

細胞膜ラフト領域局在化シグナルの解明

●前川昌平

神戸大学大学院自然科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

細胞膜ラフトは膜中の微小領域であり種々の機能分子の局在より細胞機能における役割が注目されている。その脂質2重膜の外葉 (outerleaflet, OL) にはコレステロール (CHL) とスフィンゴ脂質の集積が知られているが、内葉 (inner leaflet, IL)の脂質組成やOL, IL間の連絡等についてはほとんど知られていない。本研究の目的はラフト領域に局在する脂質とタンパク質の同定とそれらのタンパク質-脂質相互作用やタンパク質間相互相互作用を解析し、ラフト局在にかかわるシグナルを同定することである。この為ラット脳由来のラフトに局在する因子を同定し、それらの脂質との相互作用、タンパク質間相互作用を解析する。

〈研究開始時の研究計画〉

当初NAP-22のCHL結合部位の同定、ラフトの細分画による分子間相互作用の解析、カルシウムシグナルに伴うラフト構成因子の変化、膜貫通性ラフトタンパク質の膜貫通領域の解析に焦点をあて、以下の実験を行った。

- 1) NAP-22のコレステロール結合部位の同定。
- 2) 脳、培養細胞におけるラフト構築因子の同定。
- 3) ラフト構築因子の脂質との相互作用の解析。
- 4) 抗体を用いたラフトの細分画による分子間相互作用の解析。
- 5) ラフト調製における各種界面活性剤の比較検討。
- 6) ラフト局在タンパク質と相互作用するタンパク質の同定と機能解析

〈研究期間の成果〉

- 1) NAP-22のCHL結合部位の同定についてはまず全長をCOS7細胞に発現させ、発現部位とCHL局在が一致することを見出した。また大腸菌での発現・精製とリポソーム結合アッセイによりN末60残基まで結合部位を絞り込んだ。この過程でCHLのみならずフォスファチジルエタノールアミンの局在もNAP-22によって調節されることを見出した。さらにNAP-22が膜内にCHLの集合領域を誘起するという知見を得た(論文1, 3)。

さらにN末60残基中の有効配列を検索し32-40残基がPIP2以外の脂質結合に必須であること、20-25残基の欠失によりコレステロール結合性が低下することを見出した。培養細胞へのNAP-22の発現と細胞染色の組み合わせによりNAP-22がCHLとPEの集積領域を形成することを示した。

一方リポソームを用いた解析でNAP-22がコレステロールの集合領域を構築することを物理化学的手法で確認した(論文7, 8, 9, 11, 12, 14)。

- 2) ヒト神経芽細胞腫由来のSH-SY5Y細胞を用い神経突起の誘導に伴いラフト局在を示すタンパクとして stomatin like protein 2, KIAA0084, leucine-zipper EF-hand transmembrane protein1をみいだした。シナプス

膜に存在するサイクリックヌクレオチドフォスフォジエステラーゼ(PDE)を網羅的に解析し、PDE2が存在すること、さらにラフト局在を示すことを発見した。またmyosin Vがラフト領域に結合することを見出した(論文5)。

ラフト構成因子である細胞接着因子の局在と生理条件変化による局在変化を解析した(論文2, 4, 10, 12, 13)。シナプス小胞膜由来ラフトの主要成分がプロトン-ATPase(V-ATPase)であることを見出し、このATPase活性にコレステロールが重要であることを発見した。

ミエリン膜の解析によりラフト局在因子、PLP, MOG, CNPase等を同定しこれらの脂質結合性を解析しつつある。またBN-PAGEで分画したV-ATPaseに結合している脂質の同定を進めつつある。NAP-22, neurocalcin α については結合タンパク質を同定しその生理的意義を解析しつつある。またモノクローン抗体作成により新規ラフト局在タンパク質を見出しこれをNa⁺/K⁺-ATPaseと同定した。

- 3) 初代神経細胞系での脂質局在とNAP-22の存在を比較検討し、コレステロールとの局在一致を見出したがガングリオシドGM1やスフィンゴミエリンについては一致しない部位が多く存在するという知見を得た。すなわちラフトの多様性を形態レベルで確認した。
- 4) 免疫沈降を阻害しない界面活性剤を見出し、GAP-43, NAP-22, GPI-アンカー細胞接着因子、三量体Gタンパク質Go等による免疫沈降でそれぞれ異なった組成を持つ画分が得られることを見出した。これらの手法を組み合わせるラフト画分に局在を示すATPase(クロライドポンプ)がNAP-22抗体特異的に免疫沈降されることを見出した(論文15)。
- 5) ラフトの細分画による分子間相互作用の解析ではラフト因子の特異的抽出の試行/免疫沈降/Native Gelによるラフト成分の分画を行った。特にBlue-Native PAGEとMEGA10/sucrose monolaulate等による抽出法の組み合わせによりラフト成分を細分画することに成功し、すくなくとも4種類にラフトを分画した。また以上の結果をまとめて発表した(論文6)。
- 6) ラフトを構築する主要因子であるNAP-22については免疫沈降法により、可溶性画分、膜画分に存在する結合タンパク質を同定を進めてきた。またカルシウムイオン依存性にラフト局在を示す諸タンパク質のうち、neurocalcin α の相互作用因子の同定と機能解析を行った。

