

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	構成タンパク質の解析による神経細胞の脂質ラフトの機能構造に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	花房慶
Author(English)	Kei Hanafusa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11252号, 授与年月日:2019年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:林 宣宏,一瀬 宏,徳永 万喜洋,村上 聡,長田 俊哉
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11252号, Conferred date:2019/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

2019 年度 博士論文

「構成タンパク質の解析による神経細胞の  
脂質ラフトの機能構造に関する研究」

東京工業大学 生命理工学院

生命理工学系 林研究室

花房 慶

指導教員 林 宣宏 准教授

目次

略語一覧

**1 章 序論.....p. 4**

1-1. 脂質ラフトについて

1-1-2. 脂質ラフトに集積するタンパク質について

1-1-2-1. Flotillin2 について

1-1-2-2. Fyn, c-Src について

1-2. 神経細胞について

1-2-1. 神経細胞の分化について

1-2-2. BDNF 刺激による細胞の応答について

1-3. NAP-22 について

**2 章 神経分化前後における脂質ラフトの解析.....p. 16**

2-1. 目的

2-2. 結果

2-2-1. 神経分化過程における脂質ラフトマーカータンパク質の発現量、存在量  
変化の解析

2-2-2. ショ糖密度勾配遠心法による局在解析

2-2-3. 免疫蛍光染色による局在解析

2-3. 考察

**3 章 BDNF 刺激下における NAP-22 の機能解明.....p. 28**

3-1. 目的

3-2. 結果

3-2-1. NAP-22 固相化ビーズの作製

3-2-2. BDNF 刺激の確認

3-2-3. NAP-22 と細胞内タンパク質の相互作用因子の同定

3-2-4. eIF4E と NAP-22 の相互作用の検証

3-3. 考察

4章 総括と今後の展望.....p. 46

5章 材料と方法.....p. 50

5-1. 材料

5-2. 実験手法

参考文献

報文目録

謝辞

## 略語一覽

AP-1	Adaptor protein-1
Arf	ADP-ribosylation factor
BASP1	Brain acidic soluble protein 1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bHLH	basic helix-loop-helix
BSA	Bovine serum albumin
CapZ	F-actin capping proteinsubunit zeta
Cav1	Caveolin-1
CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4
CPSF	Cleavage and polyadenylation specificity factor
CSK	C-terminal src kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRM	Detergent resistant membrane
EGFP	enhanced Green Fluorescent protein
eIF	eukaryotic initiation factor
FBS	Fatal bovine serum
GABA	$\gamma$ -aminobutylic acid
MAP2	microtubule associated protein 2
MARCKS	myristoylated alanine-rich C-kinase substrarte
myrNAP-22	myristoylated NAP-22
NAP-22	Neuronal tissue-enrichment acidic protein 22 kDa
Neu	Neural diffetrentiated cells
NKA	Na/K ATPase $\alpha$ 1 subunit
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Protein kinase C
PS	Phosphatidylserine
RA	<i>all trans</i> - retinoic acid
Rac1	Ras-related C3 botulinum
UD	undifferentiated cells
WT1	Wilms' tumor 1 protein

# 第 1 章

## 序論

### 1-1. 脂質ラフトとは

我々、ヒトの生体は 37 兆個の細胞で構成されている (Bianconi et al., 2013)。これらの細胞は細胞内と細胞外が細胞膜で仕切られることでその個を保つとともに、受容体などの様々なセンサーを用いて細胞外の環境を認識し、適応することで生体の恒常性を維持している。これらの仕切りとして、あるいはセンサーの位置する場所として重要な働きをする細胞膜は脂質二重層で構成されている。その脂質は (グリセロ) リン脂質、スフィンゴ (糖) 脂質、コレステロールの三種類に分類される。細胞の内側 (インナーリーフレット) はリン脂質に富み、外側 (アウターリーフレット) はスフィンゴ脂質に富んでいる。

これらの脂質にはそれぞれの特徴があり、特に柔軟性の違いがそれぞれの脂質分子の機能性を示す。リン脂質は不飽和脂肪酸によって構成され、二重層中では緩くパッキングされている。一方、スフィンゴ脂質は長い飽和脂肪酸によって構成されているため、きつくパッキングされる。このような違いから細胞の内側では液体に近い流動性の高い細胞膜(liquid-disordered membranes) の性質を有し、細胞の外側ではゲル状の流動性が低い細胞膜(quasi-gel membrane) の性質を有する。また、コレステロールは飽和脂肪酸によって構成され、脂質二重層に生じる隙間に入り込むことでインナーリーフレットの膜の流動性を減少させる。その結果、一般的に脂質ラフト(Lipid raft)と呼ばれる、コレステロールが豊富に含まれる脂質領域は液体秩序相である流動性の低いリン脂質領域が流動性の高いリン脂質に囲まれ、筏のように存在している状態と表現される。また、1% TritonX-100 に 4°C で不溶であるという性質も膜流動性が低くなったことで生じる現象である。

脂質ラフトとは 1997 年に Simon と Ikonen によって提唱された細胞膜上に構成されるマイクロドメインである (Simons & Ikonen, 1997)。プラットフォームである脂質ドメインにタンパク質が会合することで細胞応答などの機能を有する機能性マイクロドメインとして表現される。脂質ラフトが提唱されるまでの間、1972 年に Singer と Nicolson によって提唱された流動性モザイクモデルによって細胞膜の性質が説明されてきた (Singer & Nicolson, 1972)。流動性モザイクモデルでは膜タンパク質が細胞膜中でダイナミックな動きをすることが提示された。しかし、このモデルではスフィンゴ脂質とグリセロリン脂質との違いやそれらのアルキル鎖の長さによる膜構造への関与などは議論されていなかった。一方、Simon と Ikonen らによって脂質ラフトは『特定のマクロ領域の輸送、細胞内シ

グナル伝達のプラットフォーム』として概念が提唱され (Simons & Ikonen, 1997)、脂質二重層を構成する脂質の性質による構造上の違いなどが解かれている (図 1-1)。現在では、脂質ラフトを形成するタンパク質だけではなく脂質自体も細胞内シグナル伝達に関わるという知見が得られてきており、タンパク質と脂質を含めた統合的な理解とその研究が脂質ラフトの研究に必要となっている。

脂質ラフトの概念にも研究結果が反映され、古生代ラフトモデルと on-demand 形成ラフトモデルに分岐している。元来、脂質ラフトは

常に細胞膜上に構成されるものであるという概念が存在していたが、鈴木らは脂質ラフトの最小限の定義は『コレステロールとの共同的相互作用によって分子が集合してできる膜領域』としている (K. G. N. Suzuki & Akihito, 2013)。これは、2006年の *Keystone symposium* で定義された『ステロールとスフィンゴ脂質に富んだ 10-200 nm サイズの小さく不均一で非常に動的なドメインであり、細胞機能のコンパートメント化を担う。小さなラフトはタンパク質-タンパク質間、または、タンパク質-脂質間の相互作用によって安定化し、大きなプラットフォームを形成することがある』という定義 (Pike, 2006)とは大きく異なる。さらに動的な面に関しても、ミクロンよりも小さなラフトが外部刺激によって機能的なラフトを形成し (on-demand にラフトを形成)、脂質ラフトに集まる分子も限定的であるというモデルを打ち立てている (Lingwood & Simons, 2010; K. G. N. Suzuki & Akihito, 2013) (図 1-2)。

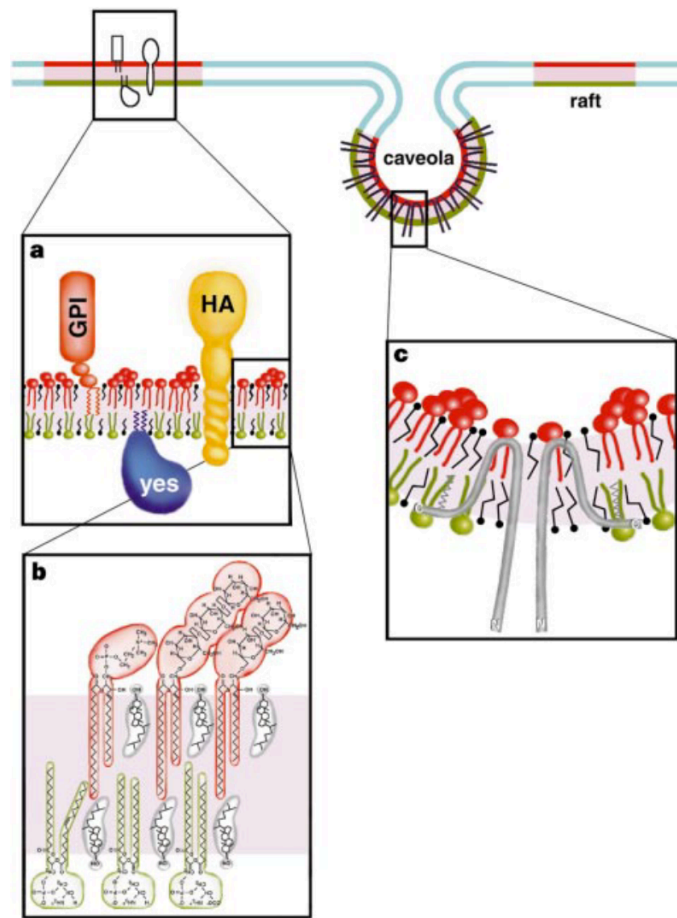


図 1-1. 脂質ラフトの概念

Kai Simon and Elina Ikonen, *Nature* **387**, 569-572 (1997)

