



ラット脳由来細胞膜微小領域構成分子の同定と解析

田口, 勝敏

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Date of Publication)

2009-05-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3939

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003939>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士学位論文

ラット脳由来細胞膜微小領域構成分子の同定と解析

平成 19 年 1 月

自然科学研究科 生命機構科学専攻

田口 勝敏 (029D864N)

目 次

要 旨	3
略 語	7
序 論	9
本 論	
第 1 章：アクチン繊維と相互作用する微小領域構成分子の同定	
1-1：緒 言	12
1-2：材料と方法	12
1-3：結 果	16
1-4：考察（小括 1）	22
第 2 章：微小領域における Na^+ , K^+ -ATPase の同定と解析	
2-1：緒 言	24
2-2：材料と方法	24
2-3：結 果	26
2-4：考察（小括 2）	30
第 3 章：モノクローナル抗体を用いた微小領域構成分子の同定と解析	
3-1：緒 言	33
3-2：材料と方法	33
3-3：結 果	36
3-4：考察（小括 3）	42
まとめ（総括）	45
謝 辞	47
参考文献	48
発表論文	55

要 旨

細胞膜はタンパク質と脂質から構成される機能複合体である。その構造は、流動モザイクモデルとして広く認知されてきた。しかしながら、近年になって細胞膜が不均一な脂質分子の集合を有すること、即ち特定の脂質から構成される膜領域が存在することを示す知見が集積してきた。この膜領域は“微小領域（マイクロドメイン）”や“脂質ラフト”と呼ばれ、スフィンゴ脂質とコレステロール(Chl)に富み、これに親和性を有する様々な膜タンパク質との複合体として報告されている。微小領域の生化学分画はその構成脂質の特性に依存している。即ち、非イオン性界面活性剤に不溶性で、かつ低比重な膜画分

(detergent-resistant low-density membrane fraction: DRM 画分) が微小領域画分に対応すると考えられている。この分画は秩序液体相 (liquid ordered phase) を形成する微小領域構成脂質を、それを取り囲む無秩序液体相 (liquid disordered phase) から分離する過程とみなされる。非イオン性界面活性剤処理によって小胞状に集合した微小領域クラスターと、これに親和性を有する様々なタンパク質分子が低比重画分に回収される。このようにして調製された DRM 画分には、シグナル伝達に関わる分子や細胞接着因子、細胞骨格関連タンパク質が豊富に含まれており、微小領域が細胞膜を介した情報伝達の機能素子と考えられる理由の一つになっている。また imaging 技術の向上により、微小領域を可視化することが可能になりつつある。このことは、微小領域が生細胞で機能し得る‘生きたドメイン’であることを強く支持している。

さて、脳はその神経支配による末梢器官の制御のみならず、記憶や学習など生体高次機能を担う中枢器官である。脳機能の発現は、それを構築する神経細胞とグリア細胞間相互における情報伝達の結果である。また脳の特徴の一つとして、非常に発達した膜構造を有することが挙げられる。神経細胞は細胞体、樹状突起、軸索から構築され、それぞれが情報の伝達機能を担うに適した形態を有し、その細胞膜を高度に極性化させている。情報の入出力は主にシナプス伝達とその効率の修飾によって行われる。シナプス伝達のみならず、神経機能の修飾や調節にグリア細胞が関与することが明らかとなっており、ある種のグリア細胞もまた細胞膜を複雑に分化させる。つまり、脳が有する複雑な膜構造は、その高度な情報伝達を可能にしており、細胞膜の解析は脳機能を理解する手段の一つである。細胞膜微小領域は神経細胞とグリア細胞、各々の膜機能の素過程を担うドメインと考えられているが、多彩な細胞機能への関与について未だ不明である点が多い。

本研究では、“細胞膜の解析を通して脳機能の分子メカニズムを解明する”ための第一歩として、ラット脳由来細胞膜微小領域を構成する分子の同定と解析

を以下の3つのアプローチにより行った。

- ① アクチン繊維と相互作用する微小領域構成分子の同定
- ② 微小領域に存在する Na^+ , K^+ -ATPase の同定と解析
- ③ モノクローナル抗体を用いた微小領域構成分子の同定と解析

微小領域を構築する因子を同定することで、微小領域が関与する細胞機能を知ると共に、その後の情報伝達過程を解明する手掛かりを得ることができる。

《① アクチン繊維と相互作用する微小領域構成分子の同定》

アクチン繊維は細胞形態の維持・調節とその可塑性発現に重要な細胞骨格の一つである。脳を構築する細胞は形態が複雑であり、その形成と刺激に応じた形態制御にアクチン繊維は不可欠である。界面活性剤で可溶化処理を施した膜画分に含まれるアクチンを重合させて繊維構造を再構築し、これに結合する分子群を回収した。これらの分子群から微小領域構成分子を探索した結果、2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)、proteolipid protein (PLP)、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) を検出することができた。これらのタンパク質はいずれも中枢ミエリンを構築するオリゴデンドロサイトのマーカータンパク質である。更に、これらの分子について、精製したアクチン繊維に対する結合性を比較することによって、その相互作用様式がそれぞれの分子で異なることを明らかにした。また、培養オリゴデンドロサイトを用いた局在解析により、これらのタンパク質がアクチン繊維と共局在し、その一部は界面活性剤に不溶性であることを確認した。以上の結果は、中枢ミエリンの形成に微小領域とアクチン繊維の相互作用が関与することを示している。本法はまた、今後、細胞膜からアクチン繊維と相互作用する分子を探索・解析するための有効な手段である。

《② 微小領域における Na^+ , K^+ -ATPase の同定と解析》

シナプス膜由来微小領域画分を可溶化後、カラムを用いて分画し、質量分析法によって主な構成分子を同定した。その過程において、非常に高い再現性で Na^+ , K^+ -ATPase α サブユニットの存在を検出した。ラットでは α サブユニットには4つのアイソフォームが存在するが、脳内では $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、及び $\alpha 3$ アイソフォームが発現している。グリア細胞は $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ アイソフォームを発現しているが、神経細胞では $\alpha 1$ 及び $\alpha 3$ アイソフォームの発現が報告されている。 Na^+ , K^+ -ATPase は細胞膜の主要な ATPase であるが、微小領域には回収されないとみな

されていた。しかしながら、微小領域における局在に再現性が得られたこと、微小領域画分を繰り返し界面活性剤で可溶化処理した後も不溶性であったことから、シナプス膜における Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットの一部は微小領域構成分子であると判断した。ウアバインは Na^+, K^+ -ATPase 特異的活性阻害剤であるが、最近、生体内にウアバイン様生理作用物質が存在すること、また α サブユニットがこのウアバイン様生理作用物質の受容体としてシグナル伝達に関わると報告されている。そこで、ウアバイン刺激依存的な微小領域における α アイソフォームの局在変化について検討したところ、 $\alpha 3$ アイソフォームの経時的な微小領域への移行を観察した。 $\alpha 1$ アイソフォームに有意な局在変化は見られなかった。以上の結果は、シナプス膜において Na^+, K^+ -ATPase が微小領域構成分子であると共に、 $\alpha 3$ アイソフォームの局在変化を通して、ウアバイン様生理作用物質のシグナル伝達に微小領域が深く関与する可能性を示している。

《③ モノクローナル抗体を用いた微小領域構成分子の同定と解析》

微小領域構成分子を同定・解析する際、モノクローナル抗体は非常に有用である。したがって、シナプス膜由来微小領域画分を抗原としてモノクローナル抗体を作製した。その結果、得られた抗体の一つ (18-6D4) が微小領域画分に高い局在性を示す抗原 (18-6D4 抗原) を特異的に認識した。免疫沈降法によって抗原を回収した後、質量分析法及びウエスタンブロッティングによって同定したところ、ホスホリパーゼ $\text{C}\beta 1$ ($\text{PLC}\beta 1$) であることが明らかとなった。 $\text{PLC}\beta 1$ はイノシトール 1,4,5-トリスリン酸とジアシルグリセロールの産生を介してカルシウム/PKC シグナリングに繋がる、細胞内の主要なシグナル伝達経路である。 $\text{PLC}\beta 1$ の微小領域における局在は生後発育過程に当たって上昇した。微小領域における $\text{PLC}\beta 1$ は、2% Triton X-100 (37°Cで 20 分間) 処理によりその一部を可溶化することができたので、この条件を利用して精製を行った。人工脂質膜を用いて精製 $\text{PLC}\beta 1$ の活性を測定したところ、基質となる膜を構成するホスファチジルコリンの増加はその活性を著しく低下させたのに対して、Chl ではその活性に影響は見られなかった。更に、脂質結合性タンパク質 NAP-22 を基質膜に加えるとその活性は低下した。NAP-22 は微小領域を構築する脂質である、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸、Chl に高い結合性を有する。以上の結果は、 $\text{PLC}\beta 1$ が微小領域構成分子であることを見出しただけでなく、その活性が膜構成脂質の組成及び脂質結合性タンパク質の影響を受け得ることを示しており、微小領域における局在がその活性調節に関与する可能性を示唆している。

このように、細胞膜微小領域が細胞骨格を介した形態、特にミエリンの形成

や ATP 依存的なイオン輸送に関与することを見出したと共に、ウアバイン様生理作用物質や脂質を介した情報伝達に深く関与することを示唆する結果を得ることができた。

略 語

ADP: adenosine 5'-diphosphate
AMP: adenosine 5'-monophosphate
ATP: adenosine 5'-triphosphate
Br: Brij96
BSA: bovine serum albumin
CBB: coomassie brilliant blue
CNPase: 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
DAG: diacylglycerol
DEAE column: diethylaminoethyl column
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
DOC: sodium deoxycholate
DRM: detergent-resistant low-density membrane
DTT: dithiothreitol
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR: epidermal growth factor receptor
EGTA: ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) -tetraacetic acid
ERK: extracellular signal-regulated kinase
FCS : fetal calf serum
GAP-43: growth-associated protein-43
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GTP: guanosine 5'-triphosphate
GTP γ S: guanosine 5'-3-O-(thio) triphosphate
HAP column: hydroxyapatite column
HDM: high-density membrane
IgG: immunoglobulin G
IP₃: inositol 1,4,5-trisphosphate
LDM: low-density membrane
Ld 相 : liquid disordered phase
Lo 相 : liquid ordered phase
LTP : long-term potentiation
MBP: myelin basic protein
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MCD: methyl- β -cyclodextrin
MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein

NAP-22: neuronal tissue-enriched acidic protein having a molecular mass of 22kDa
PA: phosphatidic acid
PBS: phosphate-buffered saline
PC: phosphatidylcholine
PDGF: platelet-derived growth factor
PDZ domain: PSD-95/Dlg/ZO-1 homology domain
PSD: postsynaptic density
PE: phosphatidylethanolamine
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PI4K II α : phosphatidylinositol 4-kinase II α
PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC: protein kinase C
PLC: phospholipase C
PLP: proteolipid protein
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SPM: synaptic plasma membrane
Tx: Triton X-100
TxS: Triton X-100 soluble (fraction)

序 論

細胞膜の構造は流動モザイクモデルとして広く認識されてきた (Singer and Nicolson, 1972)。脂質二重層からなる細胞膜に様々なタンパク質が二次元的な広がりをもって流動するというモデルである。脂質は膜タンパク質を支持するマトリックスと見なされていた。近年になり、動物細胞膜にはスフィンゴ脂質とコレステロール (Chl) を豊富に含む膜領域が存在しており、これに親和性を有する様々な機能分子と複合体を形成することによって、細胞機能の発現に深く関与することを示す知見が集積してきた (Brown and Rose, 1992; Simons and Ikonen, 2000; Maekawa et al., 2003)。この領域は“細胞膜微小領域 (Membrane microdomains)”、あるいは“脂質ラフト (lipid rafts)”と呼ばれる。当初、脂質組成による膜の不均質化は人工脂質膜を用いたモデルで解析されていた

(Rietveld and Simons, 1998; London, 2002; Ishizuka and Kobayashi, 2003)。グリセロリン脂質の多くがシス位に配位した不飽和脂肪酸鎖を有するのに対して、スフィンゴ脂質は飽和脂肪酸鎖を有すること、また Chl がスフィンゴ脂質に高い親和性を示すことから、膜中において秩序液体相 (liquid ordered phase: Lo 相) を形成すると考えられた。それに対してグリセロリン脂質はその周囲に不秩序液体相 (liquid disordered phase: Ld 相) を構築し、膜に極性が生じるメカニズムとされた。現在、このモデルが生体膜においても適応できると考えられている。生化学的に微小領域を分画する過程は Lo 相を Ld 相から分離する過程と見なされている。すなわち、非イオン性界面活性剤処理によって小胞状に集合した微小領域クラスターと、これに親和性を有する様々なタンパク質分子が低比重画分に回収される。微小領域画分の多くはこのような過程を経て得られた、界面活性剤不溶性低比重膜画分 (detergent-resistant low-density membrane fraction: DRM 画分) であり、スフィンゴ脂質と Chl に富み、様々な glycosylphosphatidylinositol (GPI)-アンカータンパク質を含む。DRM 画分は微小領域の特性によく対応する生化学画分として認識されている。

微小領域 (DRM 画分) には、細胞間あるいは細胞内情報伝達に関わるシグナル分子や細胞接着因子、細胞骨格関連タンパク質の集積が報告されている

(Simons and Toomre, 2000; Maekawa et al., 2003)。微小領域が膜を介した情報伝達・変換の機能素子とされる理由の一つである。これら機能分子の集積はより効率的でかつ動的な情報伝達と細胞応答を可能にすると考えられている。微小領域に親和性を有する分子には、ミリスチル化やパルミトイル化といった脂質修飾を受けて膜に結合する分子や特定の脂質分子を認識して膜に結合する分子も知られている (Terashita et al., 2002)。膜貫通型タンパク質の局在も報告されているが、その局在機構に関しては不明な点が多い。細胞膜中の微小領域への

多様な親和性が様々な機能分子の集積を可能にすると考えられる。

更に、微小領域はエンドサイトーシスやエキソサイトーシスといった膜サイクリングの場として重要であるだけでなく、ウイルスの侵入過程に関与することが明らかとなったことで、病原体感染メカニズムの解明においても注目されている (Kirkham and Parton 2005; Pelkmans, 2005)。また、プリオン病の原因分子であるプリオンタンパク質も微小領域に局在する (Sakasegawa et al., 2003)。感染症の他にも、微小領域はアルツハイマー病の発症に深く関与すると考えられている (Sakurai and Nukina, 2003)。アルツハイマー病の発症に重要な役割を果たすアミロイドβペプチドが産生される過程で、その前駆体タンパク質とプロセッシングを担うタンパク質は微小領域に局在することが知られている。

さて、脳は主に神経細胞とグリア細胞から構築されるが、両者とも非常に複雑な膜構造を有しており、それぞれの機能を反映している。神経細胞は細胞体、樹状突起、軸索から構成される。その情報の入出力は主としてシナプスによって行われる。記憶や学習といった脳の高次機能はシナプス伝達とその効率の修飾に起因すると考えられている。海馬における長期後増強 (long-term potentiation: LTP) はその一例で、刺激依存的な伝達効率の可塑的変化が高次機能を実現するメカニズムの一つであると見なされており (Bliss and Collingridge, 1993)、同様に海馬において、特定の神経細胞の興奮がシナプス後肥厚の拡大やスパインにおける concave formation といった、刺激依存的な形態学的変化を引き起こすことが知られている (Desmond and Levy, 1986a, b)。刺激に依存した迅速な形態学的変化に細胞骨格、特にアクチン繊維とその調節因子が関与することは広く知られている。細胞骨格関連タンパク質は微小領域を構成する主要な分子であり、細胞の極性化やその維持、運動性等に幅広く関与している (Meivar-Levy et al., 1997; Manes et al., 1999; Gomez-Mouton et al., 2001)。

シナプス伝達過程における主要な膜機能の一つとして、細胞膜イオン環境の恒常性維持が挙げられる。膜の興奮 (脱分極) と再分極はナトリウムイオンの細胞内流入とカリウムイオンの細胞外流出といった、一連のイオンの流れによって引き起こされる。脱分極後の回復過程では、ナトリウムイオンの排出とカリウムイオンの取り込みが行われる。この作業は ATP 依存性イオン輸送体、 Na^+ , K^+ -ATPase が担っている。 Na^+ , K^+ -ATPase は細胞膜に存在する主要な ATPase である。しかしながら、その微小領域との関係は不明である点が多い。またこれに留まらず、微小領域の構築とその分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていないのが現状である。

本研究では、脳の機能構築を解明する第一歩として、細胞膜、特にその機能ドメインである微小領域構成分子の同定と解析を行った。微小領域構成分子を同定することにより、その領域が関与する細胞機能を知ると共に、その詳細な

分子メカニズム、情報伝達過程を解明する手掛かりを得ることができると考えた。

本論第1章では、アクチン繊維と相互作用する微小領域構成分子の同定について論じる。膜画分からのアクチン結合性タンパク質の分離法を確立すると共に、同定した分子とアクチン繊維の結合性について検討した。また、培養オリゴデンドロサイトを用いた局在解析を行った。

