

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570117

研究課題名（和文） 脂質ラフトにおけるシグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of signal transduction mechanism in lipid rafts

研究代表者

笠原 浩二（KASAHARA KOHJI）

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：60250213

研究成果の概要（和文）：

私たちはガングリオシド GD3 抗体 R24 が初代培養小脳顆粒細胞から src ファミリチロシンキナーゼ Lyn が共沈すること、また初代培養小脳顆粒細胞を R24 で処理すると Lyn が活性化しいくつかの基質のチロシンリン酸化をおこすことを報告し、ガングリオシド GD3 が Lyn と機能的に会合していることを示してきた。本研究で、初代培養小脳顆粒細胞を R24 で処理するとパキシリンの 118 番目のチロシンリン酸化を促進し、F アクチンの集合および神経突起伸長をおこすことを見出した。小脳成長円錐膜画分を R24 で処理すると 68kDa タンパク質の強いチロシンリン酸化がおこり、パキシリンの 118 番目のチロシンリン酸化と同じ移動度を示した。パキシリンのチロシンリン酸化は、アクチン細胞骨格に依存した細胞の形態を調節することが知られている。ガングリオシド GD3 によるシグナル伝達は、パキシリンのチロシンリン酸化を介する成長円錐の形態に関わっている。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated that antibody to ganglioside GD3 (R24) immunoprecipitates src-family tyrosine kinase Lyn from primary cerebellar granule cells and R24 treatment of the intact cells induces Lyn activation and rapid tyrosine phosphorylation of several substrates, suggesting the functional association of ganglioside GD3 with Lyn. In this study, R24 treatment of primary cerebellar granule cells enhances phosphorylation of paxillin at tyrosine residue 118 and induces filamentous actin assembly and neurite outgrowth. R24 treatment of cerebellar growth cone membrane fraction induces prominent tyrosine phosphorylation of 68kDa protein which comigrates with phosphopaxillin at tyrosine residue 118. Tyrosine phosphorylation of paxillin is known to regulate actin cytoskeleton-dependent changes in cell morphology. Signal transduction by ganglioside GD3 is involved in growth cone morphology via tyrosine phosphorylation of paxillin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：

キーワード：脂質ラフト、 ganglioside、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

私は脳神経系に多く存在するスフィンゴ糖脂質である ganglioside の機能を解析するため、抗 ganglioside 抗体で免疫沈降する際に共沈してくる ganglioside 会合タンパク質の単離を試みてきた。そして小脳顆粒細胞において ganglioside GD3 が細胞内シグナル伝達分子である src ファミリーキナーゼ Lyn, ラフト膜貫通タンパク質 Cbp, 三量体 G タンパク質 Gα と、また GPI アンカー型神経細胞接着分子である TAG-1 と会合していることを報告してきた。

2. 研究の目的

最近、スフィンゴ糖脂質がコレステロールとともに細胞膜上で集合してマイクロドメインを形成し、そこに多くのシグナル伝達分子が局在していることが分かってきた。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呼ばれ、様々な生命現象における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、世界的に注目を集めている。その中で、本研究は脂質ラフトにおける ganglioside を介するシグナル伝達機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

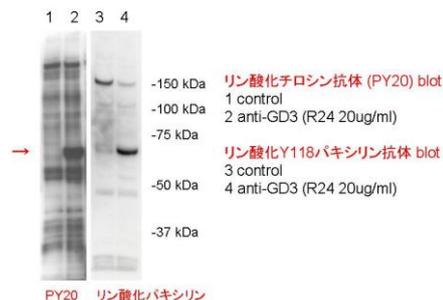
本研究では、初代培養ラット小脳顆粒神経細胞またはラット小脳成長円錐膜画分を抗 ganglioside GD3 抗体で処理したときにお

こるシグナル伝達および形態的变化について解析をおこなった。シグナル伝達の解析はチロシンリン酸化特異的抗体およびチロシンリン酸化パキシリン特異的抗体によるブロッキングでおこなった。形態的变化については蛍光顕微鏡を使い、位相差像、パキシリンチロシンリン酸化、ローダミンファロイジンによるアクチン重合の検出も同時におこなった。

4. 研究成果

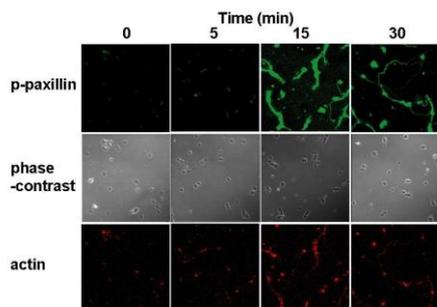
(1) ラット小脳成長円錐膜画分を 37°C で抗 ganglioside GD3 抗体で処理したときにおこるシグナル伝達を解析した。その結果、68kDa の強いチロシンリン酸化が検出され (図1、レーン1, 2)、それがパキシリンの118番目チロシンの特異的リン酸化であることを突き止めた (図1、レーン3, 4)。

