでなく生殖器系組織でも発現していることが示唆され、その存在意義は非常に興味深い。

また、マウス脳の Gas7 タンパク質発現量は、出生後から時間が経るにつれ増加する傾向があり、特にその変化は Gas7a で顕著であった。「脳の成長・成熟」と「Gas7 タンパク質の発現量」の関連性については、結論に至るだけの十分な結果がまだ得られていないが、今後検討すべき重要な点である。

将来的には、“細胞骨格構造制御”メカニズムや関連因子の機能解明という、細胞性科学の基礎研究における発展も期待される。

参考文献

1. Uchida, T., Akiyama, H., Sakamoto, W., Koga, T., Yan, K., Uchida, C., Hirose, K., and Itoh, T. J. (2009) Direct optical microscopic observation of the microtubule polymerization intermediate sheet structure in the presence of gas7. *J. Mol. Biol.* **391**, 849–57
2. Akiyama, H., Gotoh, A., Shin, R.-W., Koga, T., Ohashi, T., Sakamoto, W., Harada, A., Arai, H., Sawa, A., Uchida, C., and Uchida, T. (2009) A novel role for hGas7b in microtubular maintenance: possible implication in tau-associated pathology in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 32695–9
3. Hidaka, M., Koga, T., Gotoh, A., Sanada, M., Hirose, K., and Uchida, T. (2012) Alzheimer's disease-related protein hGas7b interferes with kinesin motility. *J. Biochem.* **151**, 593–8
4. Squire, L. R., and Zola-Morgan, S. (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* **253**, 1380–6
5. Bouslama-Oueghlani, L., Wehrlé, R., Doulazmi, M., Chen, X. R., Jaudon, F., Lemaigre-Dubreuil, Y., Rivals, I., Sotelo, C., and Dusart, I. (2012) Purkinje cell maturation participates in the control of oligodendrocyte differentiation: role of sonic hedgehog and vitronectin. *PLoS One* **7**, e49015
6. Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G.-L., and Gage, F. H. (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **26**, 3–11
7. Stopa, E. G., Gonzalez, A. M., Chorsky, R., Corona, R. J., Alvarez, J., Bird, E. D., and Baird, A. (1990) Basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 690–6
8. Hock, C., Heese, K., Hulette, C., Rosenberg, C., and Otten, U. (2000) Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels

- of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch. Neurol.* **57**, 846–51
9. Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C., and Greenberg, D. A. (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 343–7
 10. Li, B., Yamamori, H., Tatebayashi, Y., Shafit-Zagardo, B., Tanimukai, H., Chen, S., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2008) Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67**, 78–84
 11. Alberts, B. (2002) *Molecular Biology of the Cell.*
 12. Bhat, K. M. R., and Setaluri, V. (2007) Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2849–54
 13. Ju, Y. T., Chang, a C., She, B. R., Tsaur, M. L., Hwang, H. M., Chao, C. C., Cohen, S. N., and Lin-Chao, S. (1998) gas7: A gene expressed preferentially in growth-arrested fibroblasts and terminally differentiated Purkinje neurons affects neurite formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11423–8
 14. Chao, C. C.-K., Su, L.-J., Sun, N.-K., Ju, Y.-T., Lih, J. C.-J., and Lin-Chao, S. (2003) Involvement of Gas7 in nerve growth factor-independent and dependent cell processes in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **74**, 248–54
 15. Lortie, K., Huang, D., Chakravarthy, B., Comas, T., Hou, S. T., Lin-Chao, S., and Morley, P. (2005) The gas7 protein potentiates NGF-mediated differentiation of PC12 cells. *Brain Res.* **1036**, 27–34
 16. Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X. Z., Davies, P., and Lu, K. P. (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399**, 784–8
 17. Ramjaun, A. R. (1999) The N Terminus of Amphiphysin II Mediates Dimerization and Plasma Membrane Targeting. *J. Biol. Chem.* **274**, 19785–19791

18. Lippincott, J., and Li, R. (1998) Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution. *J. Cell Biol.* **143**, 1947–60
19. Greer, P. (2002) Closing in on the biological functions of Fps/Fes and Fer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 278–89
20. She, B.-R., Liou, G.-G., and Lin-Chao, S. (2002) Association of the growth-arrest-specific protein Gas7 with F-actin induces reorganization of microfilaments and promotes membrane outgrowth. *Exp. Cell Res.* **273**, 34–44
21. Karr, L., White, D., and Sci, U. S. A. (1979) Characterization of Brain Removal of Mitochondrial Microtubule Proteins Prepared and Synaptosomal Components * tissue in a sucrose medium H2P C2S H3P To understand the regulation of microtubule Tbn -. **254**, 6107–6111
22. Castoldi, M., and Popov, A. V (2003) Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* **32**, 83–8
23. Gaskin, F., Cantor, C. R., and Shelanski, M. L. (1974) Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J. Mol. Biol.* **89**, 737–55
24. Bonnes, D., Simon, C., and Pantaloni, D. (1985) A Fluorescent Probe for Tubulin and Microtubules. *J. Biol. Chem.* **260**, 2819–2825
25. Heusele, C., Bonne, D., and Carlier, M. F. (1987) Is microtubule assembly a biphasic process? A fluorimetric study using 4',6-diamidino-2-phenylindole as a probe. *Eur. J. Biochem.* **165**, 613–20
26. Noguchi, T. Q. P., Kanzaki, N., Ueno, H., Hirose, K., and Uyeda, T. Q. P. (2007) A novel system for expressing toxic actin mutants in Dictyostelium and purification and characterization of a dominant lethal yeast actin mutant. *J. Biol. Chem.* **282**, 27721–7

27. Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223–231
28. Halbach, A., Mörgelin, M., Baumgarten, M., Milbrandt, M., Paulsson, M., and Plomann, M. (2007) PACSIN 1 forms tetramers via its N-terminal F-BAR domain. *FEBS J.* **274**, 773–82
29. Dotti, C. G., Sullivan, C. A., and Banker, G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **8**, 1454–68
30. Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., Cowan, N. J., and Hirokawa, N. (1992) Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J. Cell Sci.* **103** (Pt 4), 953–64
31. Lewis, S. A., Ivanov, I. E., Lee, G. H., and Cowan, N. J. (1989) Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Nature* **342**, 498–505
32. Korobova, F., and Svitkina, T. (2010) Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **21**, 165–76
33. Hotulainen, P., and Hoogenraad, C. C. (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* **189**, 619–29
34. Bershadsky, A. D., Vaisberg, E. A., and Vasiliev, J. M. (1991) Pseudopodial activity at the active edge of migrating fibroblast is decreased after drug-induced microtubule depolymerization. *Cell Motil. Cytoskeleton* **19**, 152–8
35. Vasiliev, J. M. (1991) Polarization of pseudopodial activities: cytoskeletal mechanisms. *J. Cell Sci.* **98** (Pt 1), 1–4

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御教示を賜りました、東北大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 分子酵素学研究室 内田隆史 教授に甚大なる謝意を表します。

本論文をまとめるにあたり、多くの御助言を賜りました本研究室・日高將文 助教、EM 観察技術に関して基礎からの細やかな御指導を賜りました産業総合研究所セルメカニクス研究グループ・広瀬恵子 先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の審査過程において、数々の貴重な御教示を賜りました西森克彦 教授、種村健太郎 准教授、藤井智幸 教授、金子淳 准教授、早川俊彦 准教授に厚く御礼申し上げます。

試料を提供して頂きました本学・渡邊康一 助教、産業総合研究所産業総合研究所セルメカニクス研究グループの皆様に感謝申し上げます。

また、研究材料の取得やデータ収集の面で多くのサポートをしてくれた藤田彩子さん、清水泰希君、乗田理恵さん、金井研太君、小坂啓太君、そして日々の研究生活を充実したものにしてくれた研究室の後輩たちに感謝申し上げます。

最後に、学部から大学院までの長い研究生活を常に暖かく見守り、応援し、多くの面で支えてくれた両親と弟にこの場を借りて心より御礼申し上げます。