

ガングリオシド会合蛋白質と脂質ラフトシグナリング

—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—

笠原 浩二

東京都臨床医学総合研究所・独立研究員



1. 私が知りたかったこと

私は神経系におけるガングリオシドの機能を解明することを目的として、ガングリオシド会合タンパク質の同定をおこなってきた。そして、そのうちの一つが三量体 G タンパク質 Go の α サブユニット($Go\alpha$)であることがわかった。 $Go\alpha$ は小脳発生初期に活性化に依存して脂質ラフトに移行することを見つけた。小脳顆粒神経細胞 G タンパク質共役型受容体の生理的リガンドである SDF-1 α で刺激すると、Go の活性化、 $Go\alpha$ のラフトへの移行、成長円錐の退縮がおこった。これは $Go\alpha$ の活性化に伴うラフトへの移行が小脳神経成長円錐の退縮に関わっていることを示唆している。

2. 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、機能が今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。私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目的とする。

3. 結果

ラット小脳の抗ガングリオシド GD3 抗体による免疫沈降物で *in vitro* kinase assay をおこなうと 40, 53, 56, 80kDa タンパク質のリン酸化が検出され、53/56kDa がチロシンキナーゼ Lyn、80kDa がその基質 Cbp(Csk-binding protein)であることを報告してきた。

本研究で、40kDa タンパク質が三量体 G タンパク質 Go の α サブユニット($Go\alpha$)であることが再免疫沈降実験でわかった (図 1)。CHO 細胞にガングリオシド GD3 合成酵素と $Go\alpha$

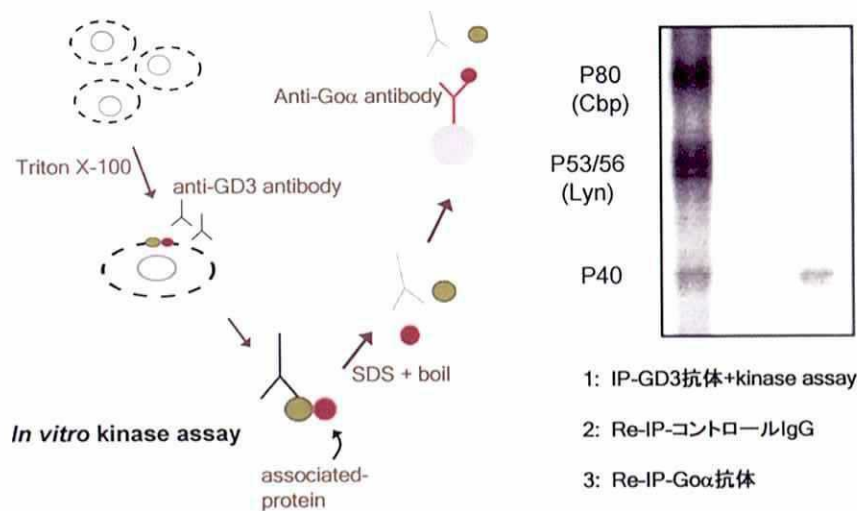


図1 抗ガングリオシド GD3 抗体による 3 量体 G タンパク質の Go α の共沈

の cDNA を共発現させても抗ガングリオシド GD3 抗体で Go α が共沈し、GD3 と Go α の会合が再構成系においても確認された。三量体 G タンパクは活性化に伴って α サブユニットと $\beta\gamma$ 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ラフト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 α サブユニットのみがラフト画分に移行することがシヨ糖密度勾配遠心法により明らかとなった (図 2)。興味深いことに、Go α のラフト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(図 3)。百日咳毒素処理で Go を不活化すると、その Go α のラフトへの移行は見られなくなった。

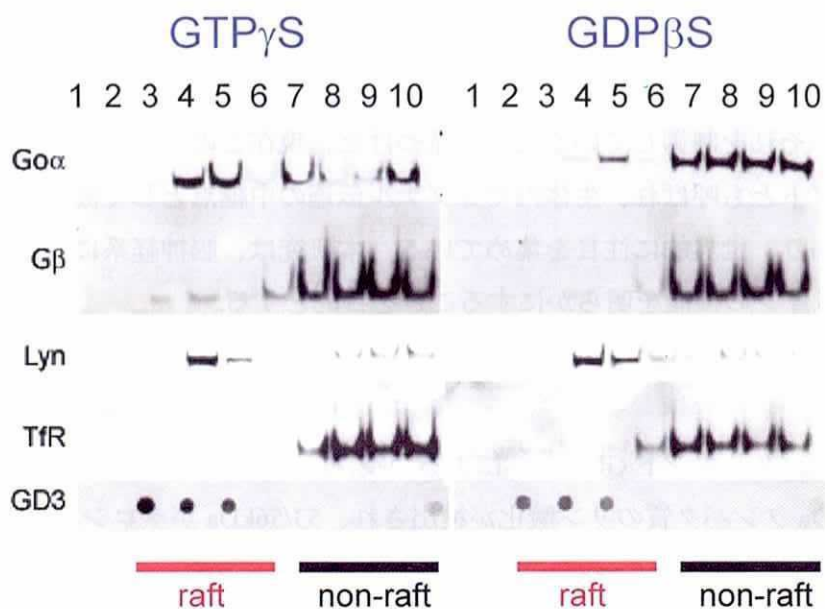


図2 Go α の活性化に伴う脂質ラフト画分への移行

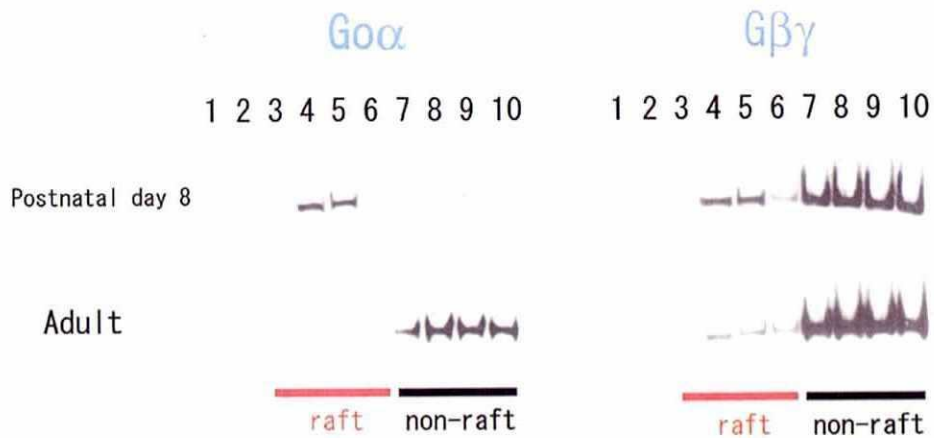


図3 発生初期小脳で見られる $Go\alpha$ の脂質ラフト画分への移行

さらに $Go\alpha$ は Lyn, Cbp と共に成長円錐画分に高度に濃縮しており、マストパランで Go を活性化すると $Go\alpha$ のラフトへの移行に伴い小脳顆粒神経細胞の成長円錐退縮がおこった。また小脳顆粒神経細胞 G タンパク質共役型受容体の生理的リガンドである SDF-1 α で刺激すると、 Go の活性化、 $Go\alpha$ のラフトへの移行、成長円錐の退縮がおこった(図4)。これらの結果は $Go\alpha$ の活性化に伴うラフトへの移行が小脳神経成長円錐の退縮に関わっていることを示唆している。

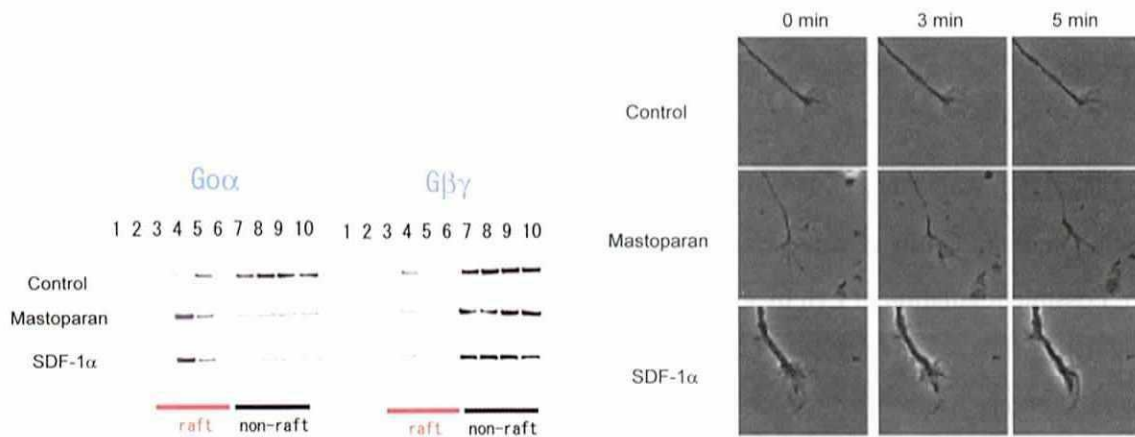


図4 SDF-1 α 処理による $Go\alpha$ ラフト移行と成長円錐退縮

4. 考 察

Go α の活性化に伴う脂質ラフトへの移行のメカニズムに関しては、脂質間相互作用の可能性が考えられる。脂質ラフトは、不飽和アシル鎖を持つリン脂質から飽和アシル鎖を持つスフィンゴ糖脂質が相分離した微小領域であると考えられている。一般的に飽和アシル鎖であるパルミトイル化とミリストイル化で修飾されているタンパク質は脂質ラフト画分へ分配されやすく、プレニル化されているタンパク質は脂質ラフトから排除される傾向を持つ。Go の場合は α サブユニットがパルミトイル化およびミリストイル化されていて、 γ サブユニットはプレニル化されている。不活性化状態で三量体のときは、パルミトイル化ミリストイル化によるラフトとの親和力よりプレニル化によるラフトから排除される力のほうがまさっているか、または β γ サブユニットとラフト外タンパク質との相互作用によって、 α サブユニットのラフトへの移行を抑えている。しかし、活性化してモノマーになるとラフトから排除される力が働かず、ラフトに移行すると考えられる。

三量体 G タンパク質 Go は神経系に豊富に存在していて、成長円錐では全膜タンパク質の 10% 以上を占めているという面白い事実が知られながら、生理的役割についてはあまりわかっていない。本研究で、発生初期の小脳で SDF-1 α により Go が活性化し、脂質ラフトへ移行し成長円錐退縮を関わっていることが示唆された。このように、ガングリオシドは神経発生期のシグナル伝達分子の制御に関わっていると考えられる。

参考文献

1. Kasahara, K., Watanabe, Y., Yamamoto, T., and Sanai, Y.
Association of src family tyrosine kinase Lyn with ganglioside GD3 in rat brain. Possible regulation of Lyn by glycosphingolipid in caveolae-like domains.
J. Biol. Chem. ,
272 29947-29953, 1997
2. Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A., Yamamoto, T., and Sanai, Y.
Involvement of gangliosides in GPI-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling in lipid rafts.
J. Biol. Chem. ,275 34701-34709, 2000

3. 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

4. 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)

5. 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)