第2章では、ATP依存性イオン輸送体に着目した。質量分析法によりシナプス膜由来微小領域画分構成分子を同定する過程において、 Na^+ , K^+ -ATPaseの存在を見出した。 Na^+ , K^+ -ATPaseは他組織や培養細胞を用いた系では非DRM分子として認識されていたが、シナプス膜においてはその一部がDRMに局在した。また、神経細胞に発現する α アイソフォームのウアバイン刺激依存的な局在変化について検討した。酵素活性と共に、そのDRM局在の意義について考察する。

第3章では、モノクローナル抗体を用いた微小領域構成分子の同定と解析について述べる。シナプス膜由来DRM画分を抗原としてマウスに免疫することによってモノクローナル抗体を作製した。その結果、微小領域画分に豊富に局在する抗原を見出し、これをホスホリパーゼC β 1 (phospholipase C beta1: PLC β 1)と同定した。微小領域におけるPLC β 1の生理機能について考察する。

第1章：アクチン繊維と相互作用する微小領域構成分子の同定

1-1：緒言

アクチン繊維は細胞の形態を制御する細胞骨格である。アクチン繊維を制御する因子は数多く知られており、その一部は微小領域に局在する (Holowka et al., 2000; Funatsu et al., 2000; Kumanogoh et al., 2001)。例えば、アクチン繊維制御因子である gelsolin は F-actin を切断することで、アクチン繊維の脱重合を促進する。DRM 画分においてカルシウム依存的にアクチン繊維の重合活性を阻害する性質が見出され、gelsolin が微小領域構成分子として同定された (Funatsu et al., 2000)。また、細胞の形態と運動性におけるアクチン繊維の制御について、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの関与が知られている (van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997; Hall, 1998; Aspenstorem, 1999)。Rho ファミリーの上流にはグアニンヌクレオチド交換因子が存在し、Rho はストレスファイバー、Rac は膜ラフリング、Cdc42 はフィロポディアの形成を制御する。この内、Rac1 が微小領域に高い局在性を示す (Kumanogoh et al., 2001)。そこで、アクチン繊維の制御に関わる微小領域構成分子を網羅的に分離する方法を確立し、その同定を試みた。これまでに、幼若脳由来可溶性画分に含まれるアクチンを重合させて、これと共沈降する分子を（その脱重合後に）分離することによって、効率よく結合分子を回収する方法が存在した (Maekawa and Sakai, 1988)。しかしながら、この方法は可溶性画分のみ適用されていた。そこで、この方法に改良を加え、界面活性剤によって可溶化処理を施したラット成熟脳由来膜画分に適用した。アクチン繊維と共沈降した膜を含む画分から DRM 画分を調製することにより、アクチン繊維結合性微小領域構成分子を分離した。得られた分子を同定した結果、オリゴデンドロサイトマーカータンパク質である、2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)、proteolipid protein (PLP)、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) であることが判明した。更に、これらの分子についてアクチン繊維への結合様式を比較・検討した。

1-2：材料と方法

1-2-1：アクチン重合体の調製と DRM 分画

実験動物は2週齢ラット (Wistar rat) を用いた。ジエチルエーテルによる麻酔後、脳を摘出した。摘出した脳はすぐさま氷冷した等張 (塩化ナトリウムによる) リン酸緩衝液 (Phosphate-buffered saline: PBS) に浸漬した。以後、特に言及しない限り、全ての操作は氷上、もしくは4°C環境下で行った。脳を剪刀で切り刻み、これを等容 (weight/volume) のアクチン重合用緩衝液 (ゲル化緩衝液: 40 mM HEPES-KOH, 0.5 mM ATP, 1 mM EDTA, 10 mM 2-メルカプトエタノール,

1mM フッ化フェニルメチルスルフォニル (phenylmethanesulfonyl fluoride: PMSF), pH7.4) で懸濁後、モーター駆動式テフロンホモジェナイザーによって破碎した。破碎液を 100,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行い、上清を可溶性画分 (CS) として回収した。不溶性画分は等容のゲル化緩衝液 (0.5% Triton X-100 を含む) で懸濁後、ホモジェナイザーで破碎した。この破碎液を 20,000 xg で 30 分間の遠心分離を行い、その可溶化上清 (TS) 及び Triton X-100 不溶性画分 (TP) をそれぞれ回収して、氷上に保存した。アクチンを再重合させるために、CS 画分と TS 画分を 25°C で 30 分間保温すると共に、時折攪拌した。アクチンをゲル化させた後、10,000 xg で 10 分間の遠心分離を行って、非ゲル化上清 (GS) とゲル化沈降画分 (GP) に分離した。GP 画分を再度、3 倍容のゲル化緩衝液 (0.5% Triton X-100 を含む) で懸濁した後、20,000 xg で 20 分間の遠心分離を行い、これを沈殿させて回収した。次に、得られた GP 画分を脱重合緩衝液 (ゾル化緩衝液: 2 mM Tris-HCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 1mM PMSF, pH7.4) で懸濁した後、同緩衝液で一晩透析した。透析後、100,000 xg で 60 分間の遠心分離を行い、上清 (Tx-actin 画分) と沈殿 (GPP 画分) をそれぞれ回収した。GPP 画分は 0.5% Triton X-100 を含む TME 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, pH7.4) で懸濁後、ホモジェナイズした。TP, GS, GPP それぞれの画分から DRM 画分を調製するために、終濃度 0.8 M となるようショ糖を添加しよく混合した。この懸濁液に TME 緩衝液を重層して 250,000 xg で 120 分間の密度勾配超遠心分離を行った (HITACHI SS55S swing rotor, Tokyo, Japan)。TME-0.8M ショ糖間に回収される A1 画分を DRM 画分として、遠心管底部の高比重膜画分を A3 画分 (Triton 不溶性高比重膜画分) として回収した。それぞれの画分は TME 緩衝液で懸濁した後、200,000 xg で 30 分間の遠心分離によって再び回収した後、以下の実験に用いた。

1-2-2 : ミエリン膜画分とシナプス膜画分の分離

ミエリン膜とシナプス膜の分離は、Jones and Matus による方法に従って行った (Jones and Matus, 1974)。脳を摘出して剪刀で切り刻んだ後、ショ糖緩衝液 (0.3M ショ糖, 5 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF, pH7.4) でホモジェナイズした。この液を 1,000 xg で 10 分間の遠心後、上清を回収した。沈殿は再度ショ糖緩衝液中にてホモジェナイズし、1,000 xg で 10 分間の遠心後、再びその上清を回収した。得られた上清は混合して、20,000 xg で 20 分間の遠心分離を行った。沈殿は粗シナプトソーム画分であり、これをもとにミエリン膜画分とシナプス膜画分を分離した。ショ糖緩衝液で懸濁後、再度 20,000 xg で 20 分間の遠心分離を行って洗浄した。これを浸透圧破碎 (10 倍容の超純水 (1mM PMSF, 0.1% aprotinin を含む) でホモジェナイザーによる破碎後、30 分間攪拌した) 後に、25,000 xg で 30 分

間の遠心分離を行った。沈殿を 5 mM Tris-HCl, pH7.4 に懸濁後、終濃度 1.1M ショ糖を添加した。これを遠心管最下部に入れて、更にその上に 0.8 M、0.3 M ショ糖液 (5 mM Tris-HCl, pH7.4 を含む) を重層し、70,000 xg で 120 分間の密度勾配超遠心分離を行った (HITACHI SW27-2 rotor, Tokyo, Japan)。ミエリン膜は 0.3-0.8 M 間に、シナプス膜は 0.8-1.2 M 間に分画される。これを回収した後、5 mM Tris-HCl, pH 7.4 にて懸濁後、100,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行い、沈殿を回収した。

1-2-3 : ミエリン膜からの DRM 分画

ミエリン膜を TME 緩衝液で懸濁、終濃度 1% Triton X-100 を添加してこれをホモジェナイザーで破碎した。破碎液を 100,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行った後、可溶化上清を TS 画分、Triton X-100 不溶性画分を TP 画分として回収した。TP 画分を TME 緩衝液 (1% Triton X-100 を含む) にて再び破碎後、終濃度 0.8 M ショ糖を添加した。この画分から上述 (1-2-1) と同様にして、A1 (DRM) 画分及び A3 画分を回収した。

1-2-4 : ミエリン膜由来 DRM 画分の可溶化とアクチン重合体の調製

ミエリン膜由来 DRM 画分 (2 mg/ml) を TME 緩衝液 (1% Triton X-100 と 1 M NaCl を含む) 中で破碎後、37°C で 30 分間保温した。可溶化後、100,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行った。可溶化上清を TME 緩衝液 (0.1M NaCl を含む) にて透析後、更に 100,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行った。この上清をミエリン膜由来 DRM 可溶化画分として以下の実験に用いた。アクチンの重合は、TMEN 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 M NaCl, pH 7.4) を用いて行った。ミエリン膜由来 DRM 可溶化画分に Tx-actin 画分 (1-2-1 参照)、あるいは精製 G アクチンを添加した後、37°C で 20 分間保温した。重合後、100,000 xg で 20 分間の超遠心分離後、沈殿は上清の半分容の TMEN 緩衝液で懸濁、破碎した。上清と沈殿、それぞれの画分を等容用いて SDS-PAGE、あるいはウエスタンブロットティングによって分析・比較した。尚、本実験で用いた G アクチンは、ウサギ骨格筋から Spudich and colleagues の方法に遵ってゲル濾過により精製したものを用了 (Spudich et al., 1971)。

1-2-5 : オリゴデンドロサイトの培養

オリゴデンドロサイトは脳皮質から調製した (McCarthy and de Vellis, 1980; Dyer and Benjamins, 1989; Gard and Pfeiffer, 1989; Böglér and Noble, 1994; Nakai et al., 2000)。トリプシンによって分散させた脳皮質由来細胞を 10% 牛胎児血清 (fetal calf serum: FCS) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified

Eagle's medium: DMEM) にて培養した。この時、用いた T-フラスコには前もってポリリシンコーティングを施した。10 日前後で、オリゴデンドロサイト前駆細胞とミクログリアがアストロサイト周辺に存在するのが観察できるようになった。ミクログリアを除去するために、DMEM 中 (10% FCS と 50 mM L-ロイシンメチルエステルを含む) で振とう (140rpm で 30 分間) した。その後、フラスコ底面の細胞層を PBS で洗浄した。残った細胞はトリプシンで再び細胞を分散・回収した後、DMEM (0.1% FCS と 10 ng/ml 血小板由来成長因子

(platelet-derived growth factor: PDGF) を含む) で培養を継続した。約 3 週間後、成熟オリゴデンドロサイトに特徴的なシート状の膜を広げた様子が確認できたので、これを免疫細胞化学による解析に用いた。

1-2-6 : 免疫細胞化学

2 種類の方法を用いて免疫染色を行った。

《方法 A》

細胞を 3%パラホルムアルデヒドと 0.1%グルタルアルデヒドの混合固定液にて細胞を固定した (氷上で 60 分間)。PBS で洗浄した後、50 mM glycine を含む PBS にて細胞を処理した。細胞を 0.1% Triton X-100 を含む PBS にて処理した後 (氷上にて 15 分間)、脂質除去処理を施したヤギ血清 (5%) と牛血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) (0.1%) を含む PBS にてブロッキング処理を行った。その後、一次抗体処理は一晩 (4°C) 行った。一次抗体には、オリゴデンドロサイト特異的に発現するタンパク質 (CNPase、MOG、PLP) に対する抗体を用いた (以下を参照)。抗体処理後、PBS で洗浄した。一次抗体を検出するための二次抗体として、Alexa-488 標識抗 immunoglobulin G (IgG) 抗体 (Molecular Probe, OR, USA) を用いた (一次抗体によって抗マウス IgG、あるいは抗ウサギ IgG 抗体を選択した)。二次抗体処理と同時に、テキサスレッド標識ファロイジン (Molecular Probe, OR, USA) によりアクチン繊維を、またフィリピン複合体 (5 μ g/ml; Sigma, MO, USA) によりコレステロールを染色した (4°C で 120 分間)。二次抗体処理後、PBS で繰り返し洗浄した。

《方法 B》

生細胞を 0.1% Triton X-100 を含む HMEN 緩衝液 (5 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.14 M NaCl, pH6.8) で処理した (氷上で 15 分間)。Triton X-100 による可溶化後、PBS で細胞を洗浄した。その後は方法 A と同様に固定して、染色過程を行った。方法 B は微小領域が Triton X-100 不溶性であることから、生細胞を処理することによって得られた免疫反応は微小領域における局在を反映すると考えられている。

染色後、細胞は Vectashield (Vector Laboratory, CA, USA) にて封入した。局在

観察は Axioplan 2 imaging microscope (Carl Zeiss, German) を用いて行った。

1-2-7 : その他の手技、試薬及び抗体について

SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング、質量分析に関しては以前に報告されている通りに行った (Funatsu et al. 1999; Yoshinaka et al. 2004)。BSA は、脂質除去済の精製標品を Sigma より購入した。抗 MOG 抗体 (ポリクローナル及びモノクローナル抗体) は Bernard 教授 (La Trobe University, Australia) から供与頂きました。抗 CNPase 抗体は Sigma、抗 PLP 抗体は Chemicon (CA, USA)、抗 14-3-3 β 抗体は Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) から購入した。動物実験は、日本生理学会のガイドラインに従って行った。

1-3 : 結果

可溶性画分のみならず、Triton X-100 可溶化膜画分を用いても同様にアクチンを再重合させてゲル化できること、その相互作用分子を分離できることを明らかにした。この作業過程を図 1 に示す。

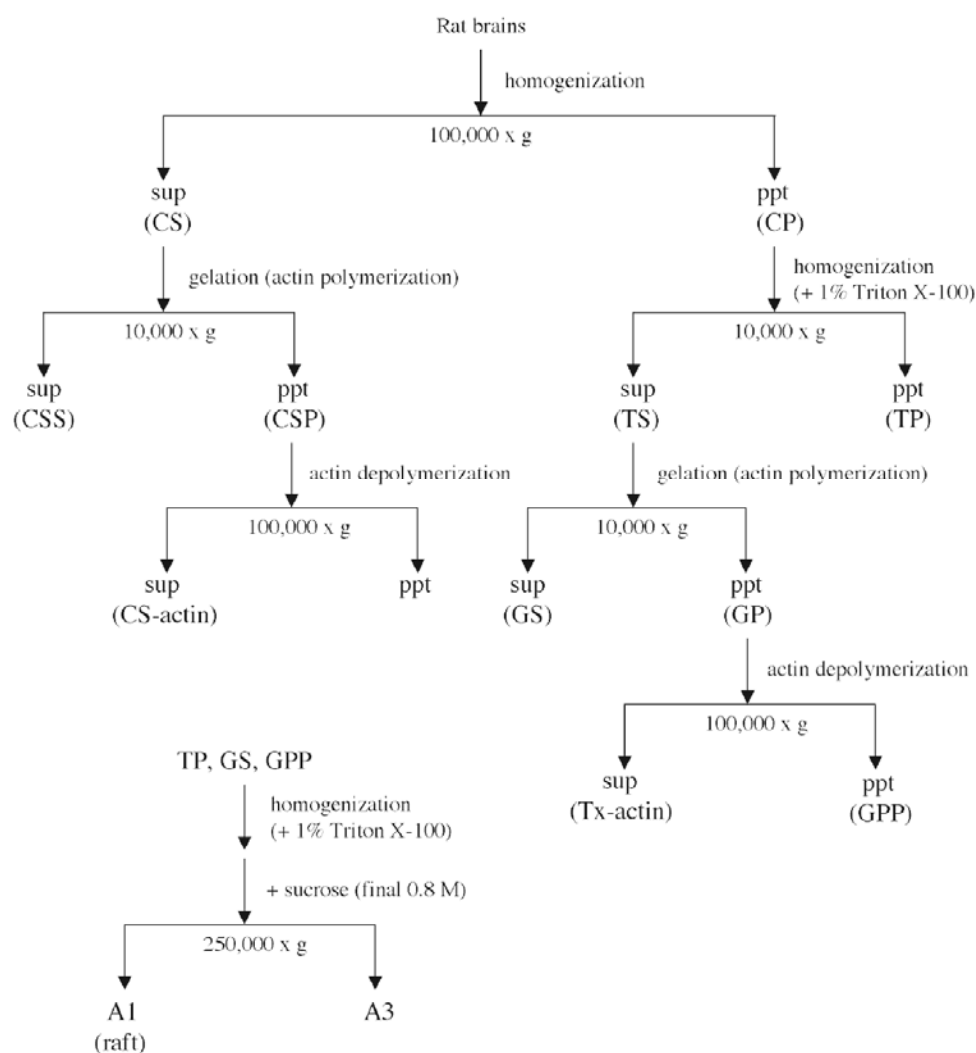


図 1 : アクチン繊維結合性タンパク質の分離プロセス

ゲル化は 25°C 温浴中にて行ったが、それ以外は 4°C で行った。

1-3-1 : アクチン繊維に結合する微小領域構成分子の同定

図 1 に示した過程によって得られた各画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE によって分析、比較した (図 2A)。まず、可溶性画分においてアクチン重合後、脱重合させて得られた (CS-actin) 画分 (A; lane 7) では、アクチンの他に、250, 110, 53 kDa の位置に明瞭なバンドが確認できた。これらはそれぞれ、fodrin、drebrin、fascin というアクチン結合性タンパク質であることが以前に報告されている (Maekawa and Sakai, 1988)。Triton X-100 可溶化膜画分を用いた系でも、Tx-actin 画分 (A; lane 8) にこれらのタンパク質は存在しているが、その量は比較的少なかった。アクチン脱重合後、得られた沈殿 (GPP 画分) にアクチン結合性タンパク質が残っていることが予想され、また GPP 画分に膜を含んでいる様子が見受けられたことから、次に GPP 画分から DRM 画分を調製した (A; lane 1)。比較対照するために、GS 画分、TP 画分からも同様に DRM 画分を調製して、GPP 由来 DRM 画分に有意に分画される分子を探索した (lane 1, 2, 3 の比較)。その結果、アクチンの他に、チューブリンや NAP-22、GAP-43 といった DRM 画分を構成する主要な分子が回収された。更に 42, 30, 27, 26, 24 kDa のバンドが分画された。これらの分子が GS 由来 DRM 画分に有意に分画される様子は見られなかった (図 2C)。また、その他の画分と比較しても、42 kDa バンドが GPP 由来 DRM 画分に特徴的であったのでこれに着目し、質量分析法による同定を試みた。その結果、この分子が CNPase という、オリゴデンドロサイトマーカータンパク質の一つであることが判明した (Kim and Pfeiffer, 1999; Bifulco et al., 2002)。30 kDa のバンドは分析の結果、14-3-3 β 由来ペプチドを含むことが明らかとなった。そこで、抗 CNPase、及び抗 14-3-3 β 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った (図 2B)。CNPase が GPP 由来 DRM 画分に有意に分画されていたのに対して、14-3-3 β は明瞭な局在パターンを示さなかった。質量分析の結果から考えて、30 kDa バンドが複数のタンパク質を含んでいたと結論付けた。