〈国内外での成果の位置づけ〉

神経系ラフト因子の解析については多くの共同研究を行った。

特にラフト内葉局在タンパク質NAP-22については多くの共同研究へと発展した。コレステロール動態と神経機能の関連は神経細胞死、特にアルツハイマー病との関連より注目されつつあり、今後は特に神経-グリア相互作用という観点からの脳機能におけるコレステロール動態解析の必要性がある。神経ラフトのみならずグリアラフトの構築機構の解析の重要性と脂質動態と神経疾患、老化との関連が認識されてきており、神経系ラフト因子についての問い合わせも多くきている状況である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

NAP-22の脂質結合領域についてはPCR条件設定が困難な点より解析が遅れている。またこの解析により、NAP-22が膜中でオリゴマーとして存在していることを発見したが、このオリゴマーの形成条件をいまだ見出ししていないため、総合的な解析ができない状況である。また新規に多くのラフト局在因子を見出したが、これらの膜結合領域と考えられる部位は極めて疎水性が高く、大腸菌での発現とその後の精製が困難であったため、解析が進んでいない。

〈今後の課題〉

NAP-22がオリゴマーとしてラフトに局在し、細胞への発現により膜動態が変化するという結果を得ている。これらの詳細な解析とその調節機構の解明が脂質結合の分子機構の解析と並ぶ今後の課題である。新規に見出したラフト局在因子の脂質との相互作用と結合脂質による活性制御機構の解析、これらの脂質結合部位のラフトのプロープとしての有効性の検証も重要である。また老化に伴う脂質組成の変化とこれに呼応したタンパク質の発現と局在の変化の解析も老化にともなう細胞機能の解析上、重要な課題であると考えている。

中枢神経系を対象とする場合には、その形成期（発生期）と成熟期、さらに老化期ではタンパク質の発現や局在が変化する可能性が高い。今後、これらの各々の時期について、神経細胞のラフト、グリア細胞のラフトの各々におけるプロテオミクスとリポドミクスを統合的に理解することによって、膜領域としてのラフトの生理的意義を解明することが中枢神経系を分子的に理解するための重要なアプローチとなると期待している。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 202190815

Epand, R.M., Maekawa, S., Yip, C., Epand, R.F.: Protein-induced formation of cholesterol-rich domains: *Biochemistry* 40 10514-10521, 2001.

2. 202190838

Matsunaga, W., Miyata, S., Itoh, M., Kiyohara, T., Maekawa, S.: Expression of high levels of tubulin and microtubule-associated protein-2D in the neurohypophysial astrocytes of adult rat. *Neuroscience* 111 151-162, 2002

3. 0302121422

Terashita, A., Funatsu, N., Umeda, M., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., Epand, R.M., Maekawa, S. (2002) The lipid binding activity of a neuron specific protein NAP-22 studied in vivo and in vitro.

J. Neurosci. Res. 70 172-179.

4. 0303191902

Miyata, S., Matsumoto, N., Taguchi, K., Akagi, A., Iino, T., Funatsu, N., Maekawa, S. (2003) Biochemical and ultrastructural analyses of IgLON cell adhesion molecules, Kilon and OBCAM in the rat brain. *Neuroscience* 117 645-658.

5. 0302121429

Noyama, K., Maekawa, S. (2003) Localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 2 in the brain-derived Triton-insoluble low-density fraction (raft). *Neurosci. Res.* 45 141-148.

6. 0303191916

Maekawa, S., Iino, S., Miyata, S. (2003) Molecular characterization of the detergent-insoluble cholesterol-rich membrane microdomain (raft) of the central nervous system. *Biochimica Biophysica Acta* 1610 261-270.

7. 0302121412

Epand, R. M., Epand, R. F., Maekawa, S. (2003) The arrangement of cholesterol in membranes and binding of NAP-22. *Chemistry and Physics of Lipids* 122 33-39

8. 0401171013

Khan, T.K., Yang, B., Thompson, N.L., Maekawa, S., Epand, R.M., and Jacobson, K., Binding of NAP-22, a calmodulin binding neuronal protein, to raft-like domains in model membranes. *Biochemistry* 42, 4780-4787 (2003).

9. 0401171042

Epand, R.M., Braswell, E.H., Yip, C.M., Epand, R.F., and Maekawa, S., Quaternary structure of the neuronal protein NAP-22 in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta.* 1650, 50-58 (2003).

10. 0401171101

Miyata, S., Matsumoto, N., and Maekawa, S., Polarized targeting of LgLON cell adhesion molecule OBCAM to dendrites in cultured neurons, *Brain Res.* 979, 129-136 (2003)

11. 0401171122

Epand, R.F., Maekawa, S. and Epand, R.M., Specificity of membrane binding of the neuronal protein NAP-22, *J. Memb. Biol.* 193, 171-176 (2003)

12. 0401171137

Miyata, S., Taguchi, K. and Maekawa, S., Dendrite-associated opioid-binding cell adhesion molecules at neurosecretory granules in the hypothalamic magnocellular neurons, *Neuroscience* 122, 169-181 (2003).

13. 0402241545

Iino, S., Taguchi, K., Maekawa, S., and Nojyo, Y., Motor, sensory and autonomic terminals containing NAP-22 immunoreactivity in the muscle, *Brain Res.* 1002, 142-150, 2004.

14.

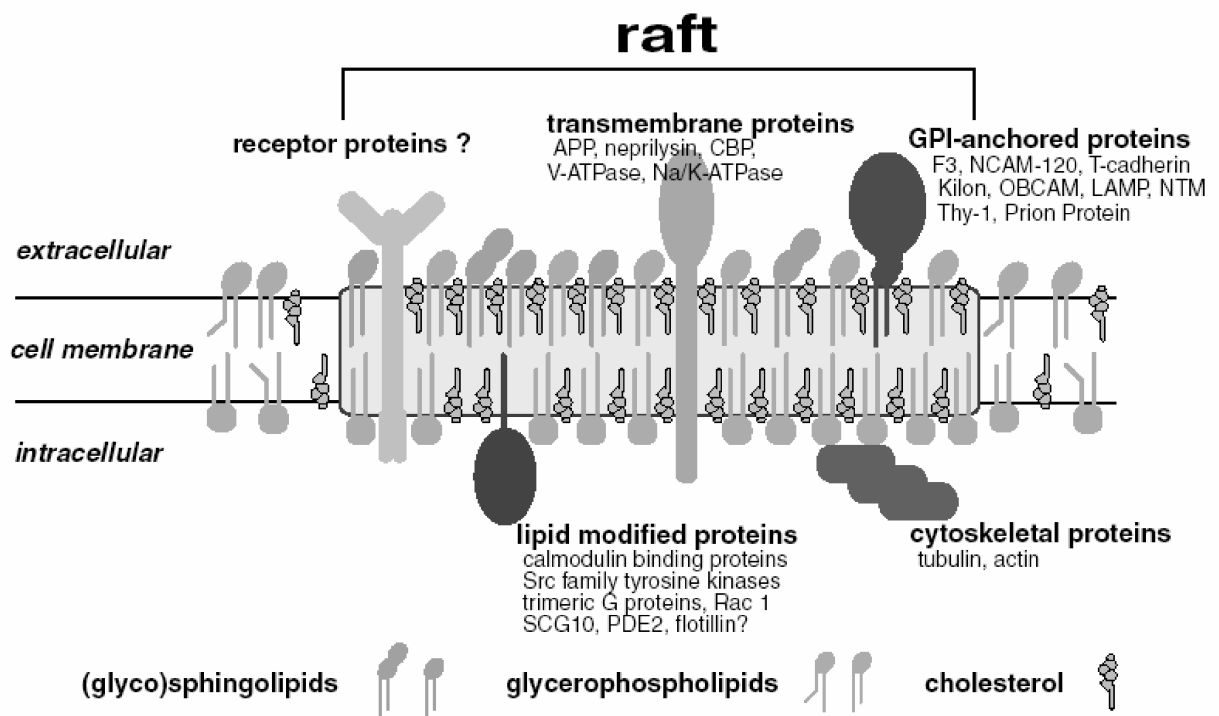
Epand, R.M., Voung, P., Yip, C.M., Maekawa, S., Epand, R.F. Cholesterol-dependent partitioning of PI(4,5)P2 into membrane domains by amino terminal fragment of NAP-22.

Biochem. J. 379 527-532, 2004.

15.

Maekawa, S. Taguchi, K. Localization of the Cl⁻-ATPase activity on NAP-22 enriched membrane microdomain (raft) of rat brain. *Neurosci. Lett.* 362 158-161, 2004.

components of neuronal raft



神経細胞膜ラフトの構成因子