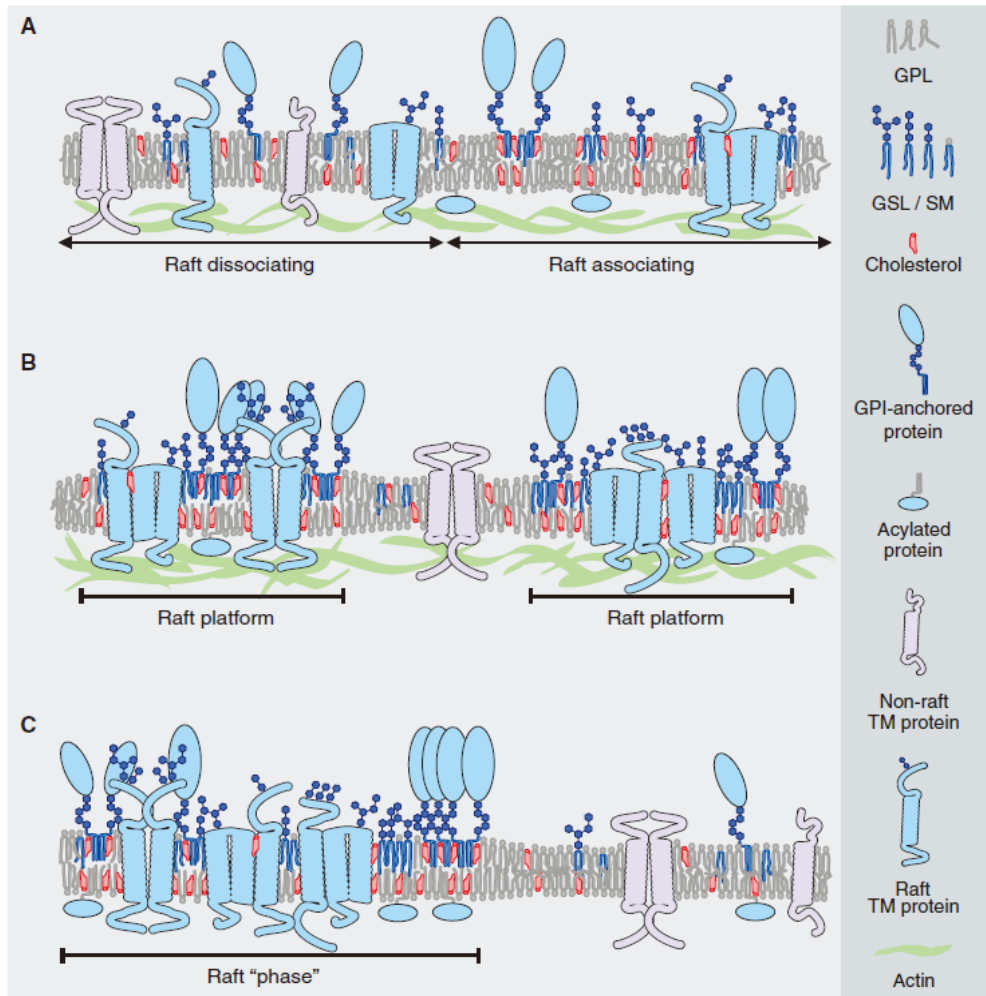


図 1-2. 脂質ラフトの概念図 2

Daniel L *et al. Science* 327, 46, 2009

本研究では、培養神経細胞を研究対象としており、第 2 章では神経分化前後における脂質ラフト、第 3 章では BDNF 刺激によって変化する脂質ラフトマーカータンパク質の相互作用因子に着目して研究を行なった。

### 1-1-2. 脂質ラフトに局在するタンパク質について

脂質ラフトは前項で記載した通り、脂質で構成されたプラットフォームにタンパク質が会合することによってその機能が発揮される。このように脂質ラフトに集積するタンパク質の一部は翻訳後修飾によって脂質が付加されている。翻訳後修飾によって付加される脂質はアシル化、Glycophosphatidylinositol (GPI) アンカー付加が挙げられる (Marilyn D. Resh, 1996; Vetrivel et al., 2004)。アシル化には 2 位のグリシン残基へ N-myristoyl transferase (NMT) によってミリスチン酸が付加される N-ミリスチル化 (Maurer-Stroh et al., 2004)、主にシステイン残基にパルミチン酸が付加されるパルミトイル化があり Serine palmitoyl transferase など複数の酵素がその修飾部位ごとに存在する。

アシル化タンパク質は可逆的に脂質ラフトへの局在を変化させるタンパク質であり、脂質ラフトの重要なポイントであるシグナル伝達の効率化に寄与しているタンパク質である。特にミリスチル化タンパク質はミリスチル基の付加によって疎水性が増加し、脂質ラフトへ弱い相互作用 ( $K_D$   $10^{-4}M$ ) で局在する (Peitzsch & McLaughlin, 1993)。しかし、その局在は 1) Myristoyl-Ligand Switch (タンパク質の構造変化), 2) Myristoyl-Electrostatic Switch (Protein Kinase C によるリン酸化), 3) Myristoyl-Proteolytic Switch (プロテアーゼによるタンパク質の構造変化), 4) Calmodulin binding Switch ( $Ca^{2+}$  結合型 Calmodulin ( $Ca^{2+}$ -CaM) のミリスチル基への結合) の 4 つの方法で制御されると考えられている (Hayashi et al., 2004; Lucero & Robbins, 2004; Marilyn D. Resh, 1999)。

脂質ラフトへ局在するタンパク質は様々であり、細胞骨格に関わる actin のようなタンパク質やシグナル伝達に関わる Src family kinase、さらにその細胞ごとに特有なタンパク質 (T 細胞であれば Linker for activated T cell、神経細胞であれば神経栄養因子受容体など) が集積する (Laux et al., 2000b; Simons & Toomre, 2000; S. Suzuki et al., 2004)。その他にも  $Ca^{2+}$  結合能を持つタンパク質などがあり、どのタンパク質がどのような脂質ラフトへ局在しているか、また、actin がどのように脂質ラフトへ繫留されているか、脂質ラフトの構成メカニズムが存在するのかなど、多数の疑問点が未解明のままである。

### 1-1-2-1. Flotillin2 について

Flotillin は Flotillin1 (Flot1, Reggie-2) と Flotillin2 (Flot2, Reggie-1) の 2 種類があり、両者は高い相同性を持ち、細菌から動物まで広い生物種で保存されており、細胞内では常時発現しているタンパク質である (Haney & Long, 2010; Lang et al., 1998; López, Kolter, & Lo, 2010; Volonté et al., 1999)。また、Flotillin は約 50% のアミノ酸配列の相同性を有する (Yokoyama, Fujii, & Matsui, 2008)。Reggie は、金魚の視神経を修復する際に発現が上昇する事で発見された (Schulte, Paschke, Laessing, Lottspeich, & Stuermer, 1997)。また、同年には細胞膜上に構成されるマイクロドメインであるカベオラの構成に必須な因子として Flotillin がクローニングされ、脳組織のシヨ糖密度勾配遠心法による分画で Triton に不溶な画分のマーカーとして示された (Bickel et al., 1997)。

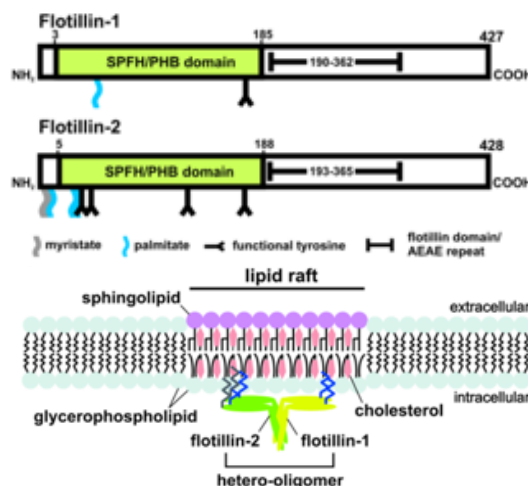


図 1-3. Flotillin の構造と脂質ラフトへの会合

Flotillin はパルミトイル化とミリスチル化 (Flot2 のみ) によって脂質ラフトに局在し、ホモ、ヘテロオリゴマーを形成することによって脂質ラフトの骨格として機能し (Babuke et al., 2009; Kurrle, John, Meister, & Tikkanen, 2012; Neumann-Giesen et al., 2004) (図 1-3)、神経突起の伸長に必須である (Banning, Regenbrecht, & Tikkanen, 2014)。オリゴマー形成には stomatin-prohibitin-flotillin-HflK/C (SPFH) ドメインが関わると考えられている (Yokoyama et al., 2008)。さらに、シグナル伝達因子との相互作用が報告されており、特に、EGF により惹起された Src キナーゼファミリーメンバーによるリン酸化によって細胞質内に細胞膜近傍から移行する (Banning et al., 2014; Riento, Frick, Schafer, & Nichols, 2009)。一方、Flotillin が形成するマイクロドメインは Fyn kinase によって制御される clathrin に依存しないエンドサイトーシスにより細胞質内に移行する (Stuermer, 2011)。Flotillin の含まれるマイクロドメインがその他にどのような機能を担っているかは興味深い。近年、神経成長因子である Nerve growth factor (NGF) の受容体である TrkA のエンドサイトーシスに関わることがわかり、神経細胞での Flotillin の機能がわかり始めてきている。

N. Kurrle et al. *Protein phosphorylation in human health* 4 (2012) (上段)。C. Stuermer, *Trends in Cell biology* 20(1), 6-13(2010). (下段)。

### 1-2-2. Fyn, c-Src について

Fyn と c-Src は Src Family kinase に属する非受容体型チロシンキナーゼである。Src family kinase に属する v-Src はラウス肉腫ウイルスのがん原遺伝子にコードされており、その遺伝子産物として最初に同定されたタンパク質チロシン残基特異的リン酸化酵素である (Brugge & Erikson, 1977)。その後、v-Src が c-Src の活性化変異体であることが発見され、Fyn を含めた Src kinase Family に属するタンパク質が同定されていった。

Fyn や c-Src はチロシンキナーゼである C-terminal Src kinase (Csk) によってそれぞれの C 末端 (マウスの Fyn, c-Src では Y528, Y530) がリン酸化されることによって不活性体として存在する (図 1-4)。しかし、不活性体であっても神経分化に伴って  $\gamma$ -Tubulin と複合体を形成するなど、不活性体で

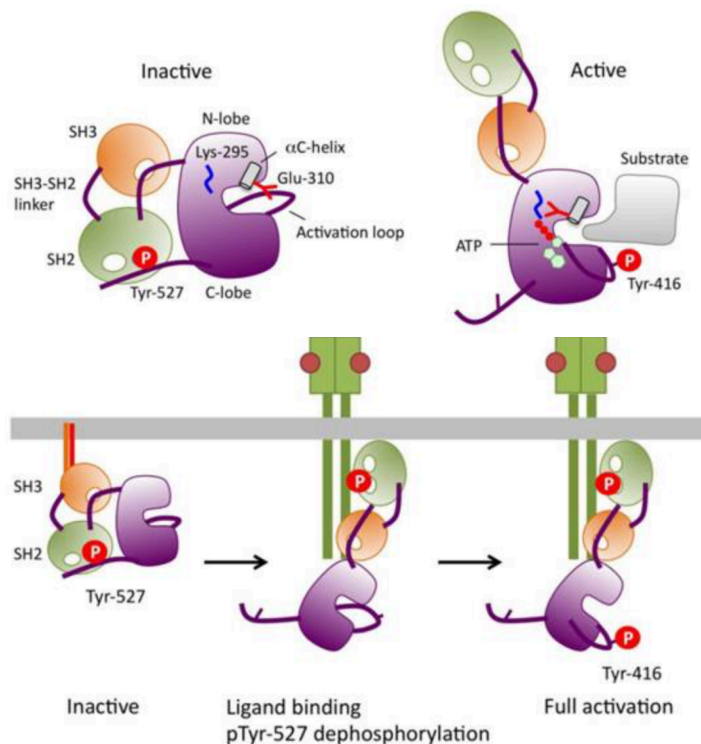


図 1-4. Src kinase family の活性化機構

Masato Okada. *Internet Journal of Biosciences*08: 1385-1397 (2012)