1-3-2 : GPP 由来 DRM 画分とミエリン膜由来タンパク質の比較

中枢ミエリンを構築するオリゴデンドロサイトのマーカータンパク質が検出されたことを受けて、GPP 由来 DRM 画分とミエリン膜由来 DRM 画分の構成分子を SDS-PAGE によって比較した (図 2C)。CNPase 及びその他の 4 つのバンドがミエリン膜由来 DRM 画分にも確認できた。更に、CNPase 以外のマーカータ

ンパク質である、MOG 及び PLP についてもその特異抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った (図 2D) (Weimbs and Stoffel, 1992; Johns and Brnard, 1999; Reindl et al., 1999)。MOG が GPP 由来 DRM 画分に特徴的な局在を示したのに対して、PLP は MOG ほど明瞭な局在パターンを示さなかった。MOG と PLP は SDS-PAGE 上で共に 27 kDa 付近に位置する。26, 24 kDa のバンドは共に酸性条件下で可溶化されたことから Myelin basic protein (MBP) であると判断した。MBP が微小領域構成分子であることは以前に報告されている (Boggs and Rangaraj, 2000)。

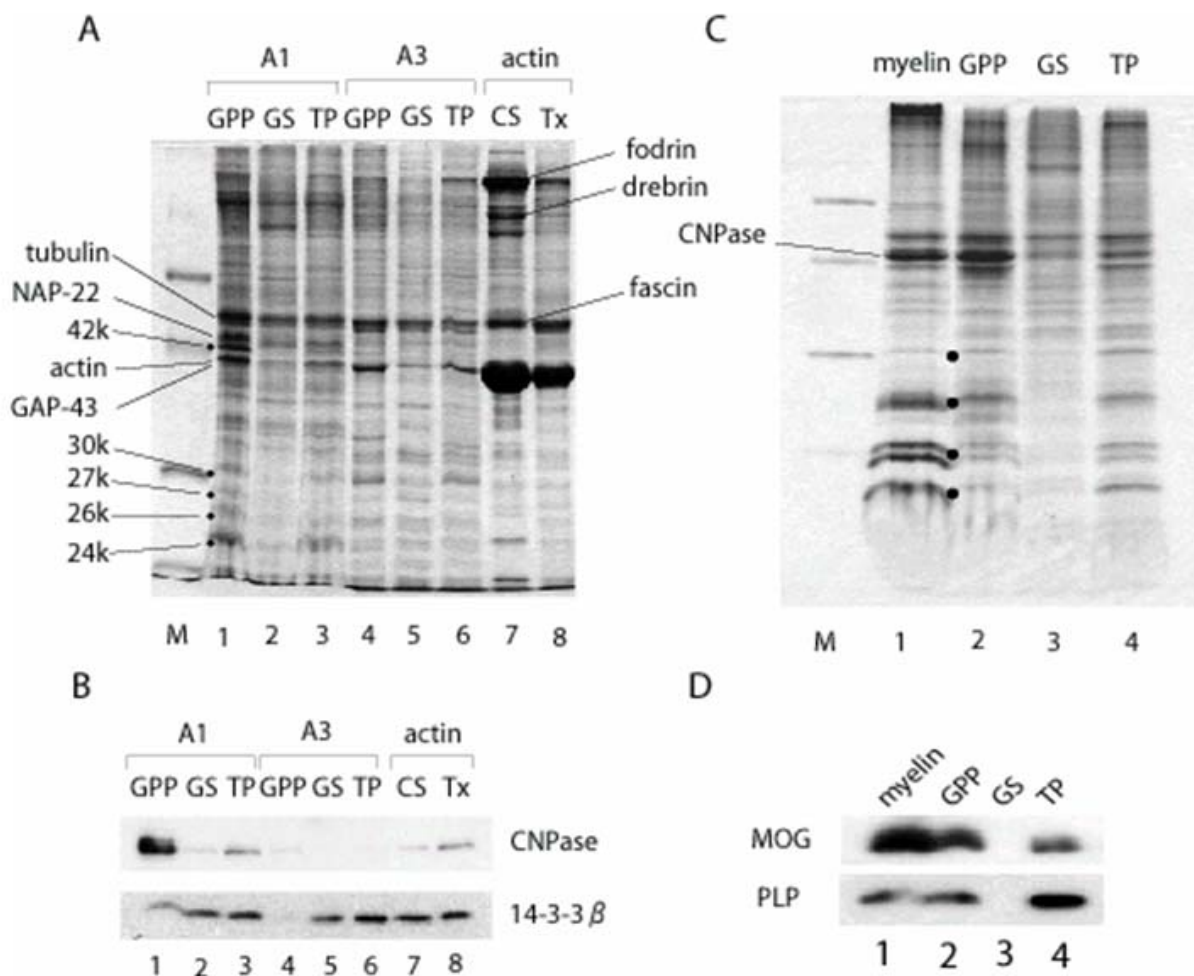


図 2: SDS-PAGE 及びウエスタンブロットティングによるアクチン結合性 DRM 画分構成分子の解析

(A) アクチン結合性タンパク質の分離: アクチン結合性膜画分 (GPP)、非アクチン結合性画分 (GS)、Triton X-100 不溶性膜画分 (TP) から DRM 画

分 (A1) と Triton X-100 不溶性高比重膜画分 (A3) を調製して SDS-PAGE によってその構成分子を比較した。CS 及び TS 由来の actin 画分 (それぞれ、CS-actin、Tx-actin) も同様に電気泳動した (lane 7, 8)。GPP 由来 DRM 画分 (lane 1) には、NAP-22、GAP-43、アクチン、チューブリンといった DRM 画分を構成する主要な分子が存在した。また、複数のバンドが lane 1 において豊富に分画されていた (42, 30, 27, 26, 24 kDa のバンド)。CS-actin 画分に含まれる分子は fodrin、drebrin、fascin であることが報告されている。Lane M は分子量マーカーで、67, 42, 30, 21.5 kDa を示す。

- (B) CNPase と 14-3-3 β の局在 : CNPase は GPP 由来 DRM 画分に豊富に分画された。しかし、14-3-3 β は全ての画分において検出された。
 - (C) ミエリン由来 DRM 画分と GPP、GS、TP 由来 DRM 画分構成分子の比較 : GPP 由来 DRM 画分に豊富なバンド (CNPase (42 kDa)、及び 30, 27, 26, 24 kDa のバンド) はミエリン由来 DRM 画分においても局在した (dotted in lane 1)。
 - (D) MOG 及び PLP の局在 : MOG は GPP 由来 DRM 画分に豊富に局在した。
- 用いた画分は全て、Lowry 法によってタンパク定量した。等タンパク量を電気泳動して比較・分析に用いた。

1-3-3 : ミエリン由来 DRM 構成分子とアクチン繊維の結合性

可溶化したミエリン由来 DRM 画分に含まれる CNPase、MOG、PLP それぞれの分子に着目して、アクチン繊維 (Tx-actin 画分あるいは精製アクチン) に対する結合性を検討した。ミエリン由来 DRM 画分構成分子が 1% Triton X-100/1 M NaCl (高塩強度下) で効率よく可溶化できたことから、この条件で可溶化した上清に、Tx-actin 画分 (図 1) あるいは精製したアクチン (精製 G アクチン; 方法 1-2-4 参照) を混合して、再重合させて結合アッセイを試みた (図 3)。結合分子は 1-3-1 と同様に沈殿画分に回収される。PLP の場合、アクチンを加えなくても沈殿画分に検出されており、有意な差 (lane 4 vs. lane 5) を見出すことはできなかった。CNPase 及び MOG についても、アクチン無添加でも沈殿に検出されたが、これらの分子は有意にアクチン繊維結合性を示した (lane 4 vs. lane 5)。しかしながら、CNPase が精製アクチンを用いた場合でも沈殿に回収されて、その結合性が“直接的”であることを強く示唆したのに対して、MOG では Tx-actin を用いた場合にのみその結合性を示した。Tx-actin 画分に CNPase が検出された (lane 6) ことも、その一部がアクチンの重合/脱重合に依存して結合/解離を示したためであると考えられる。以上の結果は、CNPase、

MOG、PLP それぞれの分子がアクチン繊維に対して異なる結合様式を有することを示している。

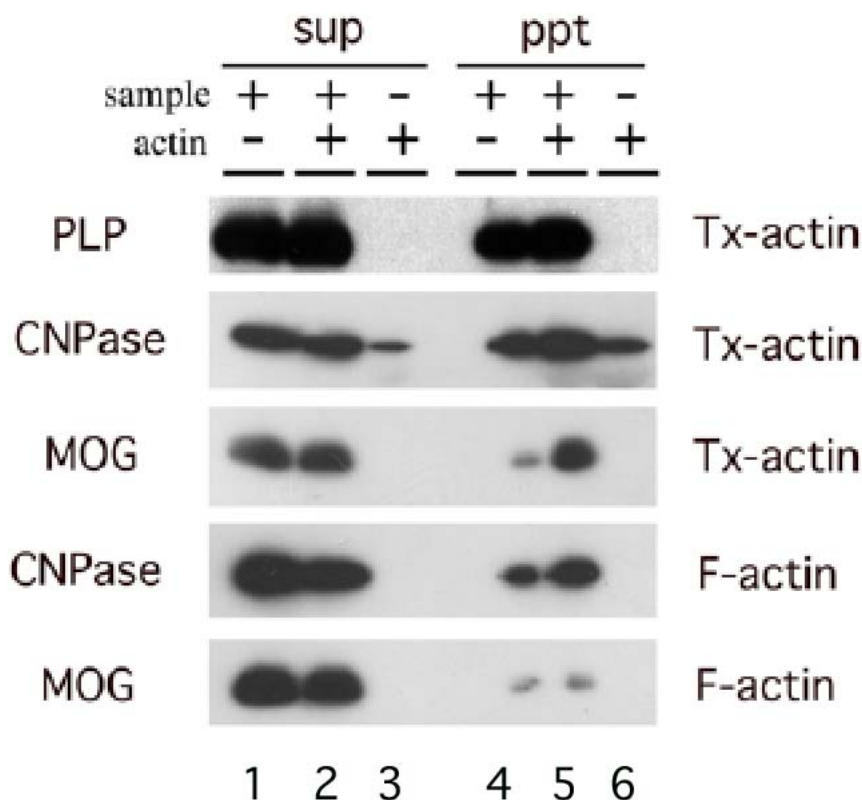


図 3 : ミエリン由来 DRM 画分構成分子のアクチン繊維結合性

Triton X-100/NaCl によって可溶化したミエリン由来 DRM 画分に Tx-actin 画分、あるいは精製アクチン (G-actin) を加えて再重合させ (F-actin)、それぞれの分子の結合性を検討した。CNPase が精製アクチンにも結合するのに対して、MOG は Tx-actin 画分を加えた場合に有意な結合性を示した (lane 4 vs. lane 5)。電気泳動には、等容積のサンプルを用いて比較した (方法 1-2-4 参照)。

1-3-4 : 培養オリゴデンドロサイトにおける局在解析

オリゴデンドロサイトマーカータンパク質とアクチン繊維の局在について培養系を用いて比較、観察した。シート状に広がった膜構造は成熟した形態を示す (Asou et al., 1995)。方法 A による染色法では、CNPase、MOG、PLP それぞ

れがアクチン及び Chl と共局在した。方法 B では、DRM 分画を踏まえて生細胞を Triton X-100 で処理した。シート状に広がった膜構造における免疫反応が減衰したが、太い突起（枝）部分ではその強い免疫反応がアクチンおよび Chl と共局在した。この結果は生化学分画による結果と一致している。なお、免疫反応はオリゴデンドロサイト近傍のアストロサイトでは検出されなかった（data not shown）。

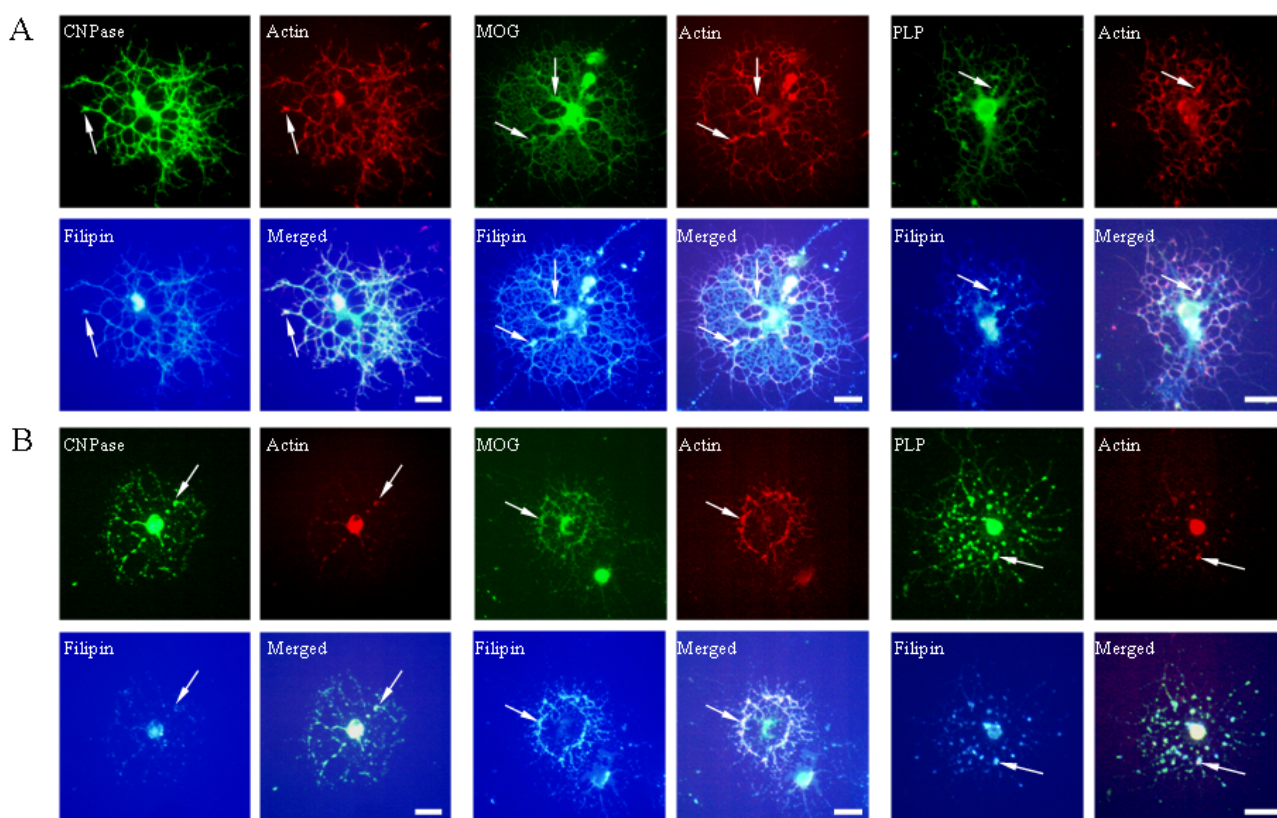


図 4：培養オリゴデンドロサイトにおけるマーカータンパク質の局在解析

- (A) 固定後に Triton X-100 で可溶化：CNPase、MOG、PLP 共に（緑）、アクチン繊維（ファロイジン；赤）及び Chl（Filipin 複合体；水色）と共局在した。特に、太い突起部分やその分岐点において強い免疫反応が存在した。
- (B) Triton X-100 で可溶化後に固定：Triton X-100 処理に不溶性の部位において CNPase、MOG、PLP 共に、アクチン繊維及び Chl と共局在した。

矢印は共局在を示す。スケールは 20 μ m を示す。

1-4 : 考 察 (小括 1)