図1: ganglioside GD3 抗体刺激による成長円錐膜画分におけるパキシリンのチロシンリン酸化



パキシリンのリン酸化はアクチン重合を制御することが知られていることから、小脳顆粒細胞を抗ガングリオシド GD3 抗体で処理したときにおこる変化について調べたところアクチン重合にともない神経突起伸長が起こることを見出した (図2)。これはガングリオシド GD3 がパキシリンリン酸化を介して成長円錐を制御するシグナル伝達系が生体内に存在していることを示唆している。TAG-1 などの GPI アンカー型神経細胞接着分子が機能を発現する際細胞内にシグナルを伝えるときに、このシグナル伝達系を利用している可能性が考えられる。

図2:ガングリオシドGD3抗体刺激によるパキシリンのチロシンリン酸化、神経突起伸長、アクチン重合



(2) 脂質ラフトの研究出発材料として、神経細胞以外に血小板を導入した。そしてヒト血小板をトロンビンで刺激したとき脂質ラフトに移行する分子を単離同定することに成功した。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Yuyama K, Sekino-Suzuki N, Yamamoto N, Kasahara K : Ganglioside GD3 monoclonal antibody-induced paxillin tyrosine phosphorylation and filamentous actin assembly in cerebellar growth cones  
J. Neurochem. 116, 845-850, 2011  
査読有

- ② Kasahara K, Souris M, Kaneda M, Miki T, Yamamoto N, Ichinose A : Impaired clot retraction in factor XIII A subunit-deficient mice.  
Blood 115, 1277-1279, 2010 査読有

- ③ Kasahara K, Ui M.  
G protein alpha o  
UCSD-Nature Signaling Gateway  
Molecule Pages  
Published on line: 10 Jan 2011,  
doi:10.1038/mp.a000976.01 査読有  
<http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A000976>

- ④ 湯山耕平、鈴木直子、笠原浩二「三量体 G タンパク質と脂質ラフト」生体の科学 60(3) 181-186 (2009)

- ⑤ 湯山耕平、鈴木直子、笠原浩二  
「脂質ラフトと 3 量体 G タンパク質」蛋白質核酸酵素 53(12) 1558-1563 (2008)

[学会発表] (計 15 件)

- ① Kasahara K, Kaneda M, Miki T, Iida K, Suzuki H, Yamamoto N, Arai M, Souris M, Ichinose A : Factor XIII-Dependent-Clot Retraction and -Fibrin Translocation to Platelet Rafts 第 83 回日本生化学会 2010. 12. 9 神戸 (ワークショップ)
- ② Kasahara K, Sekino-Suzuki N, Yuyama K : Involvement of ganglioside GD3-enriched detergent-resistant membrane rafts in growth cone morphology. 4<sup>th</sup> International Society of Neurochemistry Special Neurochemistry Conference "Membrane Domains in CNS Physiology and Pathology" 2010. 5. 22-26 Italy (invited)
- ③ 笠原浩二、惣宇利正善、兼田瑞穂、三木俊明、山本正雅、一瀬白帝 : 凝固 XIII 因子 A サブユニット欠損マウスでは血餅退縮反応が欠如する 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010. 4. 22-24 鹿児島 (第 33 回日本血栓止血学会学術集会優秀ポスター賞受賞)
- ④ 笠原浩二、兼田瑞穂、三木俊明、鈴木英紀、新井盛大、一瀬白帝、山本正雅 : 血液凝固 XIII 因子に依存した血餅退縮

とフィブリンの血小板脂質ラフトへの移行 第2回セラミド研究会  
2009.11.6. 札幌

- ⑤ 笠原浩二、兼田瑞穂、三木俊明、鈴木英紀、小嶋聡一、新井盛大、一瀬白帝、山本正雅：血小板脂質ラフトに局在するトランスグルタミナーゼ基質 第32回日本血栓止血学会学術集会、2009.6.4-6.小倉
- ⑥ フィブリンの血小板脂質ラフト移行と血餅退縮における働き  
兼田瑞穂、三木俊明、飯田和子、入江敦、鈴木英紀、小嶋聡一、新井盛大、一瀬白帝、山本正雅、笠原浩二 第81回日本生化学会大会 2008.12.10. 神戸
- ⑦ 笠原浩二、兼田瑞穂、鈴木英紀、小嶋聡一、新井盛大、一瀬白帝、山本正雅  
フィブリンの血小板ラフト移行と血餅退縮 第31回日本血栓止血学会学術集会 2008.11.21. 大阪
- ⑧ 兼田瑞穂、三木俊明、飯田和子、入江敦、鈴木英紀、新井盛大、一瀬白帝、山本正雅、笠原浩二：フィブリンの血小板ラフト移行と血餅退縮. 第28回日本糖質学会年会、2008.8.1-3. つくば

〔図書〕(計1件)

笠原浩二「膜ラフト」生化学事典 朝倉書店 (印刷中)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原 浩二 (KASAHARA KOHJI)  
財団法人東京都医学研究機構・  
東京都臨床医学総合研究所・  
主任研究員  
研究者番号：60250213

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし