

提出日:2023 年 4 月 28 日

2022 年度 Bio-SPM 技術共同研究事業

研究成果の概要

実験課題名		GAP-43 リン酸化と構造変化	
申請者 (実験責任者)	氏名	五十嵐 道弘	
	所属機関名・部局名	新潟大学医歯学系(医学部)	
	職名	教授	
利用した Bio-SPM 技術 (該当の技術の右欄に○)			超解像 AFM(FM-AFM 及び、3D-AFM)
		○	高速 AFM
			SICM
NanoLSI 受入担当教員名		教授 古寺 哲幸	
<p>代表者は脳の神経回路の分子形成機構を解析しており、中でも発達期脳の神経細胞の突起先端に形成される、運動性に富んだ構造体である成長円錐 (growth cone) の機能的分子基盤を解析している 1)。</p> <p>GAP-43(neuromodulin)は脊椎動物の神経特異タンパク質で、神経成長・軸索再生時に発現が上昇するため、神経成長の実働部隊となるタンパク質の中核的な分子と推測される。代表者はリン酸化プロテオミクスで成長円錐タンパク質の高頻度リン酸化部位を解析した結果、GAP-43 の 3 か所が高頻度リン酸化を受けており、これらのリン酸化特異抗体が成長円錐の分子マーカーとなることを確立した。一方、この分子の KO マウスは顕著な表現型が神経系で生じておらず、出生後直ちに死ぬため、分子レベルの意義は解明されていない。近年、天然変性タンパク質(IDP)または天然変性領域(IDR)の概念が明確となってきたが、GAP-43 は IDR に富み、上記のリン酸化部位もこの中にある。よってこの分子の意義は IDR にあり、高速 AFM で可視化することで IDR の特徴を直接解析し、この分子の神経成長への役割を理解できると考えた。</p> <p>この分子は脳からの精製でしか主な性状が解析されておらず、組換え体を用いて種々の性質を解析した研究は非常に少ない。Sf9 系で EGFP-GAP-43 の発現系を確立し、1) 非リン酸化型(Sf9 細胞で発現後にアルカリホスファターゼ処理を行ったもの)、2)リン酸化型(1)を活性化 JNK で in vitro リン酸化したもの)を作成して、昨年度、高速 AFM を使った古寺教授との共同研究として、検討を行った。その結果、以下の 2 点が確認できた。</p> <p>① EGFP 部分が球状に、それに連結された GAP-43 部分が紐状に可視化され、非常に柔軟な構造として撮像されたため、GAP-43 は IDR に富む構造であることが実証された</p> <p>② 非リン酸化型とリン酸化型は構造が異なり、前者はより伸展した構造、後者はより折れ曲がった構造として可視化されたため、リン酸化による構造変化が定量的に確認された</p> <p>上記の結果から、本設備利用の有用性が明確に証明された。</p>			

※本様式 3 は、“事業成果報告”として、ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限:2023 年 5 月 8 日(月) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先:金沢大学 WPI-NanoLSI Bio-SPM 技術共同研究事業担当係 E-mail: nanolsi_openf01@ml.kanazawa-u.ac.jp