

研究課題別評価

1 研究課題名: 神経系におけるスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン超分子構造の機能発現と制御

2 研究者氏名: 笠原浩二

研究員: 鈴木直子(研究期間: H14.4.1. ~ H17.3.31)

湯山耕平(研究期間: H14.4.1. ~ H17.3.31)

3 研究の狙い:

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは脳の発生段階において組成が顕著に変化することが知られ、神経細胞分化に関わる可能性が示唆されてきた。しかし、ガングリオシドは機能がいまだに解明されておらず、ポストゲノム時代における重要な研究標的として残されている。我々は独自にガングリオシドが細胞膜マイクロドメインにおいて神経細胞分化に関わるシグナル伝達分子と会合し、それを制御していることを見つけた。現在このスフィンゴ糖脂質マイクロドメインは脂質ラフトとも呼ばれ、生体内でシグナル伝達の中継点として働いていることが明らかになりつつあり、世界的に注目を集めている。本研究は、脳神経系におけるスフィンゴ糖脂質マイクロドメインの機能を明らかにすることを研究の狙いとする。

4 研究成果:

(1) スフィンゴ糖脂質会合タンパク質の同定

我々はスフィンゴ糖脂質マイクロドメインにおけるシグナル伝達を解明することを目的として、抗スフィンゴ糖脂質抗体で免疫沈降する際に共沈してくる「スフィンゴ糖脂質会合タンパク質」の単離を試みた。その結果、小脳顆粒神経細胞において抗ガングリオシド GD3 抗体で、135kDa、80kDa、56/53kDa、40kDa のタンパク質が共沈することを見つけ、それぞれ 135kDa は GPI アンカー型神経細胞接着分子 TAG-1、80kDa は src ファミリーキナーゼ基質 Csk-binding protein (Cbp)、56/53kDa は src ファミリーキナーゼ Lyn、40kDa は神経特異的三量体 G タンパク質 Go の サブユニットであることを見出した。

(2) TAG-1 の Lyn を介するシグナル伝達

TAG-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経細胞接着分子で、神経突起伸長活性を持つことが知られている。しかし TAG-1 は、GPI アンカー型タンパク質であり膜貫通領域を持たないことから、細胞内シグナル伝達機構について研究があまり進んでいなかった。我々は TAG-1 と Lyn はともにスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン画分に存在し、TAG-1 をリガンドまたは抗体でクロスリンクすると Lyn が一過的に活性化することをすでに報告した(Kasahara et al. J.Biol.Chem. 275 34701-34709, 2000)。本研究では、スフィンゴ糖脂質マイクロドメインでの TAG-1 と Lyn の会合を再構成系を用いて確認し、そのシグナル伝達機構の解析を進めた。CHO 細胞に TAG-1 cDNA を発現させると、その細胞は自己凝集活性を示し TAG-1 は接着活性を持つことがわかった。このとき TAG-1 はスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン画分に存在し、この細胞にガングリオシド GD3 の生合成酵素遺伝子の cDNA を共発現させると、抗ガングリオシド GD3 抗体による免疫沈降で TAG-1 が共沈し、スフィンゴ糖脂質マイクロドメインでの TAG-1 とガングリオシド GD3 の会合が確認された。そしてメチルシクロデキストリン処理によるコレステロールの除去で小脳顆粒細胞のスフィンゴ糖脂質マイクロドメインを破壊すると、TAG-1 の Lyn を介するシグナル伝達が阻害されることから、シグナル伝達がスフィンゴ糖脂質マイクロドメインでおこっていることが証明された。また小脳顆粒細胞をスフィンゴ糖脂質生合成酵素阻害剤である ISP-1 で処理しても同様にシグナル伝達が抑制されることから、TAG-1 のシグナル伝達にスフィンゴ糖脂質が必要であることがわかった。