1-4-1 : 細胞膜由来アクチン繊維結合タンパク質分離法の確立

アクチン繊維に結合性を示す GP 画分及びその由来画分である Tx-actin 画分と GPP 画分を更に詳細に比較・検討することにより、今回同定したタンパク質以外の分子を同定できる可能性がある。

1-4-2 : アクチン繊維結合性微小領域構成タンパク質 CNPase、MOG、PLP

これらのマーカータンパク質が微小領域構成分子であることは以前に報告されている (Simons et al., 2000; Kim and Pfeiffer, 2002; Taylor et al., 2002)。CNPase はメチル- β -シクロデキストリン (methyl- β -cyclodextrin: MCD) によって可溶化することができるが、MOG、PLP は不溶性であることから、これらの分子の間でも微小領域への局在 (親和性) に違いがあると考えられる。CNPase はアクチン繊維及び微小管といった細胞骨格系と相互作用すると報告されているが (De Angelis and and Braun, 1996; Bifulco et al., 2002)、MCD で可溶化した CNPase は精製したアクチン繊維への結合を示さなかった (data not shown)。Triton X-100/1 M NaCl で可溶化したミエリン膜由来 DRM 画分にアクチン繊維と CNPase の結合を架橋、あるいは安定化する因子の存在を推測することができる。今回得られた画分でそのような分子を探索した場合、MBP が CNPase と共に GPP 由来 DRM 画分に回収されたが、CNPase と MBP のミエリン内における局在が異なることから、現在のところその可能性は低いと言える (Dyer and Benjamins, 1989; Zach, 1992; Kim and Pfeiffer, 1999)。また、CNPase が本来酵素として有する 2', 3'-cyclic nucleotide 加水分解活性が細胞骨格を制御する上でどのような機能を有しているかということについては現在のところ不明である。しかしながら、CNPase が微小管やアクチンといった細胞骨格系と相互作用するだけでなく、そのリン酸化が微小管形成に阻害的に働くことや培養オリゴデンドロサイトにおいて、これら三者の分子が共局在しており、サイトカラシン B 処理 (アクチン繊維の崩壊) によってこれらの分布もまた崩壊することから、その細胞骨格系との相互作用及び情報伝達が、ミエリンの形態形成において重要な機能を有することは明確である (Dyer and Benjamins, 1989; Bifulco et al., 2002)。

また MOG については、アクチン繊維に対して間接的に結合すること、その結合には少なくとも Tx-actin 画分に含まれる因子が必要であることが推測できる。MOG と細胞骨格についての検討は培養オリゴデンドロサイトを用いた系において報告されている。MOG をその特異抗体を用いて架橋すると、オリゴデンドロサイトのミエリン様膜の収縮を引き起こす。この時、 β -チューブリンの脱リ

ン酸化が起こっている (Marta et al., 2003)。MOG が微小管に影響を与える因子であることは複数の報告が為されているが (Johns and Bernard, 1999)、ミエリンの複雑な構造を考慮すると、その維持と制御にはアクチン繊維もまた重要な機能を担っていることが推測される。アクチン繊維に対する MOG の機能解析は今後の課題である。

GPP 由来 DRM 画分構成分子として PLP を分離、同定した。しかしながら、そのアクチン繊維への結合を再現することはできなかった (図 3)。COS-1 細胞に PLP を発現させると、アクチン繊維構造が存在する部位にその局在を観察することができるという報告されている (Kalwy et al., 1997)。Triton X-100/NaCl で可溶化した PLP が Tx-actin を加えてもアクチン繊維にその結合性を示さなかったことから、そのアクチン繊維への相互作用に他因子 (例えば、Triton X-100/NaCl 不溶性ミエリン由来 DRM 画分に含まれる分子) を必要とする可能性が考えられる。あるいは、アクチン繊維への結合に関わる分子が存在する微小領域に PLP もまた存在するのかもしれない。PLP はミエリンを構成するタンパク質にあって、その半分近くを占める主要構成因子であるが、アクチン繊維と結合して形態に与える影響については現在のところ、不明である。

1-4-3 : ミエリンとアクチン繊維と微小領域

アクチン繊維結合性微小領域構成分子を同定した結果、オリゴデンドロサイトマーカータンパク質がその主要分子として検出されたことは、微小領域とアクチン繊維がミエリン形成において重要な意義を有することを強く示唆している。今後は、CNPase、MOG、PLP が微小領域において果たす個々の機能 (その違い) について解析することが重要であると考えている。

第2章：微小領域における Na^+ , K^+ -ATPase の同定と解析

2-1：緒言

神経細胞膜は興奮性を有する。膜の興奮はシナプスにおいて神経伝達物質の放出を引き起こし、その情報は後細胞に伝達される。この時、膜の興奮と再分極過程に様々なイオンチャネルと ATP 依存性イオン輸送体が関与する。脱分極後、ATP 依存的にナトリウムイオンとカリウムイオンをアンチポートする輸送体は Na^+ , K^+ -ATPase であり、細胞膜の主要な ATPase である。 Na^+ , K^+ -ATPase は膜を隔ててナトリウム／カリウムイオン濃度勾配を形成する。この内向きのナトリウム濃度勾配がカルシウムの細胞外への排出や神経伝達物質の再取り込みを駆動する (Sweadner, 1989; Blanco and Mercer, 1998; Lingrel et al., 2003)。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は強心配糖体ウアバインによって特異的に阻害される。

腎臓や心筋、培養細胞系では、 Na^+ , K^+ -ATPase は非 DRM 分子と見なされており、界面活性剤を用いない微小領域画分の構成分子として扱われてきた (Liu et al., 2003; Wang et al., 2004)。

シナプス膜由来 DRM 画分構成分子をカラムによって分画し、含まれる主要な分子を質量分析法によって同定する過程で、高い再現性で Na^+ , K^+ -ATPase の存在を検出した。更に、DRM における Na^+ , K^+ -ATPase の存在をウエスタンブロットティング及びその酵素活性の測定により確認した。

また近年、脳を含む諸臓器にウアバイン様生理作用物質が存在すること (Rodriguez de Lores Arnaiz et al., 1998)、 Na^+ , K^+ -ATPase α サブユニットがウアバイン受容体としてシグナル伝達に関わると報告された (Liu et al., 2003; Wang et al., 2004)。腎臓由来の培養細胞 LLC-PK1 を用いた系では、ウアバイン刺激によって Na^+ , K^+ -ATPase α サブユニット／チロシンキナーゼ Src／カベオリン-1 の複合体形成が微小領域カベオラにおいて経時的に生じること、MAP キナーゼの一つである ERK1/2 を活性化することが明らかとなっている (Wang et al., 2004)。この三者複合体は心筋細胞においてもその存在が確認されている (Liu et al., 2003)。この結果を受けて、神経細胞に発現する $\alpha 1$ 及び $\alpha 3$ アイソフォームについて、そのウアバイン刺激依存的な DRM 局在性の変化をシナプス由来膜画分を用いて検討した。

2-2：材料と方法

2-2-1：シナプス膜画分の調製

6 週齢ラット脳を用いて行った。方法は上述 1-2-2 と同様にして行った。また、シナプトソーム画分の調製を行う場合は、粗シナプトソーム画分を調製した後、浸透圧破碎を行わずにシヨ糖密度勾配遠心分離を行い、0.8-1.2 M 間に回収され

る膜画分を回収した。

2-2-2 : シナプス膜画分及びシナプトソーム画分からの DRM 分画

DRM 分画は上述 1-2-3 に従って行った。ただし、界面活性剤は 2% Triton X-100 を用いた。

2-2-3 : シナプス膜由来 DRM 画分の可溶化

シナプス膜由来 DRM 画分を 2% SDS 存在下でホモジェナイザーによる破碎後、56°C (20 分間) 保温することによって可溶化した。保温処理後、200,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行い、可溶化上清を回収した。尚、この過程は室温で行った。

2-2-4 : SDS 可溶性 DRM 画分の分画

SDS によって可溶化した DRM 画分をハイドロキシアパタイトカラム (hydroxy apatite column: HAP カラム) (Bio Rad, CA, USA) によって分画した。溶出緩衝液の条件を以下に示す。

- ・ 溶出緩衝液

リン酸緩衝液 : 100-300 mM (グラディエント溶出)

分画後、それぞれの画分を等容用いて SDS-PAGE による構成分子の比較・分析を行った。SDS-PAGE 後、ゲルは Coomassie brilliant blue (CBB) によって染色した。検出したバンドをゲルから切り出して、リシルエンドペプチダーゼによるゲル内消化で得られたペプチドを液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で検出、同定を試みた。

2-2-5 : Na⁺, K⁺ -ATPase 活性の測定

Na⁺, K⁺ -ATPase 活性の測定はシナプス膜画分、シナプス膜由来 Triton X-100 可溶性画分、シナプス膜由来 DRM 画分を用いて行った。それぞれの画分をホモジェナイザーによってよく破碎した後、活性測定用緩衝液に懸濁した。その組成を以下に示す。

- ・ 活性測定用緩衝液

100 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0.12 M KCl, 5 mM KCl, 0.1 mM ATP, pH7.4

Na⁺, K⁺ -ATPase 活性は、1 mM ウアバイン存在及び非存在下での総 ATPase 活

性の差（ウアバイン感受性 ATPase 活性）とみなした（Gorini et al., 2002）。酵素活性は、全て比活性で表記した。

2-2-6：ウアバイン刺激

シナプトソーム画分とシナプス膜画分をウアバイン刺激する際はこれらの膜画分を Krebs 緩衝液に懸濁して行った。

・ Krebs 緩衝液

118.5 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.18 mM MgCl₂, 0.1 mM Na₂HPO₄,

20 mM Hepes-KOH, pH 7.4

但し、カルシウム存在下では、1.2 mM CaCl₂ を、カルシウムキレート下では、1 mM EGTA をこれに添加して用いた。

それぞれの膜画分を 100 μM ウアバインによって刺激した。刺激は 37°C 温浴中でそれぞれの膜画分を保温することによって行った。刺激時間は 5, 10, 20 分間行い、反応の停止は氷中に浸して、すぐさま氷冷した Krebs 緩衝液を 5 倍容添加した後、250,000 xg で 30 分間の超遠心分離を行って上清を取り除いた。得られた沈殿を DRM 画分に用いた（方法は 1-2-2 参照）。

2-2-5：抗体

Na⁺, K⁺-ATPase αサブユニットの局在を検出する際、ウエスタンブロッティングに用いた抗体の購入先を以下に示す。

- ・ 抗α1 アイソフォーム抗体：Upstate Biotechnology (Virginia, USA)
- ・ 抗α3 アイソフォーム抗体：Affinity BioReagents, Inc. (Golden, CO, USA)

2-3：結果

2-3-1：シナプス膜由来 DRM 画分における Na⁺, K⁺-ATPase の存在

HAP カラムにより SDS で可溶化したシナプス膜由来 DRM 画分を分画した際、リン酸緩衝液 130-140 mM で溶出される画分（図 5A）に Na⁺, K⁺-ATPase αサブユニットを検出した。分析（LC-MS/MS により検出）したバンド（図 5A）からはそのαサブユニットに由来するペプチドを複数検出した（図 5B）。脳内で発現するαサブユニットには 3 種類のアイソフォーム（α1, α2, α3）が存在する（Swadner, 1989; Lingrel et al., 2003）。αアイソフォーム間で共通の配列を有するペプチドの他に、それぞれのアイソフォームに特異的なペプチドも検出した。得られたペプチドの各アイソフォームにおける回収率（coverage）は、それぞれ

$\alpha 1$ (5.2%)、 $\alpha 2$ (5.2%)、 $\alpha 3$ (5.0%) だった。

次に、ウエスタンブロッティングによってその局在を確認した (図 5C)。神経細胞は $\alpha 1$ 及び $\alpha 3$ アイソフォームを発現する (Juhászová and Blaustein, 1997)。一方、グリア細胞は $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ アイソフォームを発現する。したがって、 $\alpha 1$ と $\alpha 3$ について検討した。その結果、それぞれのアイソフォームの大部分は Triton X-100 によって可溶化されたが (図 5C; lane 1)、その一部は DRM 画分に回収された (図 5; lane 3)。これまで、 Na^+ 、 K^+ -ATPase は非 DRM 分子であると認識されてきた (Liu et al., 2003; Wang et al., 2004)。しかしながら、シナプス膜を用いて検討した場合、DRM 画分の局在に再現性があること、得られた DRM 画分を Triton X-100 (2%) で繰り返し処理しても可溶化されないことから、 α サブユニットの一部は DRM に局在すると判断した。

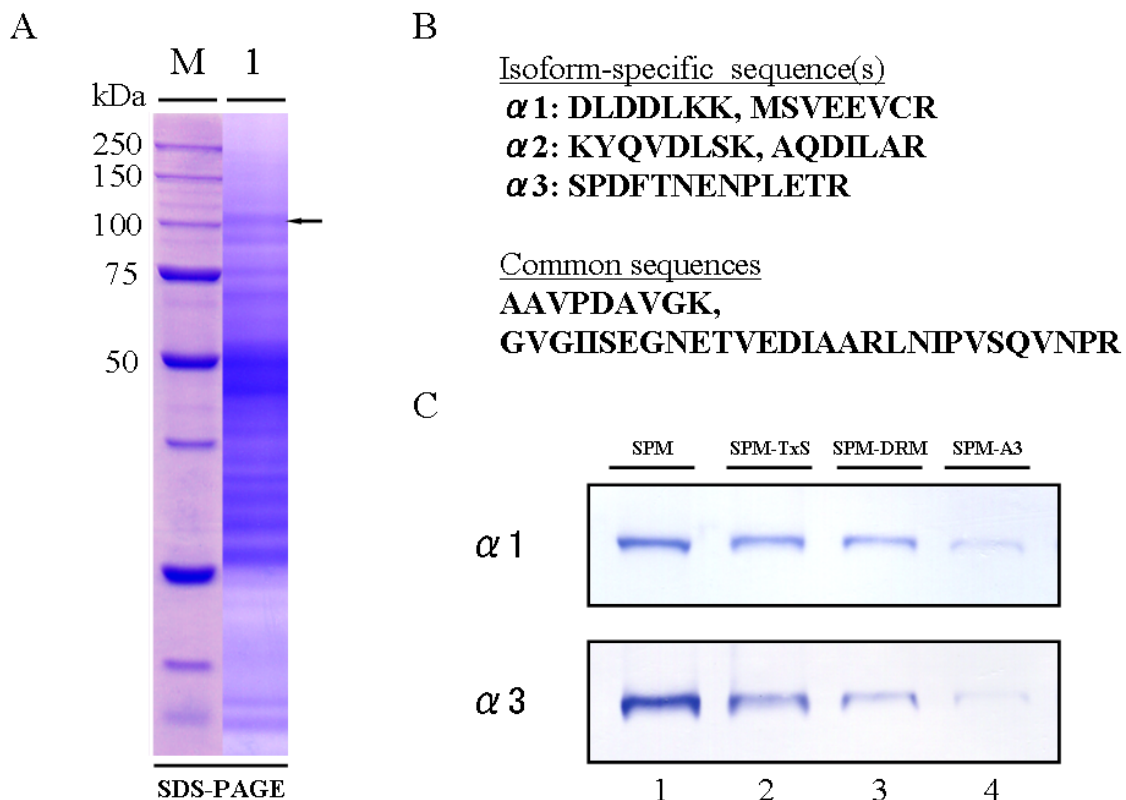


図 5 : シナプス膜由来 DRM 画分における Na^+ 、 K^+ -ATPase の存在

(A) SDS 可溶化 DRM 画分構成分子 : DRM 画分を SDS (2%) で可溶化した上清をヒドロキシアパタイトカラムによって分画したところ、130-140

mM リン酸カリウム緩衝液で溶出された画分に Na^+ , K^+ -ATPase α サブユニットの存在を見出した (矢印)。

- (B) 質量分析過程で得られたペプチド配列 : Na^+ , K^+ -ATPase α アイソフォームに共通するペプチドと、それぞれに特異的なペプチドを検出した。
- (C) シナプス膜由来画分における Na^+ , K^+ -ATPase の存在 : $\alpha 1$ 及び $\alpha 3$ アイソフォームの一部は DRM 画分に回収された (lane 3)。しかしその大部分は、Triton X-100 によって可溶化された (lane 2)。Lane 1: シナプス膜画分 (SPM)、lane 2: Triton X-100 可溶性画分 (SPM-TxS)、lane 3: DRM 画分 (SPM-DRM)、lane 4: Triton X-100 不溶性高比重膜画分 (SPM-A3)。全ての画分は Lowry 法によってタンパク定量して等タンパク量 ($1 \mu\text{g}$) を電気泳動した。

