



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。



【 3 0 6 】

氏 名・（本 籍） 田口 勝敏 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（理学）

学 位 記 番 号 博い第345号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

ラット脳由来細胞膜微小領域構成分子の同定と解析

審 査 委 員

主 査 教 授 前川 昌平

教 授 林 文夫

教 授 北川 浩

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。

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

第2章 微小領域に存在する Na^+, K^+ -ATPase の同定と解析

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

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。

《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》

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。

《第2章 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

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。

《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》

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トングによって同定したところ、ホスホリパーゼ $\text{C}\beta 1$ (PLC $\beta 1$)であることが明らかとなった。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。PLC $\beta 1$ の微小領域における局在は生後発育過程にしたがって上昇した。微小領域における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、PLC $\beta 1$ が微小領域構成分子

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見出す結果を得ることができた。

氏名	田口 勝敏		
論文 題目	ラット脳由来細胞膜微小領域構成因子の同定と解析		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	前川 昌平
	副査	教授	林 文夫
	副査	教授	北川 浩
	副査		

要 旨

「序」

動物細胞の細胞膜中には種々の分子構成を持つ微小領域(microdomain)が存在すると認識されてきた。これらの領域の脂質は低温下で非イオン性の界面活性剤に不溶性であるため、この領域の多くは界面活性剤処理後、低比重画分 (detergent-resistant low-density membrane microdomain fraction; DRM) に回収されると考えられている。この手法はこれまでの膜成分の解析法に新たな手段を提供するものとして注目されている。またこの画分に種々の情報伝達因子の集積が見られることより、膜微小領域は情報伝達・情報変換のプラットフォームとして機能する可能性がある。このため、種々の細胞・組織における DRM の構成因子の解析が進んできた。一方このような生化学的手法においては、細胞や組織の種々の微小領域が1つの DRM として回収されるため、微小領域での分子間相互作用を解析するためには DRM を細分画する必要がある。多様な細胞より構築され、情報伝達のための発達した膜系を有しており、かつ細胞極性の発達した脳組織においてはこのことは特に重要である。本論文はラット脳由来の DRM を対象にその構成因子の解析を行ったものである。

「研究の概略」

本論文は3部より構成されている。

第1部では細胞骨格系と DRM との関連を探るべく、シナプス細胞膜画分を界面活性剤処理により可溶化した試料中のアクチンの重合条件を見だし、これを利用して、アクチン系細胞骨格因子と結合する DRM を分離することに成功した。この DRM の構成タンパク質を解析し、CNPase、proteolipid protein (PLP)、myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 等の局在を見だし、更にこれらの分子のアクチン繊維に対する結合性の解析を行った。これらがいずれもオリゴデンドロサイトのタンパク質であることより、培養オリゴデンドロサイトを用いて、形態学的な局在解析を行い、これらのタンパク質が確かにアクチン繊維と共局在すること、コレステロールとも局在を同じくすること、その一部は界面活性剤処理でも可溶化されないことを確認した。以上の結果は中枢ミエリンの形成や維持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。

第2部では DRM 構築因子の可溶化による同定を行った。シナプス細胞膜由来の DRM を可溶化し、ハイドロキシアパタイトカラムを用いて部分精製した画分の質量分析による解析を行った。その結果、主要な因子の1つが Na^+ , K^+ -ATPase (Na/K -ATPase) であるという結果を得た。他の組織や細胞系ではこのタンパク質は DRM に回収されないと報告されているため、この結果は意外であったが、特異抗体による免疫プロット法や活性測定においてもこの結果は確認された。ラットにおいては Na/K -ATPase の 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グリア細胞では、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ の発現が、神経細胞では $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ の発現が報告されている。シナプス細胞膜由来の DRM にもこの両者が含まれていた。

氏名	田口 勝敏		
論文 題目	ラット脳由来細胞膜微小領域構成因子の同定と解析		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	前川 昌平
	副査	教授	林 文夫
	副査	教授	北川 浩
	副査		

ウアバインはこの ATPase の阻害剤として有名であり α サブユニットに結合し、活性を阻害する。最近脳を含む諸臓器に内在性のウアバイン様活性因子の存在が報告されている。DRM に情報伝達因子の集積が見られることより、ウアバイン処理によりこの ATPase の局在が変動するか否かをシナプス膜およびシナプトソーム画分を用いて検討した。その結果、 $\alpha 1$ アイソフォームについては有意な変化は観察されなかったが、 $\alpha 3$ アイソフォームの経時的な DRM 移行を観察した。この結果は神経細胞においてウアバイン様活性因子が $\alpha 3$ アイソフォームを介してシグナル伝達に関与する可能性を示唆している。

第3部においては、DRM 画分を抗原にして、DRM 画分に局在する因子に対するモノクローン抗体を作成している。得られた抗体の1つは SDS-PAGE で分子量 140 kDa の近接した2本のバンドを認識した。免疫沈降による抗原の回収と濃縮後、質量分析により、この抗原を phospholipase C $\beta 1$ (PLC $\beta 1$) と同定した。PLC $\beta 1$ は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) を切断し、inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) と diacylglycerol を産生する情報伝達系の重要な酵素である。そこで DRM からのこの酵素の可溶化と精製を試み、ほぼ単一バンドを示すまでに精製する方法を確立した。活性測定の結果、従来報告されている程度の活性を有すること、三量体 Gq タンパク質の α サブユニットにより活性化されることを確認した。さらに基質である PIP₂ を含むリボソームの脂質組成を検討し、フォスファチジルコリンは活性を低下させるが、コレステロールは活性に影響しないことを見いだした。また神経膜 DRM の主要タンパク質である NAP-22 がこの酵素活性を低下させることを見いだした。これらの知見は DRM における脂質動態が種々の因子により調節されている可能性を示している。他の PLC β アイソフォームについても免疫プロット解析と可溶化の検討を行い、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ も DRM に局在するが、局在機構については異なる可能性も見いだしている。

以上の様に、本論文はラット脳由来の DRM 画分の構成因子を種々の手段を用いて同定し、機能解析を行ったものである。この結果として神経細胞のみならず、オリゴデンドログリア細胞膜においても微小領域が存在し、それは特にアクチン繊維系を相互作用することで細胞の形態形成に寄与することを見いだした。さらに神経細胞膜においては従来 DRM 構成因子ではないと考えられていた Na/K -ATPase が DRM 構成因子であること、その局在がアイソフォームにより異なること、さらに特異的阻害剤であるウアバイン処理によりアイソフォーム特異的な局在変化が誘起されることを始めて見いだした。内在性ウアバイン様因子の存在が明確になってきた状況を見ると、この知見は DRM が内在性ウアバイン様因子のシグナル伝達に関与する可能性を示している。一方 PLC $\beta 1$ の DRM 画分への局在の発見とその活性が膜脂質や DRM 局在タンパク質である NAP-22 により大きく影響されるという知見は細胞における情報伝達にこの微小領域が大きな役割を演じていることを示しており、今後の新たな発展の基礎となる結果である。

本論文は、ラット脳由来の DRM 画分中の種々の機能因子の同定と解析を行うことで神経細胞膜、グリア細胞膜における膜構造構築因子について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。

よって、学位申請者の 田口勝敏 は、博士(理学)の学位を得る資格があると認める。