

氏 名	熊ノ郷 晴 子
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 231 号
学位授与の日付	平成13年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	ラット神経細胞のraftタンパク質の解析
審 査 委 員	(主査) 教 授 宗 川 吉 汪 教 授 清 原 壽 一 教 授 伊 倉 宏 司 神戸大学大学院教授 前 川 昌 平

論文内容の要旨

申請論文は、1.「序論」、2.「方法と結果」、3.「考察」から構成されている。

「序論」では本論文の背景と目的が述べられている。近年、神経細胞の情報伝達に関与する重要な因子が神経細胞膜上の微小領域であるラフトに局在すると考えられるようになった。ラフトにはGPI-アンカー型タンパク質、膜貫通型タンパク質、三量体Gタンパク質、Src系チロシンキナーゼ、細胞骨格タンパク質などのシグナル伝達に関与するタンパク質が局在している。また同時に、ラフトは細胞の形態変化の制御やタンパク質のソーティングにも関与している可能性が高い。ラフトとはその物理化学的性質から非イオン性界面活性剤であるTritonX-100に不溶性で低比重の画分に回収される。そこで本研究では、神経系の情報伝達の分子機構の解明を目指して、ラット神経細胞のTritonX-100に不溶性で低比重の画分(ラフト)に局在する機能タンパク質の解析が行われた。

本論文の2.「方法と結果」は第1部、第2部、第3部から構成されている。各部の「結果」と「考察」の要旨を以下に記す。

第1部では、ラット脳組織から調製したラフト画分中に含まれる主要なタンパク質が分析された。三量体Gタンパク質の α および β サブユニット、神経系のカルモジュリン結合タンパク質であるNAP-22およびGAP-43、細胞骨格タンパク質のアクチンおよびチューブリンが主要なタンパク質として同定された。神経細胞ラフトにアクチンやチューブリンが含まれることから、細胞骨格タンパク質の調節機能をもつ低分子量Gタンパク質のRhoサブファミリー(Rho, Rac, Cdc42)もラフトに存在すると考察された。そこで第2部ではその可能性が検討された。その結果、RhoサブファミリーのうちRac1がラット全脳組織由来のラフト画分に局在することが判明した。RhoAやCdc42はTritonX-100可溶性画分に局在した。NAP-22は神経系ラフトマーカータンパク質として知られているので、Rac1とNAP-22の局在部位を海馬初代培養ニューロンを用いて免疫細胞化学的に比較した。両者とも神経突起において斑点状に局在したが、Rac1とNAP-22とは明らかに異なる部位に局在していた。このことは神経細胞において異なるタンパク質成分をもつラフトの存在を示唆する。最後に第3部では、ラット神経細胞ラフトに存在する未知のタンパク質の同定が試みられた。そのために、まず、ラット脳組織由来ラフト画分に対するモノクローナル抗体が多数作製された。得られた抗体を用いて新規のラフトタンパク質がスクリーニングされ、そのcDNAがクローニングされた。ところがこの研究途中で、Kilimannらがマウス、ヒト、およびニワトリ神経細胞の新規タンパク質としてパラレミンを報告したが、本研究で新規ラット神経細胞ラフトタンパク質としてクローニングしたタンパク質がパラレミンと一致していた。ラットパラレミンcDNA塩基配列から得られたアミノ酸配列から、パラレミンは等電点 $pI=4.7$ の非常に酸性のタンパク質で、C末端にプレニル化とパルミチル

化を受ける配列を有すると推定された。プレニル基あるいはパルミチル基によって細胞膜に結合すると考えられる。パラレミンはウエスタンブロッティングで非常にブロードなバンドパターンを示し、多くの翻訳後修飾を受けていることが示唆された。ラットの生後初期から幼若期ではパラレミンのスプライシングバリエーションが主に発現しており、幼若期以降に全長のパラレミンが発現した。パラレミンは神経細胞の細胞膜に局在し、主に海馬錐体細胞の樹状突起の存在する放射線層に強い局在を示した。シナプス領域では後シナプス膜に強い局在を示した。これらの結果からパラレミンは樹状突起の後シナプス領域において、ラフトを介したシグナル伝達に関与していると推察された。