2-3-2 : Na^+ , K^+ -ATPase 活性の測定

シナプス膜由来 DRM 画分において、ウアバイン感受性 ATPase 活性の存在を確認することができた (図 6A)。

2-3-3 : シナプス膜画分における Na^+ , K^+ -ATPase 活性を担う α アイソフォームについて

α アイソフォームはそれぞれ異なったウアバイン感受性を有する。 $\alpha 1$ が低感受性 ($\text{IC}_{50} > 10,000 \text{ nM}$) であるのに対して、 $\alpha 2$ 及び $\alpha 3$ は高感受性 (IC_{50} : 10 – 500 nM) である (Juhászova and Blaustein, 1997)。この感受性の違いを利用して、シナプス膜画分とシナプス膜由来 DRM 画分に存在する Na^+ , K^+ -ATPase 活性を担う α アイソフォームについて検討を行った (図 6B)。両画分に含まれる Na^+ , K^+ -ATPase 活性をそれぞれ 100%として、様々な濃度のウアバイン存在下における Na^+ , K^+ -ATPase 活性の割合をそれぞれプロットした。その結果、ウアバインの濃度が上昇するにつれて、両画分に存在する Na^+ , K^+ -ATPase 活性は二層性の減少過程をたどった (図 6B)。ウアバイン 10-100 nM 存在下における両画分の酵素活性を比較することにより、 $\alpha 1$ アイソフォームによる活性が選択的に DRM に局在することが明らかとなった。シナプス膜画分では約 65%、DRM 画分では約 90%の Na^+ , K^+ -ATPase 活性を $\alpha 1$ アイソフォームが占める結果となった。

A

B

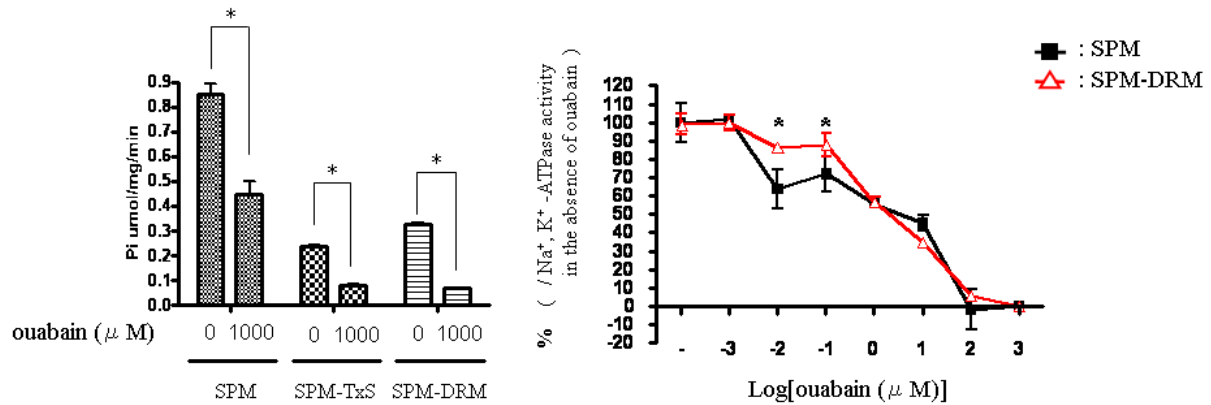


図 6 : シナプス膜由来画分における Na^+ , K^+ -ATPase 活性の測定

- (A) Na^+ , K^+ -ATPase 活性の存在 : シナプス膜画分 (SPM)、Triton X-100 可溶性画分 (SPM-TxS)、DRM 画分 (SPM-DRM) それぞれにおいて、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の存在を検出した。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性はウアバイン (1 mM) に感受性の ATPase 活性と見なした。
- (B) ウアバイン濃度依存的な Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害 : シナプス膜画分 (SPM) とその DRM 画分 (SPM-DRM) それぞれに含まれる Na^+ , K^+ -ATPase 活性 ((-)) を 100%とした。様々なウアバイン濃度存在下で存在する Na^+ , K^+ -ATPase 活性の割合をプロットした。ウアバイン 10-100 nM 存在時を比較することにより、 $\alpha 1$ アイソフォームが選択的に DRM における活性を担っていることが明らかとなった。シナプス膜では約 65%、DRM 画分では約 90%の活性を $\alpha 1$ アイソフォームが担っていた。

Bar は SEM (n=4) を示す (* $P < 0.0001$)。

2-3-5 : ウアバイン受容体として機能する α サブユニット

シナプトソーム画分及びシナプス膜画分をウアバイン刺激後 (1 mM EGTA 存在下)、それぞれの画分から DRM 画分を調製した。その局在変化についてウエスタンブロッティングを用いて検討したところ、 $\alpha 3$ アイソフォームは経時的に

DRM への局在を増加させた (図 7)。特にシナプトソーム画分を用いた系では、処理後 10 分で明瞭なピークに達した。しかしながら、 $\alpha 1$ はその局在に有意な変化を示さなかった。 Ca^{2+} 存在下でも $\alpha 3$ アイソフォームの局在変化を検出することができた。比較対照区としたウアバイン非刺激区では、このような局在変化は検出できなかった (data not shown)。

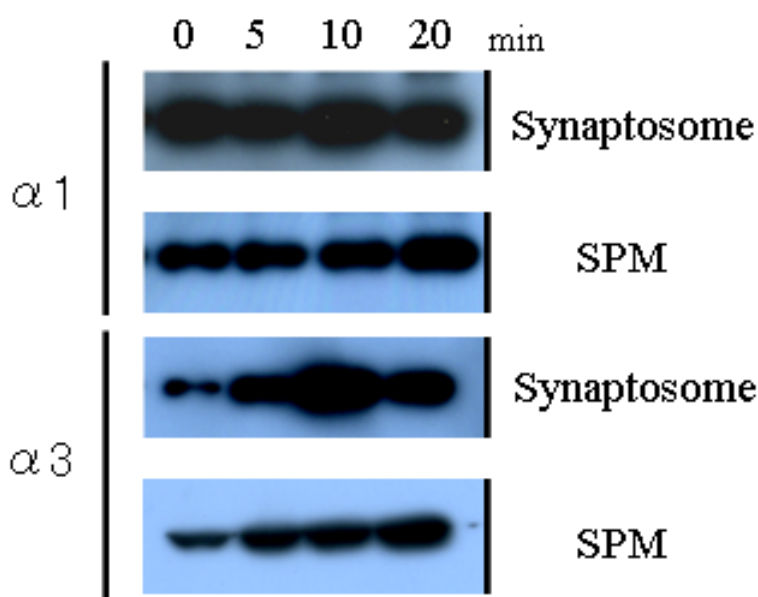


図 7：ウアバイン刺激による Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットの局在変化

シナプトソーム画分及びシナプス膜画分をウアバイン ($100 \mu\text{M}$) で刺激した後に、それぞれの DRM 画分に存在する α アイソフォームの存在を検出した (1 mM EGTA 存在下)。 $\alpha 3$ アイソフォームは経時的に DRM への局在を増加させたのに対して、 $\alpha 1$ は有意な局在変化を示さなかった。シナプトソーム画分における $\alpha 3$ の局在変化は、刺激後 10 分で明瞭なピークを示した。各 DRM 画分は Lowry 法によって定量した後、等タンパク量 ($5 \mu\text{g}$) を電気泳動した。

2-4：考 察 (小括 2)

2-4-1： Na^+, K^+ -ATPase の DRM 局在性

これまでの報告が示す通り、腎臓あるいは心筋由来組織を用いた際、 Na^+, K^+ -ATPase は界面活性剤によってほぼ完全に可溶化されて DRM 画分には回収され

なかった (data not shown)。他組織に比較して心筋では、DRM 画分を回収すること自体難しかった。そして、それらの報告が示す通り、アルカリ条件 (pH11) に不溶性の膜画分から微小領域画分を調製すると、 Na^+ , K^+ -ATPase が確かに存在することもまた確認した。アルカリ条件による微小領域画分には DRM 画分比べて約 10 倍量のタンパク質が回収された。しかしながら、シナプス膜画分を用いて DRM 画分を行ったところ、 Na^+ , K^+ -ATPase は高い再現性をもって DRM 画分に回収することができた (図 5)。この結果は同じ分子においても組織によって微小領域に対する親和性が異なることを示唆している。また、DRM 画分を用いた活性測定によってもその存在を確認することができた (図 6A)。

2-4-2 : 微小領域における Na^+ , K^+ -ATPase の機能

シナプス膜由来 DRM 画分に存在する Na^+ , K^+ -ATPase 活性の約 90% は $\alpha 1$ アイソフォームに依存していた。シナプス膜において、 $\alpha 1$ アイソフォームが担う活性は全体の約 65% 程度であり、この結果は $\alpha 1$ アイソフォームによる Na^+ , K^+ -ATPase 活性が選択的に DRM へ局在していることを示している。

一方、 α サブユニットがウアバインの受容体となり、微小領域カベオラにおいて機能複合体を形成してシグナル伝達に関与すると報告されたが (Liu et al., 2003; Wang et al., 2004)、この機能に関する報告のほとんどは腎臓由来培養細胞と一部で心筋細胞が用いられている。腎臓は $\alpha 1$ アイソフォームのみを発現し、心筋は $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ を発現している (Sweadner, 1989; Lingrel et al., 2003)。神経細胞は $\alpha 1$ 及び $\alpha 3$ を発現しているが、ウアバイン刺激による $\alpha 3$ アイソフォームの挙動に関してはこれまでに報告されていない。シナプス由来膜画分を用いた解析により $\alpha 3$ がウアバイン刺激に応じて経時的に微小領域に集積することを見出した (図 7)。この局在変化は EGTA 存在下においても生じることから、カルシウムイオンの必要性はないと考えている。また、シナプトソーム画分を用いた解析では、ウアバイン刺激後 10 分間で明瞭なピークを生じた。シナプス膜画分では比較的ゆっくりとその局在を上昇させた。微小領域への $\alpha 3$ アイソフォームの局在化にはシナプトソーム内に存在する分子の必要性が推測される。更に、刺激には $100 \mu\text{M}$ のウアバインを用いたが、この濃度は微小領域に存在する Na^+ , K^+ -ATPase 活性をほぼ完全に阻害する。 $\alpha 3$ の DRM 局在化には酵素としての本来の機能を必要としないのかもしれない。

腎臓や心臓由来細胞では、カベオラにおける α サブユニットを含む複合体にチロシンリン酸化酵素 Src が含まれている。シナプス膜由来 DRM 画分においても Src の関与を推定したが、Src の経時的な局在変化を検出することはできなかった (data not shown)。脳内では、他組織とは異なったメカニズムが存在する可能性がある。

以上の結果は、シナプス膜由来 DRM における局在が、 Na^+ , K^+ -ATPase α アイソフォームに依存的なメカニズムによって調節されることを示唆している。また、刺激に依存した $\alpha 3$ アイソフォームの DRM への局在化は、微小領域がウアバイン様活性因子のシグナリングに重要な生理機能を担うことを示すだけでなく、その局在化のメカニズムの解析を通して刺激依存的な微小領域の構築機構の解明に有効である。

2-4-3 : Na^+ , K^+ -ATPase と細胞骨格

最近、培養細胞株 (Hela cells) を用いた系において、アクチン骨格制御タンパク質として知られる cofilin と解糖系酵素 triosephosphate isomerase が相互作用しており、更にこれに Na^+ , K^+ -ATPase が相互作用していると報告された (Jung et al., 2002)。解糖系酵素をその複合体に存在させる意義として、 Na^+ , K^+ -ATPase への ATP の供給が挙げられている。リン酸化された cofilin は Na^+ , K^+ -ATPase 活性を上昇させた。これには、Rho シグナリングの関与が示されている。Cofilin は無刺激の細胞において、リン酸化分子と脱リン酸化分子が共存している。細胞を刺激した際、例えばホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase: PI3K) シグナリングを活性化させた場合は、cofilin は脱リン酸化される。この過程には Ras/MEK/ERK 及び Ras/PI3K カスケードが関与するらしい (Nebl et al., 2004)。更に、Jung and the colleagues は、ウアバインがその Na^+ , K^+ -ATPase の阻害を通して cofilin を脱リン酸化させること、そのメカニズムとして、Rho キナーゼ/LIM キナーゼ/cofilin というリン酸化系を down-regulation させる一方、Src/EGFR/Ras/Raf/MEK カスケードを活性化させて cofilin のリン酸化を抑制するというモデルを提唱している (Jung et al., 2006)。

このウアバイン/アクチン骨格系制御のシグナリングと微小領域の関係については非常に興味深い、その関与について言及されていない。本研究における $\alpha 3$ アイソフォームの DRM-association が細胞形態に与える影響について、培養神経細胞を用いた薬理実験等を用いて検討する必要があると考えている。

第3章：モノクローナル抗体を用いた微小領域構成分子の同定と解析

3-1：緒言

微小領域には多様な機能分子が多数存在しており、その解析には分子を特異的に認識するモノクローナル抗体が非常に有力なツールになる。そこで、シナプス膜由来 DRM 画分を抗原としてマウスに免疫することにより微小領域構成分子に対する抗体を作製した。その結果、得られたモノクローナル抗体の一つ（18-6D4 抗体）が DRM 画分に豊富に存在する 140kDa 付近のバンドを特異的に認識した。この抗体で免疫沈降を行い、抗原タンパク質を質量分析法とウエスタンブロッティングにより同定した結果、PLC β 1 であることが判明した。PLC はホスファチジル 4,5-ビスリン酸（phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PIP₂）を加水分解して、イノシトール 1,4,5-トリスリン酸（inositol 1,4,5-trisphosphate: IP₃）とジアシルグリセロール（diacyl glycerol: DAG）を産生する。IP₃ 及び DAG はカルシウム/C キナーゼ（protein kinase C: PKC）へと繋がる、細胞内では主要なシグナル伝達系のセカンドメッセンジャーである。微小領域が PIP₂ シグナリングに参与することは、PIP₂ と PIP₂ 合成酵素の一つであるホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ II α （phosphatidylinositol 4-kinase II α : PI4K II α ）がその構成分子であることから示唆される（Baryiko et al. 2001; Minogue et al. 2001; Waugh et al. 2006）。その後の解析によって、PLC β 1 のみならず、PLC β 3 と β 4 アイソフォームもまた DRM に局在性を示すことが明らかとなった。DRM 画分からの PLC β 1 精製法を確立すると共に、精製した PLC β 1 を用いてその活性に影響を与える因子について検討した。

3-2：材料と方法

3-2-1：シナプス膜画分の調製

シナプス膜画分の調製は上述 1-2-2 に遵って行った。

3-2-2：脳及びシナプス膜画分由来 DRM 画分の調製

脳を摘出した後、PBS でよく洗浄した。これを剪刃で切り刻み、ホモジェナイザーによって破碎した（TME 緩衝液）。破碎液を 100,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行った。得られた上清を回収し、不溶性画分を TME 緩衝液中で破碎した。再度、100,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行った後、上清を先に得られた上清と混合して、これを可溶性画分（CS）とした。沈殿は不溶性画分として回収した。不溶性画分とシナプス膜画分からの DRM 分画は上述 1-2-3 に従って行った。

3-2-3 : モノクローナル抗体の作製

シナプス膜由来 DRM 画分を抗原としてモノクローナル抗体の作製を行った (Funatsu, 1999)。得られたハイブリドーマの内、クローン (18-6D4) が DRM 画分に豊富な抗原を特異的に認識したので、これをマウス (Balb/c) の腹腔に注射した。回収した腹水は硫酸分画 (50% 飽和) によって粗分画を行った。その後、ジエチルアミノエチル-陰イオン交換クロマトグラフィー (diethylaminoethyl column: DEAE カラム) (Amersham Pharmacia Biotech., Little Chalfont, UK) によって IgG タンパク質を精製した。

3-2-4 : PLC β 1 の可溶化

DRM 画分から PLC β 1 を可溶化するために、高イオン強度 (0.6 M NaCl, 4°C)、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate: DOC) (0.5%)、及び Triton X-100 (2%) による可溶化を行った。シナプス膜画分 (TME 緩衝液に懸濁した) に NaCl、DOC、あるいは Triton X-100 を加えて、ホモジェナイズした。界面活性剤による可溶化の場合は破碎後、37°C で 20 分間保温した。可溶化処理の後、試料を 100,000 xg で 60 分間の超遠心分離を行った。可溶化上清を回収して氷上で保存した。また、MCD による可溶化 (30 mM, 4°C) も同様にして行った。

3-2-5 : 免疫沈降

18-6D4 抗体を用いて、PLC β 1 を 0.6 M NaCl で可溶化したシナプス膜由来 DRM 画分を材料 (元画分) として用いた免疫沈降を行った。18-6D4 抗体を結合させた Sepharose ビーズ (2-2-5 参照) を用いた。可溶化した上清は等張に戻すために TME 緩衝液で 4 倍希釈した。ビーズは 0.2% Triton X-100 を含む TME 緩衝液で 3 回洗浄した後、TME 緩衝液のみで 3 回洗浄した。結合した分子の溶出は SDS サンプル用緩衝液で溶出した。

3-2-6 : PLC β 1 の精製

PLC β 1 を 2% Triton X-100 で可溶化した (37°C で 20 分間) シナプス膜由来 DRM 画分から精製した。精製は HAP カラム (Bio Rad)、DEAE カラム (Amersham Pharmacia Biotech.)、ヘパリン-Sepharose カラム (Amersham Pharmacia Biotech.) の順に用いた。分画後、PLC β 1 を含む画分はウエスタンブロッティングによって確認、選択した。以下に、各カラム使用時の溶出緩衝液の条件を示す。

- ・ HAP カラム : 300-500 mM リン酸緩衝液
- ・ DEAE カラム : 0-0.3 M NaCl / 10 mM HEPES-KOH, 0.2 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, pH7.5

- ・ ヘパリン-Sepharose カラム : 0.1-1.0 M NaCl / 10 mM Hepes-KOH , 0.2 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, pH7.5

3-2-7 : Gq α タンパク質の調製

Gq α を含む膜画分を調製するために、HEK293 細胞に Gq α 遺伝子 (human Gq α ; GenBank No. U40038) を導入してその細胞膜を分画・回収した。Gq α 遺伝子は、真核細胞におけるタンパク質発現用ベクター (pCMV5) の CMV プロモータ下に構築、クローニングしたものを用いた (この発現ベクターは、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 伊東 広 先生よりご供与)。HEK293 細胞は 10% FCS を含む DMEM を用いて培養した。遺伝子導入は TargefectF-1 (ナカライテスク) を用いて、その推奨プロトコルに従って行った。遺伝子導入後 48 時間で、細胞を回収した。細胞は破碎用緩衝液 (50 mM Hepes-NaOH, 1 mM EDTA, 3 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 0.15 M NaCl, 0.1 mM guanosine 5'-diphosphate, 1 mM PMSF, pH 7.4) 中で破碎した後、500 xg で 2 分間の遠心分離を行った。上清を更に 250,000 xg で超遠心分離後、沈殿を同破碎用緩衝液に懸濁、更にホモジェナイザーで破碎した。PLC β 1 活性を測定する前に、この膜画分を活性化する必要がある。活性化はこの膜画分に 1 mM GTP γ S, 2 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol: DTT), 1% DOC を加えて、37°C で 180 分間保温した。 (Hepler et al. 1993; Mizuno et al. 2005)。コントロール区として Gq α 遺伝子を導入しない細胞もまた同様に分画した。活性化後、これらの膜画分は使用時まで氷上にて保存した。

3-2-8 : 精製 PLC β 1 活性測定

精製 PLC β 1 の活性測定は以前の報告に従って行った (Hepler et al. 1993)。基質となる PIP₂ 及びホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine: PE) を 1:5 の割合で混合し、人工脂質膜 (リポソーム) を調製した。これを基質膜として用いた。但し、1 検定 (1 tube) につき、³H]PIP₂ (Perkin Elmer) を 5000-10000 cpm 加えた。また、必要に応じて、PE を減らして Chl、あるいはホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) を添加してリポソームを調製した。ラット脳から調製した NAP-22 もまた必要に応じてこれに添加した。酵素反応は以下の測定用反応緩衝液を用いて行った。

- ・ 測定用反応緩衝液

50 mM Hepes-NaOH, 0.2 mM EDTA, 3 mM EGTA, 0.83 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mg / ml bovine serum albumin (BSA), 0.16% DOC, 1.5 mM CaCl₂ (終濃度 150 nM の free Ca²⁺を得る) , pH7.4

- ・ HEK 293 細胞膜画分：50 ng protein / assay (\pm Gq α)

酵素反応は 37°C で 30 分間行い、反応停止は 2N HCl を等容加えた。その後、クロロホルム/メタノール (1:1 混合液) を再び等容加えて、12,000 rpm で 10 分間遠心分離した。遠心後、水層 (加水分解された IP₃ を含む) を回収して、液体シンチレーションカウンターにより、含まれる [³H]IP₃ を定量した。酵素活性は全て比活性で表記した。

3-2-9：抗体及び用いた脂質について

用いた抗体、抗 PLC β 1, 2, 3, 4 抗体は全て Santa Cruz Biotechnology から購入した。脂質は Avanti あるいは Sigma から購入した。ラット脳からの NAP-22 の精製は以前に報告した通りに行った (Maekawa et al., 1999)。

3-3：結 果

3-3-1：18-6D4 抗原の局在とその可溶性

脳を DRM 分画して得られたそれぞれの画分における 18-6D4 抗原の局在をウェスタンブロッティングによって検討した (図 8A)。生後 10 日齢では、可溶性画分では検出できず、膜由来画分においてその局在が検出されたが特に明瞭な局在性を示す画分はなかった。生後 3 週、13 週齢と、発育するにつれて DRM 画分への局在が明瞭になった。また、免疫沈降法により抗原を分画するために 18-6D4 抗原の可溶性を検討したところ、高塩強度下 (0.6 M NaCl) と DOC ではその一部が可溶化することが分かった (図 8B)。

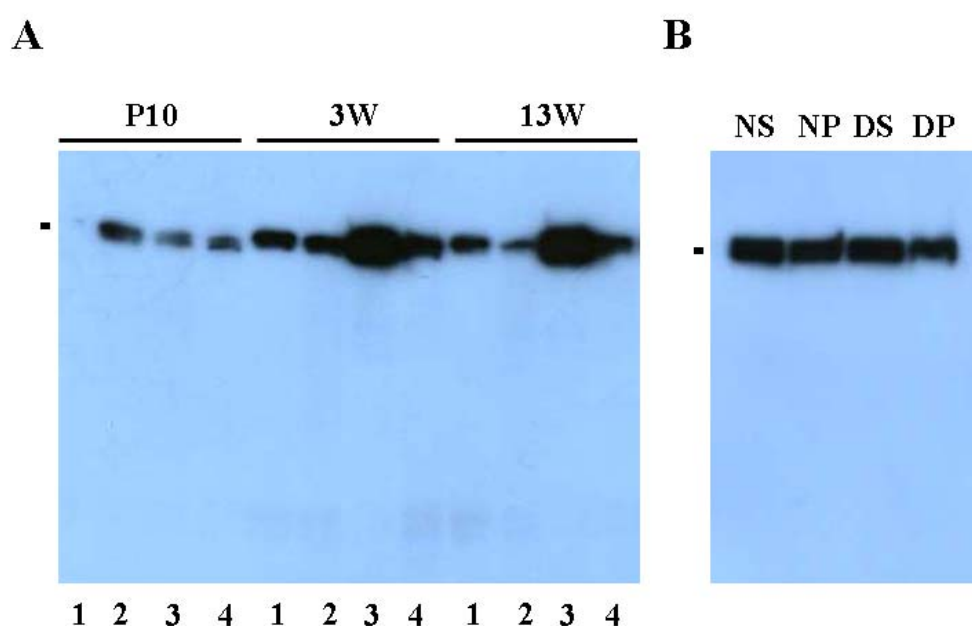


図 8 : 18-6D4 抗原の局在

- (A) 生後発育過程における 18-6D4 抗原の局在変化 : 生後 10 日齢では、可溶性画分 (lane 1) にその存在を検出することはできなかった。主に膜画分 (lane 2-4) において存在したが、明瞭に局在する画分はなかった。生後 3 週齢を過ぎると、DRM 画分において明瞭に局在した。Lane 1: 可溶性画分、lane 2: Triton X-100 可溶性画分、lane 3: DRM 画分、lane 4: A3 画分。各画分 $10\ \mu\text{g}$ のタンパク質を電気泳動した。全ての画分は Lowry 法によって定量し、等タンパク量 ($5\ \mu\text{g}$) を電気泳動した。
- (B) 18-6D4 抗原の可溶性 : 高塩強度 ($0.6\ \text{M NaCl}$)、あるいは DOC (0.5%) でシナプス膜由来 DRM 画分を可溶化した。18-6D4 抗原は、その一部を可溶化することができた。NS: NaCl による可溶化上清、NP : NaCl 不溶性画分 ; DS : DOC による可溶化上清、DP : DOC 不溶性画分。不溶性画分は可溶化上清と等容積の緩衝液によって懸濁、破碎した後に、それぞれ $10\ \mu\text{l}$ を電気泳動した。

18-6D4 抗体による免疫反応をドットで示す。

3-3-2 : 免疫沈降

18-6D4 抗体を用いて、 $0.6\ \text{M NaCl}$ で可溶化した DRM 画分から免疫沈降によって 18-6D4 抗原を濃縮した (図 9A)。SDS-PAGE では、明瞭な二本のバンドを確認することができた (図 9B)。低分子量の免疫反応陽性バンドは一部抗原が分解して生じたものであると判断した。脳を用いたウエスタンブロッティングではこのような反応は検出されなかった (図 8A)。免疫沈降法によって分画した 18-6D4 抗原を質量分析したところ、以下のペプチドが検出された。

FESFETSK, TEPNSSLAK, IISGQFLSDK, SPVEFVEYNK, QEQVQVLIEK, ETELLDLSLVK, SFEMSSFVETK, EVIEAIAECAFK, NIYRLFSADRK, QLAALTLEDEEEVK, LTDVAEECQNNQLK, RLPLEILEFVQEAMK

その結果、この抗原が PLC β 1 であり、PLC β 1 アイソフォーム a の一次配列と比較したところ、そのペプチド回収率は 23%であった。更に、免疫沈降画分を市販されている抗 PLC β 1, 3, 4 抗体、それぞれを用いてウエスタンブロットした結果、抗 PLC β 1 抗体にのみ陽性反応が得られた。PLC β 1 にはアイソフォーム a 及び b が報告されており、近接する二本のバンドの存在はこの報告と一致する

(Bahk et al., 1994)。また、PLC β 2 に関しては脳内での発現が非常に低いことが知られている (data not shown; Guo et al., 2005)。以上の結果から、18-6D4 抗原が PLC β 1 であると判断した。

3-3-3 : PLC β 1 の精製

DRM 画分から PLC β 1 を可溶化するために高塩濃度や DOC による処理を試みたがその一部を可溶化するだけであった。また、MCD を用いた Chl の抽出はその可溶化に効果は認められなかった。一方、37°C保温下での 2% Triton X-100 による処理は比較的効率良く可溶化したが、この方法によっても完全に可溶化するには至らなかった (図 9C)。この条件で可溶化した DRM 画分からカラムを用いて PLC β 1 を精製した (図 9D ; 方法は上述 3-2-6 を参照)。

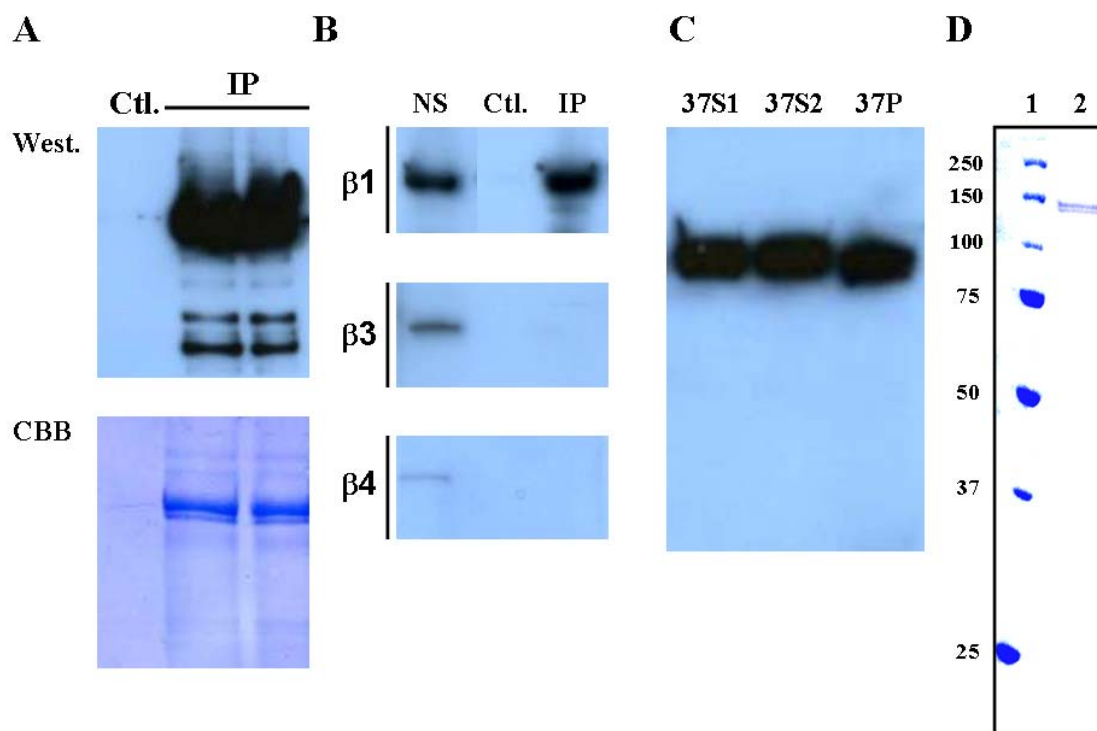


図 9 : 18-6D4 抗原の同定と精製

- (A) 免疫沈降 : シナプス膜由来 DRM 画分を 0.6 M NaCl で可溶化した画分から 18-6D4 抗体を用いて免疫沈降を行った。明瞭な二本のバンドが得られた (CBB)。質量分析によって、このバンドが PLC β 1 に由来するペプチドを含むことが判明した。
- (B) 市販抗体によるウエスタンブロッティング : 市販されている抗 PLC β

1, 3, 4 特異抗体それぞれを用いて、免疫沈降画分 (A) をウエスタンブロットした。その結果、抗 PLC β 1 抗体のみ陽性反応を得た。

(C) 2% Triton X-100/1 M NaCl による可溶化： 2% Triton X-100/1 M NaCl は他の可溶化条件よりも優れていたが、PLC β 1 を完全に可溶化することはできなかった。37S1：一度目の可溶化上清、37S2：二度目の可溶化上清、37P：不溶性画分。不溶性画分は可溶化上清と等容積の緩衝液で懸濁、破碎した。

電気泳動には、等容積のサンプルを電気泳動した (方法 3-2-4、3-2-5 参照)。

(D) 精製 PLC β 1：シナプス膜由来 DRM 画分を 2% Triton X-100 で可溶化した上清から、ハイドロキシアパタイトカラム、DEAE-イオン交換カラム、ヘパリン-Sepharose カラムを用いて PLC β 1 を精製した。各カラムの後、PLC β 1 を含む画分の選択にはウエスタンブロットングを用いた。

3-3-4：精製 PLC β 1 の活性測定

PIP₂ を含むリポソームを基質として精製 PLC β 1 の活性を測定した。以前に報告のあった、Sf9 細胞にバキュロウイルスを用いて遺伝子導入・発現させて調製した PLC β 1 (His₆-tagged recombinant) と同等の酵素活性を有していた (図 10A) (Biddlecome et al., 1996)。また、PLC が Gq α によって活性化されることから、HEK293 細胞に Gq α を遺伝子導入・発現させて、その膜画分を Gq α タンパク質として精製 PLC β 1 の活性化に用いた (図 10A) (Hepler et al. 1993)。Gq α によって PLC β 1 の活性は約 2 倍に上昇した。しかしながら、Gq α を導入していない HEK293 細胞膜画分にも酵素活性の上昇が検出された。この現象は本測定過程では常に起こった。HEK293 細胞膜自身に PLC 活性は検出されなかったことから (data not shown)、PLC を活性化する因子を含んでいるのかもしれない。しかし、Gq α が有意に PLC β 1 を活性化することは確認できた。

次に、構成脂質の総モル数を一定にして、Chl あるいは PC を PE 主体のリポソームに加えた際、酵素活性に与えるその量依存的な影響を検討した (図 10B)。Chl を加えても、その活性に有意な影響を見出すことはできなかった。しかしながら、PC を加えるとその量依存的に著しく活性を低下させることが明らかとなった。

更に、脂質結合性タンパク質 NAP-22 が酵素活性に与える影響についても併せて検討した (図 10C,D,E)。リポソームの組成を PIP₂/PE (C)、PIP₂/PE/Chl (D)、PIP₂/PE/PC (E) と変化させて、その影響を検定したところ、それぞれの組成において、NAP-22 の量依存的に酵素活性を減少させた。

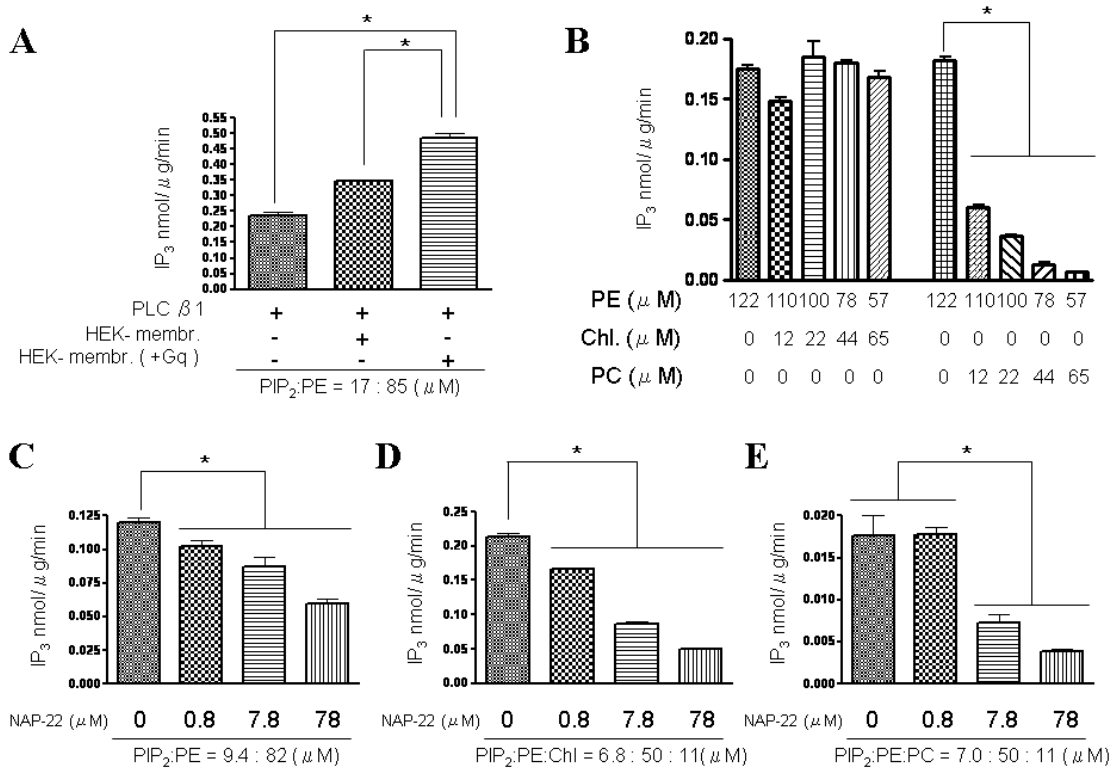


図 10 : 精製 PLC β 1 活性の測定

(A) Gq α による活性化 : 精製 PLC β 1 は Gq α を含む HEK293 細胞膜画分によって有意に活性化された (約 2 倍)。

(B) 人工基質膜の脂質組成が酵素活性に与える影響について : リポソームを構成する PE を減らして Chl を添加、更にその量を増加させても活性に影響は無かったが、PC はその量依存的に酵素活性を著しく阻害した。

(C,D,E) NAP-22 が酵素活性に与える影響について : NAP-22 を、様々な組成のリポソームに添加してその酵素活性を測定した。NAP-22 はその量依存的に活性を阻害した。用いたリポソームの組成は、PIP₂/PE (C)、PIP₂/PE/Chl (D)、PIP₂/PE/PC (E) を用いた。

Bar は SEM (n=4) を示す (* $P < 0.0001$)。

3-3-5 : PLC β アイソフォームの局在とその可溶性

脳内には、 $\beta 1$ アイソフォームの他に $\beta 3$ 及び $\beta 4$ アイソフォームが発現している (Day et al., 2002)。これらのアイソフォームに関してその DRM 局在を検討した (図 11A)。 $\beta 3, \beta 4$ 共に DRM 画分において明瞭に局在する。更に、Triton X-100 (2%; 37°C) で可溶化を試みた (図 11B)。 $\beta 3$ は一部可溶化することができたが、 $\beta 4$ に関してはほとんど可溶化することはできなかった。

次に、シナプス膜由来画分における PLC $\beta 1$ 、Gq α 、NAP-22 の局在について検討した (図 11C)。DRM 画分では (C; lane 3)、これらのタンパク質を全て検出することができた。

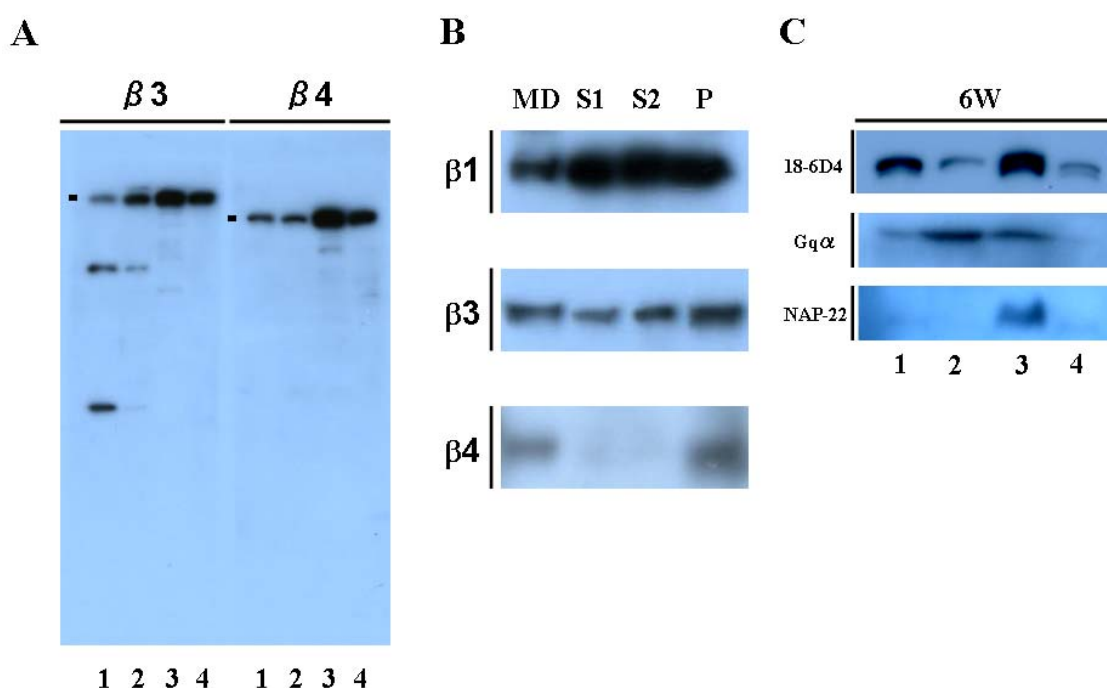


図 11 : PLC $\beta 3$ 及び $\beta 4$ の局在とその可溶性

- (A) PLC $\beta 3$ 及び $\beta 4$ の局在 : PLC $\beta 3$ 及び $\beta 4$ アイソフォームの局在をウエスタンブロッティングによって検討した。両アイソフォーム共に DRM 画分において明瞭な局在を示した (lane 3)。Lane 1: 可溶性画分、lane 2: Triton X-100 可溶性画分、lane 3: DRM 画分、lane 4: A3 画分。Lowry 法によるタンパク定量後、各画分共に $10 \mu\text{g}$ のタンパク質を電気泳動した。
- (B) PLC $\beta 3$ 及び $\beta 4$ の可溶性 : シナプス膜由来 DRM 画分を用いて、 $\beta 3$ 及び $\beta 4$ アイソフォームの可溶性をウエスタンブロッティングによって検討した。可溶化は Triton X-100 (2%) によって行った。 $\beta 3$ アイ

ソフォームはその一部を可溶化することができたが、 $\beta 4$ は可溶化することができなかった。不溶性画分は可溶化上清と等容積の緩衝液で懸濁、破碎した後に $10 \mu\text{l}$ を電気泳動した。

- (C) シナプス膜由来画分における DRM 構成分子の局在 : PLC $\beta 1$ 、Gq α 、NAP-22 の局在について、ウエスタンブロットングによって検定した。DRM 画分では、これらの分子全て検出することができた。Lane 1: シナプス膜画分 (SPM)、lane 2: Triton X-100 可溶性画分 (SPM-TxS)、lane 3: DRM 画分 (SPM-DRM)、lane 4: Triton X-100 不溶性高比重膜画分 (SPM-A3)。Lowry 法による定量後、タンパク量 $1 \mu\text{g}$ を電気泳動した。

3-4 : 考 察 (小括 3)

3-4-1 : 微小領域構成分子 PLC $\beta 1, 3, 4$ とその可溶性

PLC $\beta 1$ を新規微小領域構成分子として同定した (図 8, 9)。PLC $\beta 1$ 及び PLC $\beta 3$ が 2% Triton X-100 でその一部を可溶化することができたが、PLC $\beta 4$ は可溶化できなかった (図 11)。PLC β アイソフォーム間においても DRM への親和性は異なることが明らかとなった。

しかしながら、PLC β の膜局在については不明な点も多く残されている。PLC $\beta 1$ の膜への局在とその Gq α による活性化には C 末端に存在する塩基性領域が重要であること、また PLC $\beta 1$ と PLC $\beta 2$ の膜への結合には PIP₂ と G タンパク質の α 、 β 、 γ サブユニットには依存しないと報告されている (Kim et al, 1996; Runnels et al. 1996; Rebecchi and Pentylala 2000)。PLC β の C 末には PDZ ドメインを認識する領域が存在しており、これが膜下における足場タンパク質と結合することによって膜局在に機能しているのかも知れない (Rebecchi and Pentylala, 2000)。例えば PLC $\beta 3$ は、PDZ ドメインを有する足場タンパク質 shank2 と結合することによってシナプス後肥厚領域に局在することができる (Hwang et al. 2005)。今回得られた結果が示すように、DRM 親和性の違いが各アイソフォームの分子特性として存在しているのか、他の相互作用分子の影響によるのか、またそれぞれのアイソフォームが同じ微小領域に存在するかということについて現段階で言及することはできない。DRM 画分の細分画と相互作用解析によって検討することがこれからの課題の一つである。

3-4-2 : 精製 PLC $\beta 1$ の活性

PLC β をシナプス膜由来 DRM 画分から精製した。精製した PLC $\beta 1$ はこれまでに報告された比活性と比較して同程度の活性を有していた (Biddlecome et al.,

1996)。しかしながら、Gq α による活性化が約2倍程度であったのに対して（図10A）、過去の報告では5-10倍程度の活性化が検出されている（Hepler et al. 1993; Biddlecome et al., 1996）。DRM画分からの精製についてはこれまでに報告されていないため、Gq α による低い活性化の原因が、DRM画分から可溶化する際に生じたタンパク質構造への障害によるものなのか、DRMにおけるPLC β 1が本来有する特性であるかについては不明である。

精製 PLC β 1の活性は基質となるリポソームを構成する脂質組成に大きく影響を受けた（図10B）。Chlはその活性に影響を与えなかったが、PCはその量依存的に活性を阻害した。PIP₂を基質とするPLCにとって、PEに比較してPCの大きな極性基が立体障害となってPIP₂にアクセスできなくなることに起因すると推察される。

PLC β は様々な機能分子によってその活性を制御される。PLC β 1活性はホスファチジン酸（PA）によって活性化される（Litosch, 2000）。興味深いことに、PCをベースとする基質膜にPEを加えてもPLC β 1の膜への結合性に変化は無いのに対して、PAを加えるとその膜への結合は増加する。そして、PAの存在はその活性を著しく増加させる。一方、PLC β 2及び β 3はG β γ によって活性化される（Wang et al., 2000）。PCはこのG β γ による活性化を阻害する（Feng et al., 2005）。興味深いことに、G β γ はPLC β 1活性を阻害する（Litosch, 1997）。

更に、NAP-22はその量依存的にPLC β 1の活性を阻害した（図10C,D,E）。NAP-22が有する微小領域構成脂質への高い結合活性が、PLC β 1のPIP₂へのアクセスを阻害してその活性を低下させたと考えられる。

3-4-3：微小領域とPIP₂シグナリング

中枢神経系では、代謝型グルタミン酸受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体がPLC β を活性化することが知られている。これらの受容体に対するアゴニストを用いてシナプス膜画分を刺激することにより、PLC β 1のDRM局在性について検討したが、有意な局在変化を検出することはできなかった（data not shown）。

シナプス膜において、PLC β 1とその活性化因子Gq α が共存することを確認した（図11B）。NAP-22はカルモジュリン結合タンパク質であり、細胞内へのカルシウム流入やPKCによるリン酸化によって微小領域内葉から細胞質へと局在を変化させる（Terashita et al., 2002）。NAP-22もまたDRM画分に存在しており、この脂質シグナリングに関わる可能性がある。これらの結果は微小領域がPIP₂/PLCから始まる脂質シグナリングに重要な機能を有することを強く示唆している。PIP₂/PLCはまたその産物であるIP₃及びDAGを介して細胞骨格の制御やエンドサイトーシスに関与する（Martin 2001; Czech et al. 2003）。神経細胞で

は、神経活性や運動性を制御することが知られている (Biddlecome et al. 1996; Laux et al, 2000; Hannan et al 2001; Micheva et al. 2001; Di Polo et al. 2004; Wenk and De Camilli 2004)。また、PLC β 1 がシナプスの形態に与える影響について、そのノックアウトマウスを用いた電子顕微鏡観察からシナプススパインの構造に異常を来たすこと、更に代謝型グルタミン酸受容体タンパク質とのダブルノックアウトによって体性感覚野のバレル構造の崩壊がその主徴として報告されている (Hannan et al 2001; Spires et al., 2004)。

このように、微小領域構成分子として PLC β 1, 3, 4 を見出したことは、微小領域が脂質シグナリングに関与することを強く支持している。また、微小領域における PLC β 1 とその関与する PIP₂ シグナリングが神経細胞の形態に与える影響について解析を進める必要がある。しかしながら、PLC β 1 の細胞内局在、特にカルシウム流入や受容体アゴニスト刺激をかけた際の局在変化については未だ十分に検討していない。微小領域における相互作用解析と共に、培養細胞系を用いた薬理的局在解析、その形態に与える影響について解析することが必要であると考えている。

まとめ（総括）

得られた知見を以下にまとめる。

第1章：アクチン繊維と相互作用する微小領域構成分子の同定

- 1) 細胞膜からアクチン繊維結合性分子を分離する方法を確立した。
- 2) アクチン繊維結合性 DRM 構成分子として、オリゴデンドロサイトマーカータンパク質 CNPase、MOG、PLP を分離・同定した。
- 3) CNPase、MOG、PLP はそれぞれ異なるアクチン繊維結合様式を示した。

オリゴデンドロサイトは中枢ミエリンを形成し、軸索に巻きつけたその膜構造は非常に複雑な形態を呈する。その形態形成及び維持にアクチン繊維は重要であり、またアクチン繊維結合性微小領域構成分子を探索した結果、オリゴデンドロサイトマーカータンパク質が検出されたことは、微小領域が細胞形態の維持・制御に重要な機能を有することを示しただけでなく、脳内において量的にもその占める割合が高いことを反映している。

第2章：微小領域における Na^+ , K^+ -ATPase の同定と解析

- 1) 微小領域局在性 ATPase として、 Na^+ , K^+ -ATPase を見出した。
- 2) $\alpha 1$ アイソフォームによる Na^+ , K^+ -ATPase 活性は選択的にシナプス膜由来 DRM 画分に局在し、その活性の約 90%を担うことが明らかとなった。
- 3) ウアバイン刺激によって $\alpha 3$ アイソフォームが DRM へ局在化した。

微小領域が ATP 依存的なイオン輸送に機能することを示す重要な知見であると考えている。シナプス膜由来 DRM における Na^+ , K^+ -ATPase α サブユニットの局在がそのアイソフォーム依存的なメカニズムによって調節されていることを示す結果を得ることができた。この結果は刺激依存的な分子動態を解析する上で、有効なターゲットになる。相互作用分子の特定と共に、培養細胞を用いた局在解析が課題である。

第3章：モノクローナル抗体を用いた微小領域構成分子の同定と解析

- 1) 微小領域構成分子として PLC β 1,3,4 を同定した。
- 2) PC は PLC β 1 活性を著しく阻害した。
- 3) NAP-22 は PLC β 1 活性をその量依存的に阻害した。

微小領域構成分子として PLC β を同定したことは微小領域が PIP₂ シグナリングに機能することを強く支持する。また、基質となる脂質組成によって活性が制御されるという結果は、その膜局在あるいは局在変化が PLC 活性を制御する可能性を示唆している。NAP-22 の脂質結合特性を考慮すると、その PIP₂ シグナリングへの関与について検討する必要がある。PLC β 1 の組織形態形成への関与

はこれまでに複数の報告がなされており、微小領域が関わる分子経路について解析することが必要である。

このように、本研究によって得られた知見は脳由来細胞膜微小領域が多彩な細胞機能に関わることを示したと共に、新規構成分子の同定と解析を通して、微小領域をより詳細に解析する手掛かりを得ることができたと位置付けられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、
本学自然科学研究科 生命機構科学専攻 前川昌平 先生に御指導頂きました。

また、本学位論文の審査と多数の有益な助言を
本学自然科学研究科 生命機構科学専攻 林 文夫 先生
本学自然科学研究科 生命資源科学専攻 北川 浩 先生 に頂きました。

厚く御礼申し上げます。

質量分析に関して、
本学バイオシグナル研究センター 米澤 一仁 先生、吉野 健一 先生
国立精神・神経センター神経研究所 診断研究部
中村 俊 先生、熊ノ郷 晴子 先生 に御協力頂きました。

免疫組織・細胞化学に関して、
京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科 応用生物学部門
宮田 清司 先生 に御協力頂きました。

PLC β 1 と微小領域構成脂質の解析に関して、
兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 生体物質機能解析学部門
八木澤 仁 先生 に御協力頂きました。

抗 MOG 抗体の供与に関して、
Department of Biochemistry, La Trobe University
Claude Bernard 先生 に御協力頂きました。

Gq α 発現用プラスミドの供与に関して、
奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科
伊東 広 先生 に御協力頂きました。

厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Anderson R., 1998. The caveola membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 199-225.
- Asou H., Hamada K., Miyazaki T., Sakota T., Hayashi K., Takeda Y., Marret S., Delpech B., Itoh K., Uyemura K., 1995. CNS myelinogenesis in vitro: time course and pattern of rat oligodendrocyte development. *J. Neurosci. Res.* 40: 519-534.
- Aspenstorem P., 1999. Effects for the Rho GTPase. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 95-102.
- Bahk Y.Y., Lee Y.H., Lee T.H., Seo J., Suh P.G., 1994. Two forms of phospholipase C- β 1 generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 269: 8240-8245.
- Baryiko B., Gerber S.H., Binns D.D., Grichine N., Khvotchev M., Sudhof T.C., Albanesi J.P., 2001. A novel family of phosphatidylinositol 4-kinases conserved from yeast to humans. *J. Biol. Chem.* 276: 7705-7708.
- Biddlecome G.H., Berstein G., Ross E.M., 1996. Regulation of phospholipase C- β 1 by Gq and m1 muscarinic cholinergic receptor. *J. Biol. Chem.* 271: 7999-8007.
- Bifulco M., Laezza C., Stingo S., Eolff J., 2002. 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 1807-1812.
- Blanco G., Mercer R.W., 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275: F633-F650.
- Bliss T.V.P., Collingridge G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.
- Bögler O., Noble M., 1994. Measurement of time in oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitors is a cellular process distinct from differentiation or division. *Dev. Biol.* 162: 525-538.
- Boggs J.M., Rangaraj G., 2000. Interaction of lipid-bound myelin basic protein with actin filaments and calmodulin. *Biochemistry* 39: 327-335.
- Brown D.A., Rose J.K., 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544.
- Czech M.P., 2003. Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 791-815.
- De Angelis D.A., Braun P.E., 1996. 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase binds to actin-based cytoskeletal elements in an isoprenylation-independent manner. *J. Neurochem.* 67: 943-951.
- Desmond N.L., Levy W.B., 1986a. Changes in the numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 253: 466-475.

- Desmond N.L., Levy W.B., 1986b. Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 253: 476-482.
- Di Polo G., Moskowitz H.S., Gipson K., Wenk M.R., Voronov S., Obayashi M., Flavelli R., FitzSimons R.M., Ryan T.A., DeCamilli P., 2004. Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* 431: 415-422.
- Dyer C.A., Benjamins C.A., 1989. Organization of oligodendroglial membrane sheets. I: Association of myelin basic proteins and 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase with cytoskeleton. *J. Neurosci. Res.* 24: 201-211.
- Feng J., Roberts M., Drin G., Scarlata S., 2005. Dissection of the steps of phospholipase C β 2 activity that are enhanced by G β γ subunits. *Biochemistry* 44: 2577-2584.
- Foley T.D., 1999. The lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal, potently and selectively inhibits synaptic plasma membrane ecto-ATPase activity, a putative regulator of synaptic ATP and adenosine. *Neurochem. Res.* 24: 1241-1248.
- Funatsu N., Kumanogoh H., Sokawa Y., Maekawa S., 2000. Identification of gelsolin as an actin regulatory component in a Triton insoluble low density fraction (raft) of newborn bovine brain. *Neurosci. Res.* 36: 311-317.
- Funatsu N., Miyata S., Kumanogoh H., Shigeta M., Hamada K., Endo Y., Sokawa Y., Maekawa S., 1999. Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *J. Biol. Chem.* 274: 8224-8230.
- Gard A.L., Pfeiffer S.E., 1989. Oligodendrocyte progenitors isolated directly from developing telencephalon at a specific phenotypic stage myelinogenic potential in a defined environment. *Development* 106: 119-132.
- Gomez-Mouton C., Abad J.L., Mira E., Lacalle R.A., Gallardo E., Jimenez-Baranda S., Illa I., Bernad A., Manes S., Martinez-A. C., 2001. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 9642-9647.
- Gorini A., Canosi U., Devecchi E., Geroldi D., Villa R.F., 2002. ATPase enzyme activities during aging in different types of somatic and synaptic plasma membranes from rat frontal cerebral cortex. *Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psychi.* 26: 81-90.
- Guo Y., Rebecchi M., Scarlata S., 2005. Phospholipase C β 2 Binds to Inhibits Phospholipase C δ 1. *J. Biol. Chem.* 280: 1438-1447.
- Hall A., 1998. Rho GTPase and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.
- Hannan A.J., Blakemore C., Katsnelson A., Vitalis T., Huber K.M., Bear M., Roder J., Kim D., Shin H.S., Kind P.C., 2001. PLC- β 1 activated via mGluRs, mediates

- activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nature Neurosci.* 4: 282-288.
- Heppler J.R., Kozasa T., Smrcka A.V., Simons M.I., Rhee S.G., Sternweis P.C., Gilman A.G., 1993. Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11 alpha: Activation of purified phospholipase C isozymes by G α subunits. *J. Biol. Chem.* 268: 14367-14375.
- Holowka D., Sheets E.D., Baird B., 2000. Interactions between Fc (epsilon) RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 113: 1009-1019.
- Hwang J.I., Kim H.S., Lee J.R., Kim E., Ryu S.H., Suh, P.G., 2005. The interaction of phospholipase C- β 3 with Shank2 regulates mGluR-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* 280: 12467-12473.
- Ishizuka R., Kobayashi H., 2003. Organization of lipid rafts. *Seitai no kagaku* 54: 260-265.
- Johns T.G., Brnard C.C., 1999. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.* 72: 1-9.
- Jones D.H., Matus A.I., 1974. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined floatation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 356: 276-287.
- Jung J., Kim M., Choi S., Kim M.J., Suh J.K., Choi E.C., Lee K., 2006. Molecular mechanism of cofilin dephosphorylation by ouabain. *Cell. Signal.* In press.
- Jung J., Yoon T., Choi E.C., Lee K., 2002. Interaction of cofilin with triose-phosphate isomerase contributes glycolytic fuel for Na, K -ATPase via Rho-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 277: 48931-48937.
- Kalwy S.A., Smith R., Kidd G.J., 1997. Myelin proteolipid protein expressed in COS-1 cells is targeted to actin-associated surfaces. *J. Neurosci.Res.* 48: 201-211.
- Kim C.G., Park D., Rhee S.G., 1996. The role of carboxyl-terminal basic amino acids in Gq α -dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C- β 1. *J. Biol. Chem.* 271: 21187-21192.
- Kim T., Pfeiffer S.E., 1999. Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG. *J. Neurocytol.* 28: 281-293.
- Kim T., Pfeiffer S.E., 2002. Subcellular localization and detergent solubility of MVP17/rMAL, a lipid raft -associated protein in oligodendrocyte and myelin. *J. Neurosci. Res.* 69: 217-226.
- Kirkham M., Parton R.G., 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 1745: 273-286.
- Kumanogoh H., Miyata S., Sokawa Y., Maekawa S., 2001. Biochemical and

- morphological analysis on the localization of Rac1 in neurons. *Neurosci. Res.* 39: 189-196.
- Laux T., Fukami K., Thelen M., Golub T., Frey D., Caroni P., 2000. GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P₂ at plasmalemmal rafts, and regulates cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell Biol.* 149: 1455-1471.
- Lingrel J., Moseley A., Dostanic I., Cougnon M., He S., James P., Woo A., O'conor K., Neumann J., 2003. Functional roles of the α isoforms of the Na, K- ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986: 354-359.
- Litosch L., 1997. G-protein $\beta \gamma$ subunits antagonize protein kinase C-dependent phosphorylation and inhibition of phospholipase C- β 1. *Biochem. J.* 326: 701-707.
- Litosch L., 2000. Regulation of phospholipase C- β 1 activity by phosphatidic acid. *Biochemistry* 39: 7736-7743.
- Liu L., Mohammadi K., Aynafshar B., Wang H., Li D., Kiu J., Ivanov A.V., Xie Z., Askari A., 2003. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺/K⁺-ATPase. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284: C1550-C1560.
- London E., 2002. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 480-486.
- Maekawa S., Iino S., Miyata S., 2003. Molecular characterization of the detergent-insoluble cholesterol-rich membrane microdomain (raft) of the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1610: 261-270.
- Maekawa S., Kumanogoh H., Funatsu N., Takei N., Inoue K., Endo Y., Hamada K., Sokawa Y., 1997. Identification of NAP-22 and GAP-43 (neuromodulin) as major protein components in a Triton insoluble low density fraction of rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1323: 1-5.
- Maekawa S., Sakai H., 1988. Isolation of 110K action binding protein from mammalian brain and its Immunocytochemical localization within cultured cells. *Exp. Cell Res.* 178: 127-142.
- Maekawa S., Sato C., Kitajima K., Funatsu N., Kumanogoh H., Sokawa Y., 1999. Cholesterol-dependent localization of NAP-22 on a neuronal membrane microdomain (raft). *J. Biol. Chem.* 274: 21369-21374.
- Manes S., Mira E., Gomez-Mouton C., Lacalle R.A., Keller P., Labrador J.P., Martinez-A. C., 1999. Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J.* 18: 6211-6220.
- Marta C.B., Taylor C.M., Coetzee T., Kim T., Winkler S., Bansal R., Pfeiffer S.E., 2003. Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation

- and cell morphology. *J. Neurosci.* 23: 5461-5471.
- Martin T.F.J., 2001. PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 493-499.
- Masserini M., Palestini P., Pitto M., 1999. Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system. *J. Neurochem.* 1-11.
- Micheva K.D., Holz R.W., Smith S.J., 2001. Regulation of presynaptic phosphatidylinositol4,5-bisphosphate by neuronal activity. *J. Cell Biol.* 154: 355-368.
- Minogue S., Anderson J., Waugh M.G., dos Santos M., Corless S., Cramer R., Hsuan J.J., 2001. Cloning of a human typeII phosphatidylinositol 4-kinase reveals a novel lipid kinase family. *J. Biol. Chem.* 276: 16635-16640.
- Mizuno N., Kokubu H., Sato M., Nishimura A., Yamauchi J., Kurose H., Itoh H., 2005. G protein-coupled receptor signaling through Gq and JNK negatively regulates neural progenitor cell migration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102: 12365-12370.
- McCarthy K.D., de Vellis J., 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85: 890-902.
- Meivar-Levy I., Sabanay H., Bershadsky A.D., Futerman A.H., 1997. The role of sphingolipids in the maintenance of fibroblast morphology. The inhibition of protrusial activity, cell spreading, and cytokinesis induced by fumonisin B1 can be reversed by ganglioside GM3. *J. Biol. Chem.* 272: 1558-1564.
- Nakai Y., Sakurai Y., Yamaji A., Asou H., Umeda K., Itoh K., 2000. Lysenin-sphingomyelin binding at the surface of oligodendrocyte lineage cells increases during differentiation in vitro. *J. Neurosci. Res.* 62: 521-529.
- Nebl G., Fischer S., Penzel R., Samstag Y., 2004. Dephosphorylation of cofilin is regulated through Ras and requires the combined activities of the Ras-effectors MEK and PI3K. *Cell. Signal.* 16: 235-243.
- Palmer E., Hernandez J.M., Saborio L.M., 1984. Actin-based gelation cytoplasmic extracts from brain tissue. *J. Neurosci. Res.* 64: 235-241.
- Pelkmans L., 2005. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 1746: 295-304.
- Peniston J.T., Filoteo A.G., McDonough C.S., Carafoli E., 1988. Purification, reconstitution, and regulation of plasma membrane Ca²⁺-pumps. *Methods Enzymol.* 157: 340-360.
- Plesner L., 1995. Ecto-ATPases: identities and functions, *Int. Rev. Cytol.* 158: 140-214.
- Rebecchi M.J., Pentylala S.N., 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80: 1291-1335.
- Reindl M., Linington C., Brehm U., Egg R., Dilitz E., Deisenhammer F., Poewe W.,

- Berger T., 1999. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neuroglial diseases: a comparative study. *Brain* 122: 2027-2056.
- Rietveld A., Simons K., 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta* 1376: 467-479.
- Rodriguez de Lores Arnaiz G., Reives A., Herbin T., Pena C., 1998. Na⁺, K⁺ -ATPase interaction with a brain endogenous inhibitor (endobainE). *Neurochem. Int.* 33: 425-433.
- Runnels L.W., Jenco J., Morris A., Scarlata S., 1996. Membrane binding of phospholipase C- β 1 and C- β 2 is independent of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the α and β γ subunits of G proteins. *Biochemistry* 35: 16824-16832.
- Sakasegawa Y., Hachiya N., Kaneko K., 2003. Prion disease and lipid rafts. *Seitai no kagaku* 54: 316-320.
- Sakurai T., Nukina N., 2003. Amyloid precursor protein and lipid rafts. *Seitai no kagaku* 54: 291-296.
- Shimizu T., Toyoshima Y.Y., Vale R.D., 1993. Use of ATP analogs in motor assays. *Methods Cell Biol.* 39: 167-177.
- Simons K., Ikonen E., 1997. Functional rafts in cell membrane. *Nature* 387: 569-572.
- Simons M., Kramer E.M., Thile C., Stoffel W., Trotter J., 2000. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramid-rich membrane domain. *J. Cell Biol.* 151: 143-154.
- Simons K., Toomre D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 31-39.
- Singer S.J., Nicolson G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Spudich J.A., Watt S., 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246: 4866-4871.
- Spires T.L., Molnár Z., Kind P.C., Cordeley P.M., Upton A.L., Blakemore C., Hannan A.J., 2004. Activity-dependnet regulation of synapse and dendritic spine morphology in developing barrel cortex requiries phospholipase C- β 1 signaling. *Cerebral Cortex* 15: 385-393.
- Swadner K.J., 1989. Isozymes of the Na⁺/K⁺- ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 988: 185-220.
- Terashita A., Funatsu N., Umeda M., Shimada Y., Ohno-Iwashita Y., Eband R.M.,

- Maekawa S., 2002. Lipid binding activity of a neuron-specific protein NAP-22 studied in vivo and in vitro. *J. Neurosci. Res.* 70: 172-179.
- Taylor C.M., Coetzee T., Pfeiffer S.E., 2002. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomain of the myelin membrane. *J. Neurochem.* 81: 993-1004.
- van Aelst L., D'Souza-Schorey C., 1997. Rho GTPase and signaling networks. *Genes Dev.* 11: 2295-2322.
- Wang T., Dowal L., Rebecchi M., Scarlata S., 2000. The pleckstrin homology domain of phospholipase C- β_2 links the binding of $G\beta\gamma$ to the catalytic core. *J. Biol. Chem.* 275: 7466-7469.
- Wang H., Haas M., Liang M., Cai T., Tian J., Li S., Xie Z., 2004. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolae Na^+ / K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 279: 17250-17259.
- Waugh M.G., Minogue S., Chotai D., Berditchevski F., Hsuan J.J., 2006. Lipid and peptide control of phosphatidylinositol 4-kinase II α activity on Golgi-endosomal rafts. *J. Biol. Chem.* 281: 3757-3763.
- Weimbs T., Stoffel W., 1992. Proteolipid protein (PLP) of CNS myelin: positions of free, disulfide-bonded, and fatty acid thioester-linked cysteine residues and implications for the membrane topology of PLP. *Biochemistry* 31: 12289-12296.
- Wenk M.R., De Camilli P., 2004. Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: Insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101: 8262-8269.
- Yoshinaka K., Kumanogoh H., Nakamura, S., Maekawa S., 2004. Identification of V-ATPase as a major component in the raft fraction prepared from the synaptic plasma membrane and the synaptic vesicle of rat brain. *Neurosci. Lett.* 363, 168-172.
- Zabe M., Dean W.L., 2001. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase associates with the cytoskeleton in activated platelets through a PDZ-binding domain. *J. Biol. Chem.* 276: 14704-14709.
- Zach W.H., 1992. *An introduction to molecular neurology.* Sinauer Associates, Inc.

発表論文

- 1) Miyata S., Shinga I., **Taguchi K.**, Nakashima T., Kiyohara T., Ohira A., 2002. Chondroitin sulfate proteoglycan Phosphacan/RPTP β in the hypothalamic magnocellular nuclei. *Brain Res.* 949: 112-121.
- 2) Miyata S., Matsumoto N., **Taguchi K.**, Akagi A., Iino T., Funatsu N., and Maekawa S., 2003. Biochemical and ultrastructural analyses of IgLON cell adhesion molecules, Kilon and OBCAM in the rat brain. *Neuroscience* 117: 645-658.
- 3) Miyata S., **Taguchi K.**, and Maekawa S., 2003. Dendrite-associated opioid-binding cell adhesion molecule localizes at neurosecretory granules in the hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience* 122: 169-181.
- 4) Iino S., **Taguchi K.**, Maekawa S., Nojyo Y., 2004. Motor, sensory and autonomic nerve terminals containing NAP-22 immunoreactivity in the rat muscle. *Brain Res.* 1002: 142-150.
- 5) Maekawa S., **Taguchi K.**, 2004. Localization of the Cl⁻-ATPase activity on NAP-22 enriched membrane microdomain (raft) of rat brain. *Neurosci. Lett.* 362: 158-161.
- 6) **Taguchi K.**, Yoshinaka K., Yoshino K., Yonezawa K., and Maekawa S., 2005. Biochemical and morphological evidence of the interaction of oligodendrocyte membrane rafts with actin filaments. *J. Neurosci. Res.* 81: 218-225.
- 7) **Taguchi K.**, Kumanogoh H., Nakamura S., Maekawa S.
Ouabain-induced isoform-specific localization change of the Na⁺, K⁺-ATPase α subunit in the synaptic plasma membrane of rat brain. *Neurosci. Lett.* (in press)
- 8) **Taguchi K.**, Kumanogoh H., Nakamura S., Maekawa S. Localization of phospholipase C β 1 on the detergent-resistant membrane microdomain prepared from the synaptic plasma membrane fraction of rat brain. *J. Neurosci. Res.* (in press)

以下は現在投稿中

- 1) **Taguchi K.**, Kumanogoh H., Nakamura S., Miyata S., Maekawa S. Myelin protein zero is one of the components of the detergent-resistant membrane microdomain fraction prepared from rat pituitary. *J. Mol. Histol.*