(3) Cbp のシグナル伝達

Cbp はスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン膜貫通タンパク質で、src ファミリーキナーゼの基質であることが知られている。CHO 細胞に発現させた Cbp はスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン画分に存在し、Lyn を共発現させると Cbp がチロシンリン酸化され、非活性型の Lyn ではリン酸化されないことから、Cbp が Lyn の基質になることが確認された。TAG-1 は神経突起伸長や神経束形成に関与し、実際にそれが機能していると考えられる発生初期段階におけるシグナル伝達を成体期と比較したところ、発生初期段階と成体で Lyn はどちらもスフィンゴ糖脂質マイクロドメインに存在していたが、発生初期段階でのみスフィンゴ糖脂質マイクロドメインにおける Lyn 活性化および Cbp チロシンリン酸化が見られた。これらの結果は、Cbp は TAG-1 のシグナル伝達の下流分子であることを示している。リン酸化 Cbp は、src ファミリーキナーゼの負の制御因子である Csk を細胞質からスフィンゴ糖脂質マイクロドメインに移行させることが知られていることから、Cbp は Lyn のネガティブフィードバック調節に関与しているものと考えられる。

(4) Go のシグナル伝達

三量体 G タンパク質は活性化に伴って サブユニットと サブユニットに分かれるが、不活性化状態では両者ともにスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン外に存在するのに対し、非水解性 GTP アナログで活性化してやると サブユニットのみがスフィンゴ糖脂質マイクロドメイン画分に移行することがシオ糖密度勾配遠心法により明らかとなった。興味深いことに、Go のスフィンゴ糖脂質マイクロドメインへの移行はラット小脳の発生初期にのみ見られ、成体では見られなかった。百日咳毒素処理で Go を不活化すると、その Go の移行は見られなくなった。さらに小脳顆粒細胞に発現している G タンパク質共役受容体 CXCR4 の生理的リガンドである SDF-1 を添加すると、Go の活性化、脂質ラフトへの移行、成長円錐の退縮がおこることを見つけた。これらの結果は、活性化に伴う Go のスフィンゴ糖脂質マイクロドメインへの移行は SDF-1 による成長円錐の退縮に関与していることを示唆している。

(5) スフィンゴ糖脂質会合タンパクと神経成長円錐

本研究で同定したスフィンゴ糖脂質会合タンパク質 TAG-1, Lyn, Cbp, Go はすべて成長円錐画分に存在していた。これは成長円錐のスフィンゴ糖脂質マイクロドメインにおけるシグナル伝達が、神経突起形成の調節に関わっていることを示している。

5 自己評価:

ガングリオシドが神経突起伸長に関わっていることは以前より知られていたが、そのメカニズムについてはまだよくわかっていなかった。その中で本研究は、抗ガングリオシド抗体による免疫沈降というオリジナルな方法を用いてガングリオシドが神経突起伸長に関わっている分子と直接会合していることを示し、ガングリオシドがそのシグナル伝達の間を提供していることを明らかにした。機能解明の困難だったガングリオシド研究に新たな道を開いたものと考えている。

スフィンゴ糖脂質マイクロドメインの研究は盛んにおこなわれるようになったが、その中でスフィンゴ糖脂質自身の役割についてはほとんど注意を払われてこなかった。最近、ガングリオシド生合成酵素遺伝子ノックアウトマウスが神経系において様々な表現型を示すことがわかってきた。しかし、そのメカニズムについてはまったくわかっていない。本研究はそれらの謎の解明にもつなげる可能性を持つと考えられる。本研究で得られた成果の多くを論文発表の形までもっていきなかつたことは、多いに反省すべき点である。

6 研究総括の見解:

研究は順調に進んでいる。脳を特徴付けるガングリオシドの機能解明に向かって新たな一歩を進めたことは評価し得る。今後の課題として、対象としているマイクロドメインの動的な、機能的超分

子構造の解析にも更なる一歩を進めて欲しい。今後は、単なるシグナル分子系列の同定に終始しないように気をつけ、掘り下げた密度の高い研究を展開すべきであろう。ラフトコンセプトの使用には批判も多く、注意して使用すること。発表には前向きで対処されたい。

7 主な論文等:

論文・総説

1. Yamauchi, S., Tokita, Y., Aono, S., Matsui, F., Shuo, T., Ito, H., Kato, K., Kasahara, K., Oohira, A. Phosphorylation of neuroglycan C, a brain-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, and its localization in the lipid rafts. J. Biol. Chem. **277** 20583-20590, (2002)
2. Kasahara, K., Watanabe, K., Kozutsumi, Y., Oohira, A., Yamamoto, T. and Sanai, Y. Association of GPI-anchored protein TAG-1 with src-family kinase Lyn in lipid rafts of cerebellar granule cells. Neurochemical Res. **27** 823-829, (2002)
3. Yuyama K, Sekino-Suzuki N, Sanai Y and Kasahara K Lipid rafts in cellular signaling and disease. Trend.Glycosci.Glycotech. **15**(83) 139-151 (2003)
4. Hiramatsu T, Sonoda H, Takanezawa Y, Morikawa R, Ishida M, Kasahara K, Sanai Y, Taguchi R, Aoki J, Arai H. Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1 alpha and mPA-PLA1 beta. J. Biol. Chem. **278** 49438-49447, (2003)
5. Yuyama K, Sekino-Suzuki N, Sanai Y and Kasahara K Translocation of Activated Heterotrimeric G Protein Go to Lipid Rafts in Cerebellar Neurons (submitted)
6. Hirai M, Koizumi M, Hirai H, Hayakawa T, Yuyama K, Suzuki N and Kasahara K Structures and dynamics of glycosphingolipid-containing lipid mixtures asraft models of plasma membrane J.Phys.: Condens.Matter (in press)
7. Sekino-Suzuki N, Yuyama K, Sanai Y and Kasahara K Tyrosine phosphorylation of Cbp by ligation of GPI-anchored neuronal adhesion molecule TAG-1 in lipid rafts. (in preparation)
8. 笠原浩二 佐内豊 「神経系細胞膜ラフトとシグナル伝達」 蛋白質核酸酵素 共立出版 **47**(4) 333-337 (2002)
9. 笠原浩二、佐内豊 「脂質ラフトと複合糖質」 蛋白質核酸酵素 **48**(8) 1164-1170 (2003)
10. 鈴木直子、湯山耕平、佐内豊、笠原浩二 「神経系における脂質マイクロドメイン」 蛋白質核酸酵素 **49** 2397-2403 (2004)
11. 湯山耕平、鈴木直子、佐内豊、笠原浩二 「神経細胞接着分子 TAG-1 の脂質ラフトを介するシグナル伝達」 膜 (日本膜学会編) 30(印刷中)

受賞

湯山耕平(グループメンバー)

平成 16 年 第 7 回日本糖質学会ポスター賞受賞

「三量体 G タンパク質 Go の神経細胞膜ラフトにおけるシグナル伝達とガングリオシド」

招待講演等

1. 笠原浩二、佐内豊
フォスファカンの脂質ラフトにおける TAG-1/Lyn を介するシグナル伝達
第 4 5 回日本神経化学会 2002 年 7 月 17-19 日札幌(シンポジウム)
Neurochemical Research 28(7) 1082 (2003)
2. 笠原浩二
スフィンゴ糖脂質マイクロドメインの構造と機能
第 47 回 F C C A セミナー 第 9 回 グライコサイエンス若手会
埼玉 2002 年 9 月 14 日(招待講演)
3. 笠原浩二、渡辺和忠、大平敦彦、小堤保則、佐内豊
小脳顆粒細胞膜ラフトを介する GPI アンカー型神経細胞接着分子 TAG-1 の機能発現
第 75 回日本生化学会大会 2002.10.16. 京都(シンポジウム)
4. 笠原浩二
神経細胞膜ラフト機能制御とコレステロール
第 26 回日本神経科学会大会 2003.7.23. 名古屋(シンポジウム)
Neuroscience Research 26 Supplement 1 S11 (2003)
5. Kasahara K.
“Signal transduction by GPI-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 in lipid rafts”
“Symposium on Glyco-Neurobiology---Glycolipids, Glycoproteins, and other Glycoforms”-A
Satellite Meeting for the 2003 International Society of Neurochemistry Annual Meeting
(February 8 to 11, 2004, Taipei, Taiwan) (招待講演)
6. 笠原浩二、佐内豊
神経細胞接着分子 TAG-1 の脂質ラフトを介するシグナル伝達
日本膜学会第 26 年会 2004.5.20. 東京(ミニシンポジウム)
7. Yuyama K, Suzuki N, Sanai Y, Kasahara K
Activation-dependent recruitment of trimeric G protein Go \cdot to lipid rafts in cerebellar granule
neurons.
第 77 回日本生化学会大会 2004.10.16 横浜(ワークショップ)

その他

国外発表 7 件

国内発表 18 件