論文審査の結果の要旨

近年、神経細胞の情報伝達に関与する重要な因子が神経細胞膜上の微小領域であるラフトに局在すると考えられるようになった。本論文は、神経細胞膜のラフトの構造と機能を明らかにすることを目的としている。まず、ラット神経細胞膜ラフトの主要なタンパク質として、三量体Gタンパク質の α および β サブユニット、NAP-22およびGAP-43、アクチンおよびチューブリンが同定された。つぎに、アクチンやチューブリンを調節するRac1がラフトに局在することが明らかにされた。Rac1とNAP-22は海馬初代培養ニューロン神経突起において異なる部位に局在していたことから、神経細胞において異なるタンパク質成分をもつラフトの存在が示唆された。さらに、ラット神経細胞ラフトに存在する新規タンパク質としてパラレミンが同定された。ラットのパラレミンはC末端にプレニル化とパルミチル化を受ける配列を有することから、これを介して細胞膜に結合すると考えられた。パラレミンは神経細胞の樹状突起にある放射線層に存在し、シナプス領域の後シナプス膜に強く局在することから、パラレミンはこの領域においてラフトを介したシグナル伝達に深く関与すると推察された。

以上、本研究では、神経細胞膜ラフトの主要タンパク質が分析され、Rac1およびパラレミンが神経細胞膜ラフトのタンパク質として新たに同定され、それらの局在が明らかにされた。これらの成果は、神経細胞膜ラフトの構造および機能に関して重要な示唆を与えるものであり、高く評価された。論文は慎重かつ丁寧に作成されており、論旨は極めて明解であった。本論文の内容は申請者を筆頭著者とする以下の2編の論文を基礎としている。なお、この他に申請者を著者とする5編の論文が公表されている。

1. Kashiwara, M., Miyata, S., Kumanogoh, H., Funatsu, N., Matsunaga, W., Kiyohara, T., Sokawa, Y., and Maekawa, S.: Changes in the localization of NAP-22, a calmodulin binding membrane protein, during the development of neuronal polarity.
「Neuroscience Research」誌 37巻 315頁 - 325頁(2000年)
2. Kumanogoh, H., Miyata, S., Sokawa, Y., and Maekawa, S.: Biochemical and morphological analysis on the localization of Rac1 in neurons. 「Neuroscience Research」誌 (2001年掲載予定)

(参考論文)

1. Maekawa, S., Kumanogoh, H., Funatsu, N., Takei, N., Inoue, K., Endo, Y., Hamada, K., and Sokawa, Y.: Identification of NAP-22 and GAP-43 (neuromodulin) as major protein components in a Triton insoluble low density fraction of rat brain.
「Biochimica Biophysica Acta」誌 1323巻 1頁 - 5頁 (1997年)
2. Funatsu, N., Kumanogoh, H., Y., Sokawa, Y., and Maekawa, S.: Identification of gelsolin as an actin regulatory component in a Triton insoluble low density fraction (raft) of newborn bovine brain.
「Neuroscience Research」誌 36巻 311頁 - 317頁 (2000年)
3. Maekawa, S., Sato, C., Kitajima, K., Funatsu, N., Kumanogoh, H., and Sokawa, Y.: Cholesterol-dependent

localization of NAP-22 on neuronal membrane microdomain (raft).

「Journal of Biological Chemistry」誌 274巻 21369頁 - 21374頁 (1999年)

4. Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Sigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., Sokawa, Y., and Maekawa, S.: Characterization of novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family.

「Journal of Biological Chemistry」誌 274巻 8224頁 - 8230頁 (1999年)

5. Uematsu, A., Kumanogoh, H., Yasaka, K., Sokawa, J., Orito, A., Miyata, S., Sokawa, Y., and Maekawa, S.: Specific localization of the vacuolar H⁺-ATPase in the Triton insoluble low-density fraction (raft) of bovine chromaffin granule membrane.

「Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics」誌 4巻 395頁 - 400頁 (2000年)