の機能を有していることが報告されている (Kukharskyy et al., 2004) (図 1-4)。

c-Src は普遍的に複数の細胞種での発現が見られるが、Fyn は脳や T 細胞、B 細胞での発現量が多い。また、c-Src、Fyn はミリスチル化修飾され、さらに Fyn は 2 箇所のパルミトイル化修飾がされる翻訳後修飾の違いも細胞内での機能の違いに影響し、細胞膜、特に脂質ラフトへの局在も異なると考えられている。v-Src においてはミリスチル化を阻害すると細胞のがん化能を失うことが知られている。このように非受容体型チロシンキナーゼである Src kinase Family はそれぞれのもつ機能が研究対象にされてきており、その意義を探求することは興味深い。

## 1-2. 神経細胞について

神経系には神経細胞とグリア細胞の 2 種類の細胞が存在する。神経細胞は情報伝達に特化した神経系を構築する細胞である。神経細胞は大きく分けて神経突起、細胞体で構築されており、神経突起はさらに軸索と樹状突起に分類できる。細胞体には核が存在し、タンパク質の合成などを行う場として細胞代謝を担っている。軸索と樹状突起は情報の送信と受容と役割が異なっており、それぞれイオンチャネルの数や局在する小胞の種類なども異なっている。さらに、神経細胞は機能的カテゴリーとして脳や脊髄からの情報を伝達する遠心性を有する運動ニューロン、脳や脊髄へ情報を伝える求心性を有する感覚ニューロン、脳領域同士をつなげる介在性を有する介在ニューロンに分類される。

神経細胞には Ramon y Cajal が発見した形態的な種類の分類が存在する (López-Muñoz, Boya, & Alamo, 2006)。そのなかで、本研究で扱った P19 細胞は双極ニューロンに分類される。双極ニューロンは体の末梢から情報を受け取る樹状突起と中枢に情報を運ぶ軸索の 2 本の突起を出す。網膜や鼻の嗅上皮の細胞などにも存在する感覚ニューロンは主に双極ニューロンである。

我々の脳内ではこのようなニューロンを介した多数の情報交換を続けることによってその思考や生体の維持がなされている。そのような神経細胞間での情報交換は主にシナプスによって行われており、前シナプスから放出された神経伝達物質が後シナプスに受容されることでその情報交換がなされる。その神経伝達物質の放出、受容には細かな分子メカニズムによる制御が存在し、 $\text{Ca}^{2+}$ の流入や貯蓄などイオンによる動きやリン酸化などの翻訳後修飾による動きのような複数のファクターが存在する。しかしながら、その全ての分子メカニズムが明らかになっていないわけではない。

最近では、生体内での情報伝達メカニズムが、それらを解明する手法の開発に伴い、研究の対象として注目されている。特に、光によって受容体の機能の制御を行う光遺伝学的手法 (Zemelman, Lee, Ng, & Miesenböck, 2002) や、 $\text{Ca}^{2+}$ の動きを可視化するための、Green Fluorescent Protein (GFP) と CaM を融合させて  $\text{Ca}^{2+}$ の結合により蛍光を発する GCaMP (J. Nakai, M. Ohkura, & K. Imoto, 2001) を用いた解析や、さらに、2 光子顕微鏡による生体内イメージングによる貢献が大きい。これらの手法を用いることによって、培養細胞のレベルだけではなく個体レベルでも神経機能の研究を行うことが可能となっている。しかし、脂質ラフトの解析のような微小領域に関する研究は未だ困難である。

### 1-2-1. 神経細胞の分化について

脊椎動物における神経系細胞への分化は、多分化能を有する未分化な細胞からニューロンやグリア細胞が順次に産生されることで説明される。これらの分化は細胞外分泌因子が時期依存的に変化することで産生される細胞種が変化していくことが考えられている。現在のところは未だ明らかになっていないが、**all trans retinoic acid** によってニューロン分化を決定する重要な因子であるとされている。このような分化は中枢神経系に分化する細胞内において塩基性 **basic helix-loop-helix (bHLH)**型転写因子によって制御されており、分化の段階に従ってそれぞれの転写因子の下流に位置する遺伝子発現を誘導する。それらの **bHLH** 型転写因子には **Neurogenin 1**、**Mammalian achaete-scute homolog 1**、**Neurogenic differentiation** などが含まれ、それぞれニューロンへの運命決定、ニューロンのサブタイプの決定、移動、成熟などに関わり、生体内での位置関係や成熟段階によって発現が異なる。

中山らの確立した **induced pluripotent stem (iPS) cell** のような多能性幹細胞 (Takahashi & Yamanaka, 2006)や、胚性腫瘍細胞株を用いた神経分化に関する研究が盛んに行われており、分化誘導の方法によって効率や誘導される分化の方向性が異なる。本研究で用いた **P19** 細胞はそれらの中でも、レチノイン酸刺激を伴った胚様体形成法によって神経系への分化が可能であり (Jones-Villeneuve, McBurney, Rogers, & Kalnins, 1982)、今回、常法に従い神経系へ分化させた **P19** 細胞を研究に使用した。

## 1-2-2. BDNF 刺激による細胞の応答について

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)は、NGF の次に同定された Neurotrophin protein family の一つである (Leibrock et al., 1989)。BDNF は記憶や学習に関わることが示唆されており、その受容体である TrkB は大脳皮質や海馬、大脳基底核などに発現が多い (Tapia-Arancibia, Aliaga, Silhol, & Arancibia, 2008)。さらに、BDNF を産生できないマウスは出生後に致死となることや、正常な神経の発達ができないことから、BDNF が神経系の発達にも大きく関わる因子であることが解る。

BDNF が TrkB に受容されることで生じる BDNF-TrkB シグナリングは細胞骨格の編成、神経突起の伸長、神経伝達物質である  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)、グルタミン酸の放出などの生理現象を活性化させる (Blum & Konnerth, 2005; Leal, Comprido, & Duarte, 2014; Poo, 2001) (図 1-5)。さらに、TrkB は BDNF を受容することで脂質ラフトに移行することが報告されている (S. Suzuki et al., 2004)。しかし、その移行メカニズムや BDNF-TrkB シグナリングの分子メカニズム (Alam, Subramanyam Rallabandi, & Roy, 2016) が明らかになっていない。

BDNF の発現量や分泌量の変化に関わる疾患としてパーキンソン病、統合失調症、うつ病、ジストニアなどが報告されている (Cui, Yang, & Teasdale, 2018)。これらの疾患は未だに詳細な発症メカニズムが不明で治療法が確立しておらず、研究が急がれている。

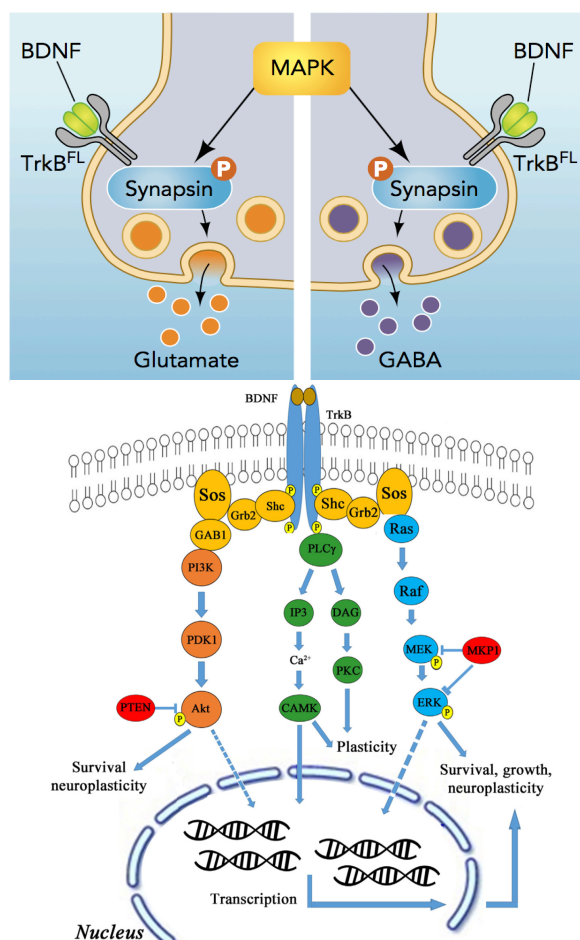


図 1-5. BDNF 刺激によるシグナル伝達経路と神経伝達物質の放出

Blum & Konnerth. *Physiology* **20**, 70-78 (2005) (上段)。Alam, Subramanyam Rallabandi & Roy. *Frontiers in Neurology* **7**, 1-16 (2016) (下段)。

### 1-3. NAP-22 について

Neuronal tissue-enrichment acidic protein 22 kDa (NAP-22)は CaM 結合蛋白質としてラットの脳組織から発見された (S Maekawa, Maekawa, Hattori, & Nakamura, 1993)。NAP-22 は Brain acid-soluble protein 1 (BASP1)とも呼ばれ (M. Mosevitsky et al., 1997)、ニワトリの脳から同定された Cortical cytoskeleton-associated protein (CAP)-23 のホモログである (Widmer & Caroni, 1990)。NAP-22 は myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)ファミリーに属するミリストイル化タンパク質であり、単独では特定の構造を持たない天然変性タンパク質である (Maurer-Stroh et al., 2004; M. I. Mosevitsky, 2005; M. I. Mosevitsky, Novitskaya, Plekhanov, & Skladchikova, 1994)。

このような性質からその立体構造の解析も行われているが、full-length での立体構造は解き明かされていない (Forsova & Zakharov, 2016)。ミリストイル化によって脂質ラフトに局在することから NAP-22 の機能の解明は脂質ラフトによって支えられる神経機能の理解につながると考えられてきた (Kropotova, Klementiev, & Mosevitsky, 2013; Marilyn D Resh, 2016; Zakharov et al., 2003)。

また、NAP-22 をノックアウトしたマウスは神経機能の発達異常や出生早期に死亡してしまうことから、神経機能を発揮するために必要なタンパク質であると考えられる (Frey, Laux, Xu, Schneider, & Caroni, 2000)。当研究室は、ミリストイル化 NAP-22 (myrNAP-22)と Ca<sup>2+</sup>-CaM の結合様式を解明した (Matsubara, Nakatsu, Kato, & Taniguchi, 2004; Takasaki, Hayashi, Matsubara, Yamauchi, & Taniguchi, 1999)。これにより、ミリストイル化タンパク質と CaM による相互作用の詳細なメカニズムが明らかとなった (Hayashi et al., 2004; Matsubara, Titani, Taniguchi, & Hayashi, 2003)。

NAP-22 は脳組織に大量に存在することから、神経特異的なタンパク質と考えられている。シナプス小胞の形成に関わる Synaptojanin-1 (Takaichi et al., 2012)や GABA の代謝に関わる GAD65, GAD67 (Shohei Maekawa et al., 2013)、などの、脳の機能に関わっている相互作用因子が複数同定されている。また Actin-capping protein である CapZ (Odagaki, Kumanogoh, Nakamura, & Maekawa, 2009)など小胞

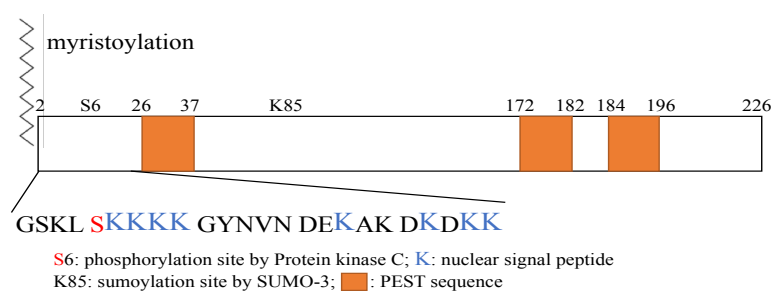


図 1-6. NAP-22 のアミノ酸残基とその機能

や細胞骨格に関わるタンパク質との相互作用も示されてきた。さらに、電子顕微鏡で観察した結果、プレシナプスやシナプス小胞、ミトコンドリアのアウトターリーフレットにも NAP-22 が局在することが明らかとなった (Iino, Kobayashi, & Maekawa, 1999)。

近年、脳組織だけではなく、体内には広く NAP-22 が発現していることが明らかとなった (Carpenter et al., 2004; Sanchez-Niño et al., 2010)。ヒト細胞では脂質と結合した NAP-22 が転写調節に関わることが示されており、脳組織で示唆されてきた機能だけではないことが明らかとなった (Goodfellow et al., 2011; Green, Wagner, Campbell, Addison, & Roberts, 2009; Toska et al., 2012)。さらに、NAP-22 は phosphatidylserine (PS) や phosphatidylinositol (PI) と強く結合する (Shohei Maekawa, Kobayashi, Morita, & Suzaki, 2015) ことや、Calcineurin との相互作用が示され (Kobayashi et al., 2015)、Ca<sup>2+</sup> 依存的な機能や酸性脂質に関連した役割があることが特定され始めている。

## 第 2 章

### 神経分化前後における脂質ラフトの解析

## 2-1. 目的

神経細胞の分化や活動には脂質ラフトの機能が関わっていることが示されている (Cunha, Brambilla, & Thomas, 2010; De Juan-Sanz et al., 2014; Langelier, Linard, Bordat, Laviaille, & Heberden, 2010; Sebastião, Colino-Oliveira, Assaife-Lopes, Dias, & Ribeiro, 2013)。特に、神経細胞でのシグナル伝達や細胞接着、神経突起の伸長、神経栄養因子の取り込みによって生じる刺激、また、刺激によって促進される細胞応答のいくつかは脂質ラフト依存的である (Kotani et al., 2017; Marte, Messa, Benfenati, & Onofri, 2016; S. Suzuki et al., 2004)。

これまでに神経分化や神経機能に関する研究では、ラット由来副腎褐色細胞腫 PC12 細胞やヒト由来神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2a 細胞などの細胞が主に使用されている。一方、神経分化に関する遺伝子解析ではマウス胚性癌腫細胞株 P19 細胞が使用されることが多い。P19 細胞では、マウス ES 細胞と同等の神経発生を観察することができ、さらに、形態的にも初代培養細胞に似通っている (Staines, 1994)。そこで、生体により近い細胞でその神経分化前後の脂質ラフトを解析することによって、脂質ラフトの機能や、神経機能に関する脂質ラフトが関わるメカニズムに関する知見が得られると考えた。そこで、本研究では、神経モデル細胞 P19 細胞のサブクローン P19C6 細胞を用いた、神経分化前後の脂質ラフトの解析を行なった。

P19 細胞の脂質ラフトを研究するにあたり、脂質ラフトマーカーであり、神経細胞の神経突起伸長に必須なタンパク質である Flot2 に着目した。ヒト由来多能性間質性細胞 hMSCs の神経分化において Flot2 の mRNA の発現量変化が解析され、神経分化に従って発現量が増加することが報告されている (Makdissy et al., 2018)。予備検討において、P19 細胞に Flot2 と enhanced green fluorescent protein (EGFP) を融合させた Flot2-EGFP を発現させようを試みたが、有意に蛍光や発現量が認められる発現株の作製はできなかった。さらに、神経分化させると Flot2 の発現量が増加することがわかった。そこで、P19 細胞においても Flot2 が神経分化に関わると考え、Flot2 の含まれる脂質ラフト、他の脂質ラフトマーカーの局在を観察することで、脂質ラフトの機能構造を解析することを目的とした。

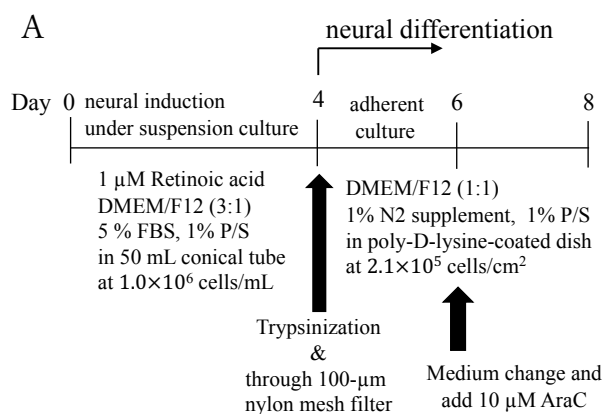
## 2-2. 結果

### 2-2-1. 神経分化過程における脂質ラフトマーカートンパク質の発現量、存在量変化の解析

P19細胞は胚様体形成と高濃度レチノイン酸刺激によって、神経細胞に分化する胚性腫瘍細胞である(図 2-1 A)。神経分化は幹細胞マーカである Oct-3/4 の発現が抑制されること、神経細胞のマーカである MAP2 の発現量が増加することによって確認した(図 2-1 B)。また、神経分化による脂質ラフトマーカートンパク質の発現量の変化や翻訳後修飾の変化を解析するために、未分化細胞、神経分化過程 (Day 4~Day 8) の細胞において、Flot2、Fyn、c-Src、リン酸化体 Fyn もしくは c-Src をウエスタンブロッティングによって検出した(図 2-1 B)。ローディングコントロールとして Tubulin を検出し、ウエスタンブロッティングの結果を未分化細胞、神経分化過程において比較解析を行なった。

Flot2 は神経過程において徐々に発現量が増加し、Day 8 において未分化細胞に比べて有意な発現量増加 (1.6 倍) が確認された(図 2-1 C)。Fyn は未分化細胞に比べ Day 7、Day 8 において有意な発現量の増加 (2.3 倍) が確認された(図 2-1 D)。一方、Fyn と同様に Src kinase family に属する c-Src は神経分化過程において発現量の変化が認められなかった(図 2-1 E)。また、Fyn もしくは c-Src のリン酸化体である Fyn (pY528) もしくは c-Src (pY530) は神経分化過程において徐々に存在量が増加し、未分化細胞に比べ、Day 7 と Day 8 においてその存在量の増加 (2.4 倍、2.6 倍) が有意に認められた(図 2-1 F)。

さらに、ノンラフトマーカであり、細胞膜マーカである Na/K ATPase  $\alpha 1$  subunit (NKA) (Lingwood, Harauz, & Ballantyne, 2005) は Day 8 において 2.6 倍に増加した(図 2-1 G)。この結果は P19 細胞の神経分化前後における LC-MS/MS によるプロテオミクスの報告と一致する (Watkins, Basu, & Bogenhagen, 2008)。



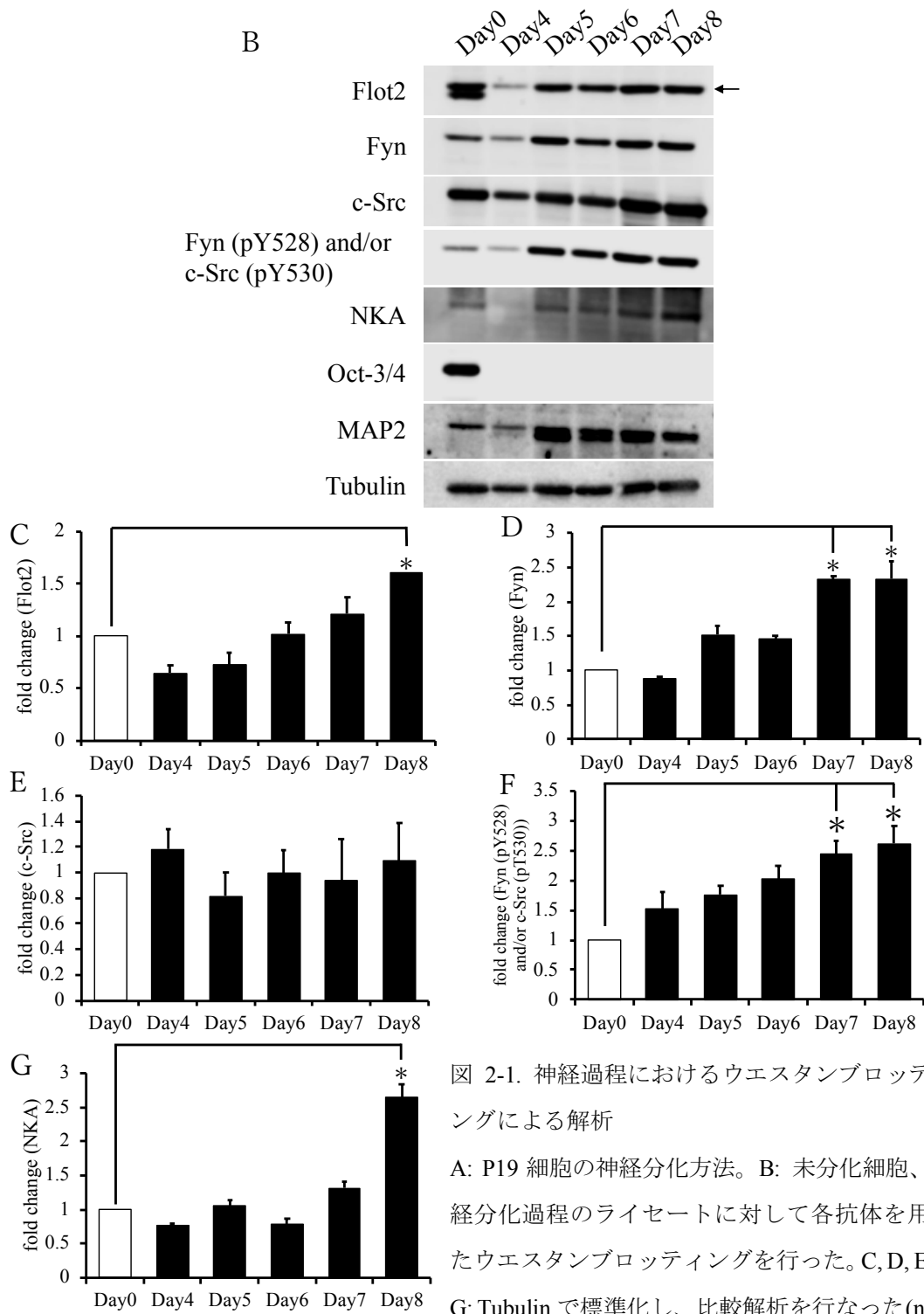


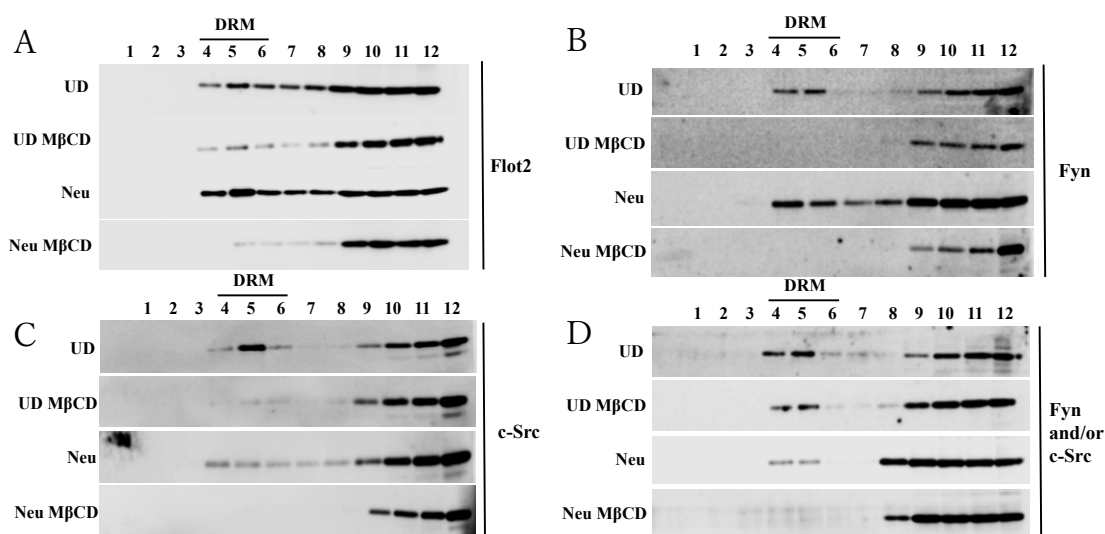
図 2-1. 神経過程におけるウエスタンブロッティングによる解析

A: P19 細胞の神経分化方法。B: 未分化細胞、神経分化過程のライセートに対して各抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。C, D, E, F, G: Tubulin で標準化し、比較解析を行なった(n=4, \* $P < 0.05$ )。Flotillin-2 を Flot2、Na/K ATPase  $\alpha 1$  subunit は NKA、Microtubule associated protein 2 は MAP2 と表記した。

### 2-2-2. ショ糖密度勾配遠心法による局在解析

前項の結果より、未分化細胞 (UD) を Day 0、神経分化後の細胞 (Neu) を Day 8 と定義した。ラフトマーカー (Flot2, Fyn, Fyn (pY528) and/or c-Src (pY530)) とノンラフトマーカー (Na/K ATPase  $\alpha$  1 subunit, NKA) が神経分化前後で増加することがわかったが、その局在が脂質ラフトにあるか、それ以外にあるかが定かではない。そこで、ショ糖密度勾配遠心法による分画によって脂質ラフトへの各タンパク質の局在を解析した。1% Tritonx-100 を添加したバッファ中でホモジナイザーを用いて破碎し、4°C の低温でショ糖密度勾配遠心法による分画を行なった (Kalka, Reitzenstein, & Cantz, 2001)。脂質ラフトが含まれる画分である Detergent resistant membrane (DRM) 画分はショ糖溶液の 5% と 30% の界面に白い靄として回収することができる。本研究では、その靄を回収するのではなく、超遠心後の溶液を上から分取して fraction とした。さらに、細胞膜からコレステロールを除去することで脂質ラフトの構造を壊すことができる Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) (Ilangumaran & Hoessli, 1998) を添加し、DRM 画分への局在を減少させることで、DRM 画分が fraction 4, 5, 6 であることを確認した。(図 2-2 A, B, C, D)。またノンラフトマーカーである NKA は fraction 9, 10, 11, 12 では検出できたが、DRM 画分である fraction 4, 5, 6 には含まれていないことがわかった (図 2-2 E)。

神経分化前後で全画分と比較して DRM に含まれるラフトマーカーの割合を算出し、脂質ラフトへの各タンパク質の局在変化を検討した。Flot2 は 2.5 倍に DRM への局在が増加し (図 2-2 F)、c-Src と Fyn (pY528)/c-Src(pY530) はともに DRM への局在が 0.3 倍に減少した (図 2-2 H, I)。しかし、Fyn は神経分化前後における DRM への局在に差が見られなかった (図 2-2 G)。



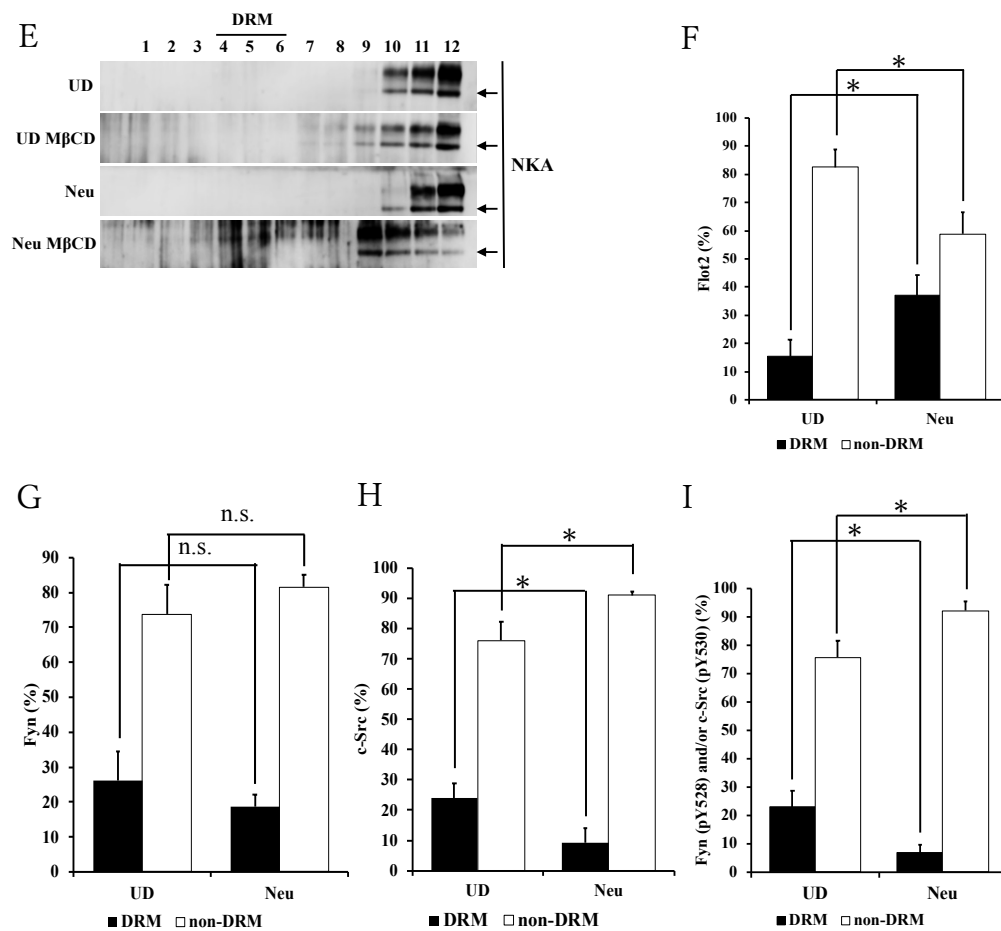


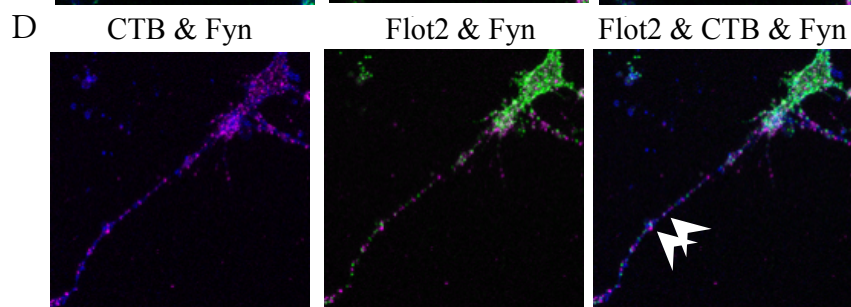
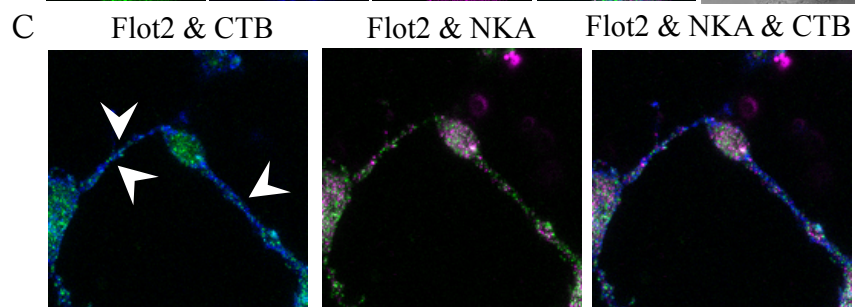
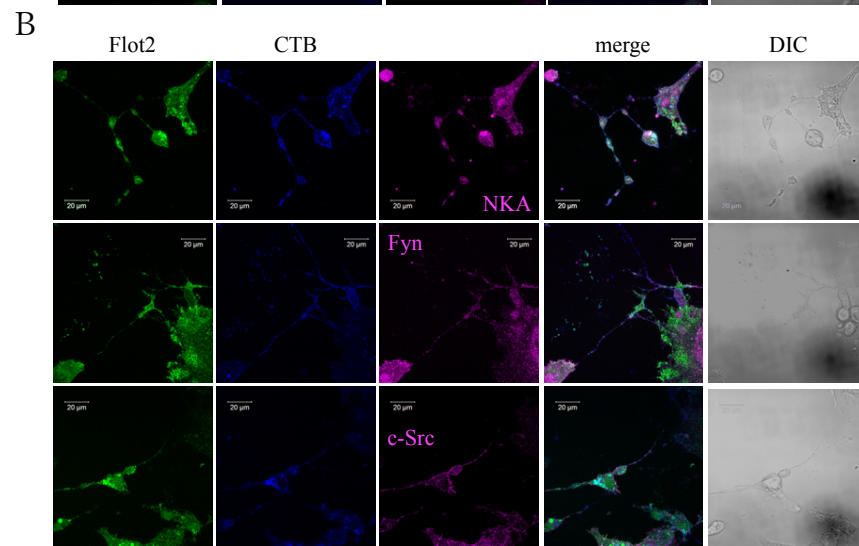
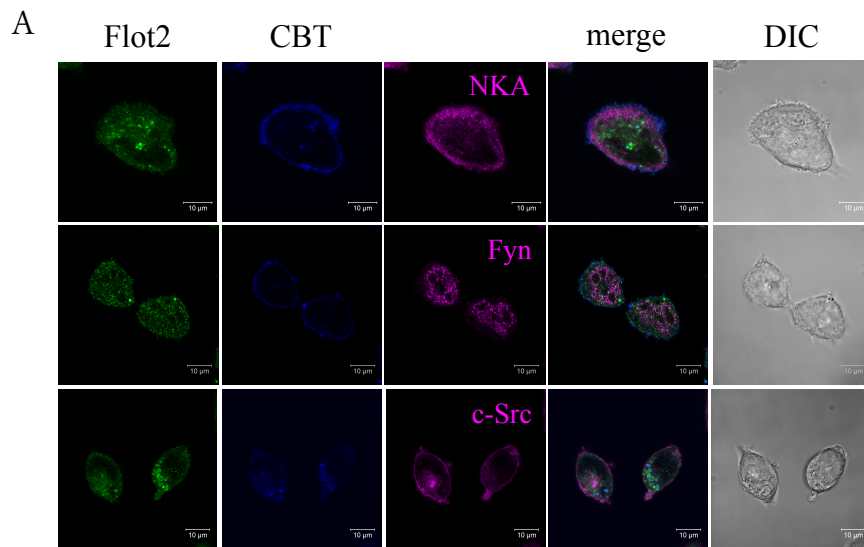
図 2-2. ショ糖密度勾配遠心法によって分画した画分におけるタンパク質の局在解析

A: ショ糖密度勾配遠心法によって得た 12 fraction について抗 Flot2 抗体を用いて Flot2 を検出した。B: Fyn を検出した。C: c-Src を検出した。D: Fyn (pY528)/c-Src (pY530)を検出した。E: Na/K ATPase  $\alpha$  1 subunit (NKA)を検出した。F, G, H, I: A, B, C, D で検出したバンドのインテンシティを 12 fraction における割合に換算し、DRM (fraction 4, 5, 6)に含まれる割合の総和とそれ以外の画分に含まれる割合の総和と比較した (n=6, \* $P$ <0.05, n.s.: non-significant)

### 2-2-3. 免疫蛍光染色による局在検討

シヨ糖密度勾配遠心法によって分画した結果、神経分化後に Flot2 は DRM への局在が増加したことがわかった (図 2-2)。そこで、未分化細胞と神経分化後の細胞において Flot2 とノンラフトマーカである NKA で免疫蛍光染色をすることで、Flot2 の局在を観察した。また、脂質ラフトのマーカである GM1 と結合する Cholera toxin B subunit (CTB)を用いて、GM1 を染色した (図 2-3. A, B)。未分化細胞では、Flot2 は細胞膜と細胞質に分布しており、NKA は細胞質内、細胞膜ともに分布が見られた。しかし、神経分化後には、神経突起において、Flot2 と NKA に局在の違いが見られた (図 2-3 C)。Flot2、NKA ともに細胞体では共局在が見られたが、神経突起ではドット状に点在しており、その多くは共局在していなかった。そこで、未分化細胞の細胞膜近傍と神経分化後の細胞の神経突起部分を定量解析し、Mander's coefficient を算出した。その結果、Flot2 と CTB の共局在率は未分化細胞に比べ増加しているが、Flot2 と NKA の共局在率は未分化細胞と同程度であった (図 2-3 D, E)。CTB と Flot2 の共局在率が増加していることから、神経分化後の細胞の神経突起では GM1 の脂質ラフトに Flot2 が局在していることが考えられる。

次に、未分化細胞と神経分化後の細胞において脂質ラフトマーカである Flot2 と CTB、Fyn または c-Src で染色した。Fyn は細胞内でドット状に存在し、c-Src は細胞膜に沿った局在が未分化、神経分化後の細胞共に見られた (図 2-3 A, B, C)。Flot2, CTB, Fyn, c-Src の局在を Mander's coefficient を算出することで解析したところ、Fyn と CTB の共局在率は神経分化後の神経突起において増加したが、c-Src と CTB の神経分化後の神経突起における共局在率は c-Src が CTB に重なっている割合だけ増加した (図 2-3 H, J)。さらに、Flot2 と Fyn は神経分化後の神経突起において共局在率が増加する傾向にあったが、有意な増加は認められなかった (図 2-3 I)。一方、Flot2 と c-Src は神経分化後の神経突起において共局在率が減少する傾向にあった (図 2-3 K)。



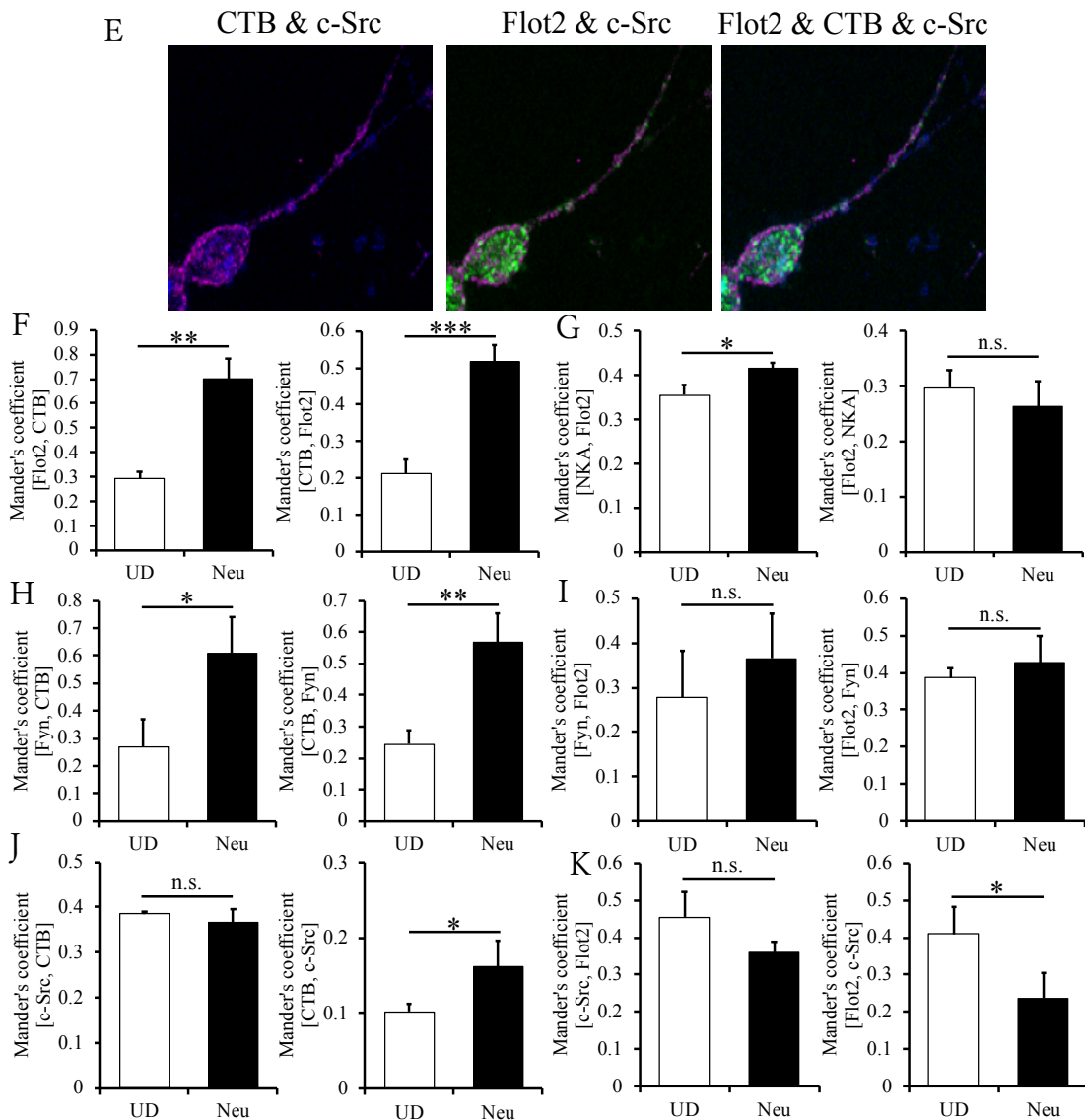


図 2-7 免疫蛍光染色による Flot2 と NKA の局在

A: 未分化細胞を抗 Flot2 抗体 (緑)、Cholera toxin subunit B-Alexa488 conjugated (青)、抗 Na/K ATPase  $\alpha 1$  subunit 抗体、抗 Fyn 抗体、抗 c-Src 抗体 (マゼンタ) で免疫染色を行なった。各抗体で染色した像、3 色の重ね合わせ像 (merge)、微分干渉像 (DIC)を示した。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$  を示す。B: 神経分化後を抗 Flot2 抗体 (緑)、Cholera toxin subunit B-Alexa488 conjugated (青)、抗 Na/K ATPase  $\alpha 1$  subunit 抗体、抗 Fyn 抗体、抗 c-Src 抗体 (マゼンタ) で免疫染色を行なった。各抗体で染色した像、3 色の重ね合わせ像 (merge)、微分干渉像 (DIC)を示した。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$  を示す。C: B で示した神経分化後の細胞の拡大像を示した。D, E, F, G, H, I: 未分化細胞の細胞膜近傍と神経分化後の細胞の神経突起部分の Mander's coefficient (0~1)を算出した。Mander's coefficient は縦軸に示した[A, B]により、A の蛍光シグナルに B の蛍光シグナルが重なっている割合を表す (cells=10, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , n.s.: non-significant)。Na/K ATPase  $\alpha 1$  subunit は NKA、Cholera toxin subunit B は CTB と表記した。

### 2-3. 考察

本研究は、P19C6 細胞を用いた神経分化前後における脂質ラフト研究の初の例である。P19C6 細胞は神経分化モデルとして用いられる細胞の一種であるが、同様に使用される PC12 細胞や SH-SY5Y 細胞に比べて化学物質への応答に感受性が高いことが報告されている (Popova, Karlsson, & Jacobsson, 2017)。そのような感受性の高さから、他の神経分化モデルに比べ、脂質ラフトの特徴である刺激応答の効率化に関する知見が得られる可能性が高い。

神経分化前後において、神経分化に従って Flot2 の発現量が増加していることがわかった (図 2-1. B)。これまでの報告では、hMSCs において、神経分化後に Flot2 の mRNA の増加や、細胞質ではなく細胞膜画分や脂質ラフト画分でのタンパク質の増加が示されていた (Makdissy et al., 2018)。しかしながら、P19 と同様に神経細胞のモデル細胞として用いられる PC12 細胞では、神経様細胞への分化前後では Flot1 の増加は示されているが、Flot2 は変化が無いとされていた (Volonté et al., 1999)。PC12 細胞は副腎由来の細胞であり神経系への分化能のみを有するが (Greene & Tischler, 1976)、hMSCs や P19 細胞は他の細胞種への分化能をもつ (Makdissy et al., 2018; McBurney, 1993; Pittenger, 1999)。Flot2 の神経分化による発現量増加が細胞種ごとに異なる理由は分化能によるものである可能性がある。さらに、PC12 細胞は末梢神経系への分化を示し (Laux et al., 2000a)、P19 細胞は中枢神経系への分化を示すことから、分化後の神経系の分類による脂質ラフトの違いを表している可能性がある。P19 細胞は生体本来の分化機構に近く、胚様体の形成を必要とするなど神経細胞への分化の様式に違いを有する (Edwards & McBurney, 1983)。そのため、Flot2 の発現量増加は生体本来の神経細胞への分化機構に関与する可能性が考えられる。

本研究において、未分化細胞に比べ神経分化後の細胞では Flot2 が脂質ラフト画分で増加したことが示された (図 2-2 A, F)。また、未分化細胞では細胞膜近傍と細胞質に見られていた分布が、分化後の細胞では細胞体の細胞質と神経突起に分布するようになったことが免疫染色によってわかった (図 2-3 A, B, C)。Flot2 ノックアウトマウスでは、神経細胞の成熟が阻害されており、さらに Flot2 は N-methyl-D-aspartate receptor との相互作用が報告されている (Bodrikov, Pauschert, Kochlamazashvili, & Stuermer, 2017)。また、Flotillin は Rab11a の小胞に含まれ、クラスリン非依存的エンドサイトーシスを引き起こすために必須である。PSD-95 や N-cadherin、グルタミンレセプターの輸送が Fyn に制御された

Flotillin によるエンドサイトーシスによって行われる (Babuke et al., 2009; Bodrikov et al., 2017)。そのほかにも Flotillin はスフィンゴシンを細胞膜にリクルートすることで細胞膜の維持に関わることが示されている (Riento et al., 2018)。今回得られた結果では、このような機能を果たす Flot2 は神経分化後に神経突起に構成された脂質ラフトに局在し、神経分化だけではなく神経活動そのものに関わる脂質ラフトの重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、その脂質ラフトは脂質ラフトマーカーである GM1 が構成する脂質ラフトである可能性が神経突起における Flot2 と GM1 の共局在率が高いことから想定される (図 2-3. D)。

Na/K ATPase にはサブユニットがいくつか存在する (Pietrini, Matteoli, Banker, & Caplan, 1992)。本研究で用いた  $\alpha 1$  サブユニットは多くの細胞種で恒常的に発現し、c-Src の活性化に寄与する (Li & Xie, 2009; Ye et al., 2013)。さらに、PC12 細胞や腎臓由来の細胞では、NKA は caveolin-1 (Cav1) とマイクロドメインであるカベオラを形成することで、Phosphoinositide-3 kinase などを経た  $Ca^{2+}$  シグナリングに関わる (Tian & Xie, 2008)。Cav1 と NKA の caveolin-binding motif を介した相互作用は、Cav1 のエンドサイトーシスを引き起こす (Cai et al., 2008)。本研究において、カベオラを形成している場合、NKA はラフト画分に分画されるはずであるが、検出されなかった (図 2-2. E)。この結果から、P19C6 細胞において神経分化前後に関わらず NKA  $\alpha 1$  を含むカベオラ様脂質ラフトは形成されていないことが考えられる。この結果は、先述した PC12 細胞などの細胞株と P19 細胞のような胚由来の細胞種との神経への分化機構の違いが、それを制御する脂質ラフトの違いに由来するという可能性を示している。

リン酸化された Fyn とリン酸化された c-Src は P19 細胞の神経分化にしたがって  $\gamma$ -tubulin と結合することが報告されている (Kukharskyy et al., 2004)。Fyn の pY528 と c-Src の pY530 は抑制的に機能するチロシンリン酸化サイトであり、CSK によってリン酸化が維持されている (Takayama, Nada, Nagai, & Okada, 1997)。pY528 と pY530 の脱リン酸化によって Fyn と c-Src は機能するようになる (Nada et al., 1993)。本研究結果より、c-Src は神経分化に従った発現量の変化を示さなかったが、Fyn は Day7 以降に発現量が増加することがわかった。さらに、リン酸化体 Fyn もしくは c-Src の存在量は神経分化に従って増加した。しかし、リン酸化体は Fyn もしくは c-Src に関して、Fyn の発現量が増加していることから、存在量が増加したと断定することができなかった (図 2-1.)。シヨ糖密度勾配遠

心法による分画では、DRM 画分への局在が c-Src とリン酸化体 Fyn もしくは c-Src が共に減少した。これらの結果から、Fyn, c-Src 共に脂質ラフトへの局在が減少していることが想定される (図 2-2)。分画による局在解析の結果から c-Src は神経分化後に脂質ラフトへの局在が減少することが示された。しかし、免疫染色の結果では、Fyn は GM1 との共局在率が増加していることから GM1 の脂質ラフトへの局在が増加していることが考えられるが、c-Src は GM1 との局在率が変化しなかった。c-Src は GM1 の脂質ラフトへは局在しないことが考えられる。免疫染色の結果はシヨ糖密度勾配遠心法による分画との異なる結果が得られたことが示された。この矛盾点は GM1 以外の脂質ラフトを構成する脂質分子との共染色や超解像顕微鏡による観察によって検証できる。脂質ラフトへの局在を議論するにあたり、複数の脂質の種類でタンパク質が局在する脂質ラフトの種類を同定するような解析が必要なほか、現在の解像度が 100 nm 程度であるが、50 nm 近くの解像度によって脂質ラフトマーカー同士の精細な観察ができると考えられる。

しかし、これらの神経分化前後における局在変化や活性化の変化は神経特異的な機能である生存シグナルの惹起や神経突起の伸展、後シナプスの  $\text{Ca}^{2+}$  により誘導される機能が制御されていることに由来する変化であると考えられる (Bodrikov et al., 2017; Boerner et al., 1996; Brignatz et al., 2009; den Hertog et al., 1993; Vacaresse, Møller, Danielsen, Okada, & Sap, 2008)。

本研究結果より、Flot2 は神経分化後に脂質ラフトに移行し、神経突起において Flot2 を含む脂質ラフトが形成されていること。神経分化後に c-Src とリン酸化体 Fyn もしくは c-Src は脂質ラフト以外の領域に移行しており、Fyn は GM1 の脂質ラフトへの局在が増加し、c-Src の GM1 の脂質ラフトへの局在が減少していることがわかった。

## 第 3 章

### BDNF 刺激下における NAP-22 の機能解析

### 第3章 BDNF 刺激下における NAP-22 の機能解明

#### 3-1. 目的

NAP-22 は神経細胞特異的なタンパク質として前川らに同定されたタンパク質である (S Maekawa et al., 1993)。その後、 $\text{Ca}^{2+}$ -CaM との相互作用や PKC によるリン酸化によって脂質ラフトへの局在が可逆的に変化することが知られている (Shohei Maekawa, Murofushi, & Nakamura, 1994)(Matsubara et al., 2004)。現在では転写因子である Wilms' tumor 1 protein (WT1) の転写共因子として Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 依存的に複合体を形成し、Histone deacetylase 1 との相互作用によって WT1 の転写抑制に関わることがマウスやヒト細胞で明らかにされている (Green et al., 2009; Toska et al., 2012)。

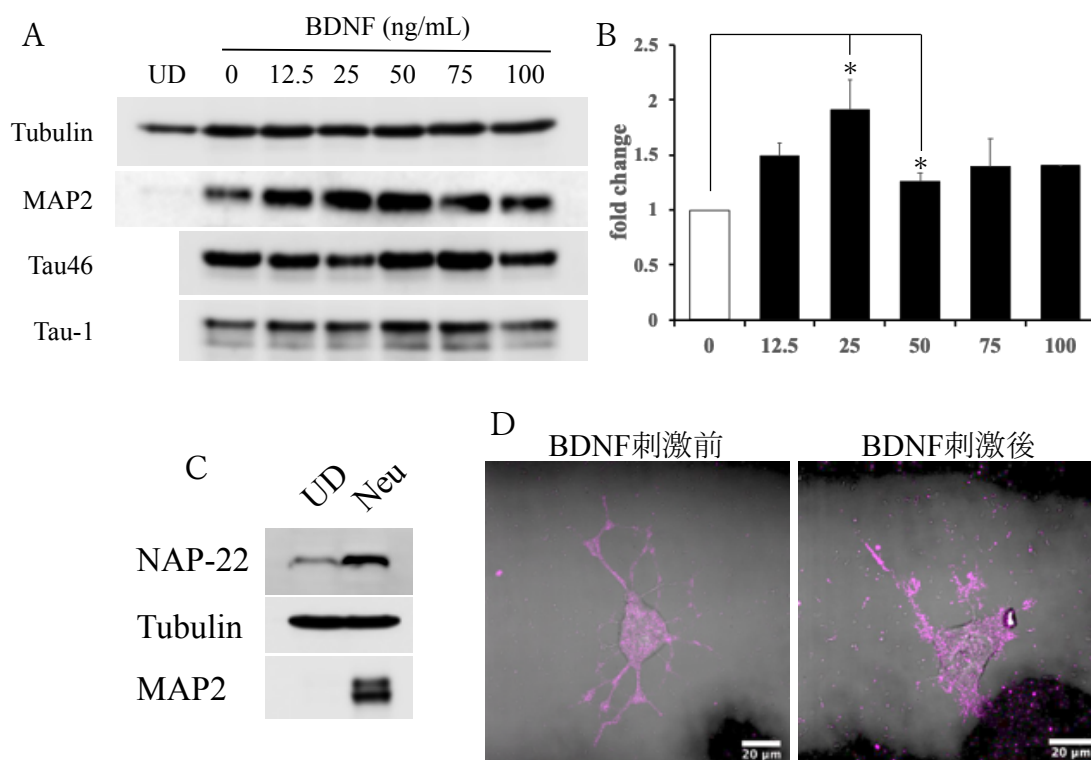
神経細胞ではラットの脳を用いた解析によって複数の相互作用因子が示されており、Calcineurin や CaM などのシグナル伝達に関わるタンパク質や、actin や CapZ のような細胞骨格に関わるタンパク質、GAD65/67 や Synaptojanin-1, Dynamine I などの小胞形成に関わるタンパク質が報告されている (Kobayashi et al., 2015; Shohei Maekawa et al., 2013; Odagaki et al., 2009; Takaichi et al., 2012; Ueno, Miyoshi, Maruyama, Morita, & Maekawa, 2018)が、どのような細胞内シグナル伝達経路に関わるか、また、どのような生理現象に関わるかは明らかではない。さらに、*in vitro* でのタンパク質レベルの解析では NAP-22 同士の複合体の形成やその複合体がチャンネルを形成するなど、いくつかの報告がある。しかし、実際に脂質ラフトでの機能も明らかになっていない。

これまでの報告から NAP-22 が GABA の産生やシナプス小胞の形成のプロセスの一部に関わっており、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存的な細胞応答に関わることから BDNF-TrkB シグナリングとの関連性が高いことが想定される。そこで、本研究では BDNF-TrkB シグナリングに関わる NAP-22 の機能を、NAP-22 との相互作用因子を同定することによって明らかにできると考えた。BDNF 刺激によって NAP-22 と相互作用するタンパク質を、NAP-22 が固相化されたビーズを用いて共沈して得られたタンパク質を同定し、その結果により NAP-22 の機能的な変化を推定し、それを検証することで、NAP-22 が関わる細胞内分子メカニズムを明らかにすることができると考えた。

## 3-2. 結果

### 3-2-1. BDNF 刺激の検討

P19C6 細胞への BDNF 刺激では、Tau タンパク質の脱リン酸化が報告されている (Elliott, Atlas, Lange, & Ginzburg, 2005)。本実験系においては、細胞を刺激する際の最適な BDNF 濃度を検討した。各 BDNF 濃度で神経分化後の P19 細胞へ刺激を与え、そのライセートを用いて抗 Tau 抗体 (Tau46) と抗脱リン酸化 Tau 抗体 (Tau-1) を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 3-1 A)。その結果、25 ng/mL で脱リン酸化が有意に確認できたため、25 ng/mL を刺激に用いる濃度として決定した (図 3-1 B)。また、P19C6 細胞の神経分化前後における NAP-22 の発現をウエスタンブロッティングによって調べた (図 3-1 C)。NAP-22 は神経分化によってその発現量が増加した。さらに、BDNF 刺激によって変化する NAP-22 の局在を神経分化後の細胞を用いたショ糖密度勾配遠心法で解析した (図 3-1 E)。脂質ラフトマーカである Flot2 も NAP-22 も BDNF 刺激によって脂質ラフトを含む画分である DRM (fraction 4, 5, 6) への局在が増加することがわかった。さらに、BDNF で刺激した神経分化後の細胞を抗 NAP-22 抗体で免疫染色したところ、神経突起の先端に NAP-22 が集積することがわかった (図 3-1 D)。



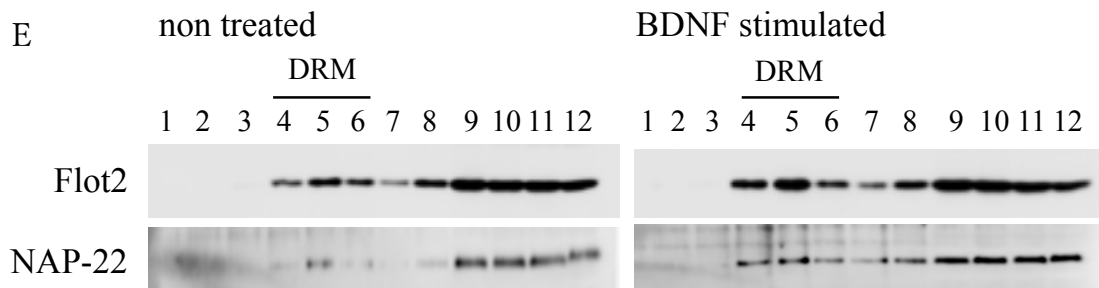


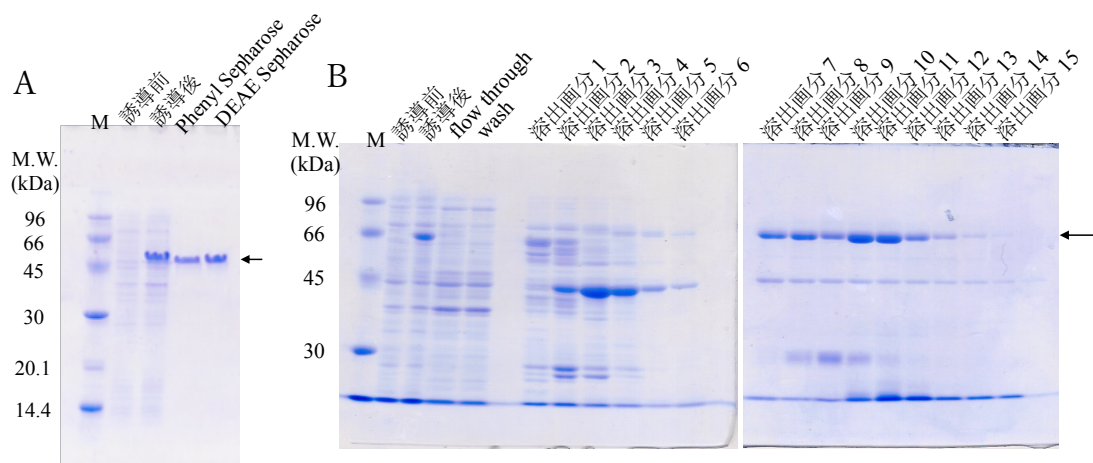
図 3-1 BDNF 刺激の検討

A, B: BDNF 刺激を与えた神経分化後の P19C6 細胞のライセートに対するウエスタンブロッティングの結果。UD は未分化細胞を示し、BDNF は添加後の終濃度を示す。Tubulin はローディングコントロール、MAP2 は神経分化マーカー。Tau46 は Tau タンパク質のリン酸化部位以外のエピトープを認識し、Tau-1 は脱リン酸化を認識する。グラフは Tau-1 によって認識されたバンドを Tau46 で標準化し、Tubulin の比重をかけたものを表す (\* $P < 0.05$ )。C: 神経分化前後における NAP-22 のウエスタンブロッティング結果。D: BDNF 刺激前後の神経分化後の細胞の蛍光画像。抗 NAP-22 抗体で染色した蛍光像 (マゼンタ) と DIC を重ね合わせた。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。E: BDNF 刺激を与えた細胞と与えていない細胞をショ糖密度勾配遠心法によって分画した画分のウエスタンブロッティングの結果。

### 3-2-2. NAP-22 固相化ビーズの作製

共沈実験のために、リコンビナント体 NAP-22 と NAP-22 のミリストイル化に必要な酵素であるリコンビナント体 N-myristoyl transferase 1 (NMT-1)を調製した (図 3-2 A, B)。さらに、これらのタンパク質を用いて *in vitro* でミリストイル化を行い、質量分析でミリストイル化を確認した (図 3-2 C)。その結果、ミリストイル化がほぼ 100%進んでいることが確認できた。

これまでの報告では臭化シアンによって活性化したアガロースビーズを用いた共沈実験が行われているが、その方法では NAP-22 のアミノ基を含むアミノ酸残基 (リジン、アルギニン) でビーズに固相化していた。それに対して、今回はカルボニル基を含むアミノ酸残基 (アスパラギン酸、グルタミン酸) での固相化を行ったビーズを作製した。通常、タンパク質のアミンを用いた固相化の場合、ビーズ表面のカルボニル基を活性化させるため、タンパク質同士の結合が生じない。しかし、タンパク質のカルボニル基を用いた固相化の場合はタンパク質側のカルボニル基を活性化させてビーズ表面のアミンに固相化するため、タンパク質同士の結合が懸念される。そこで、BSA、NAP-22、ミリストイル化 NAP-22 (myrNAP-22)の固相化上清を SDS-PAGE で展開し、タンパク質同士が結合しない条件を検討した。固相化されていることを同様の方法で確認した (図 3-2 D)。



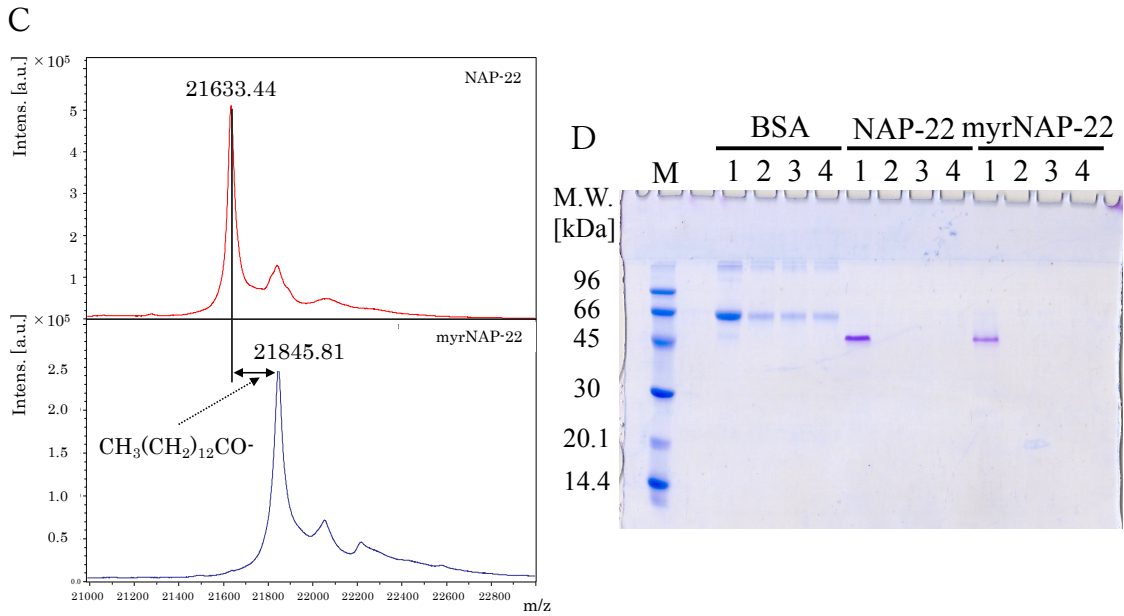


図 3-2 NAP-22 固相化ビーズの作製

A: リコンビナント NAP-22 の調製。左からマーカー、誘導前の菌体、誘導後の菌体、Phenyl Sepharose column 精製画分、DEAE Sepharose Column 精製画分。B: リコンビナント NMT-1 の調製。左からマーカー、誘導前の菌体、誘導後の菌体、素通り画分、wash 画分、溶出画分 1-15。C: MALDI-TOF MS による *in vitro* myristoylation の測定。縦軸はインテンシティ、横軸は質量電荷比を表す。D: 磁気ビーズへのタンパク質の固相化。未反応 (1), 反応後上清 (2, 3, 4)。

### 3-2-3. NAP-22 と細胞内タンパク質の相互作用因子の同定

前項で作製した NAP-22 またはミリスチル化した NAP-22 (myrNAP-22) を固相化したビーズと BDNF 刺激をおこなった神経分化後の P19C6 細胞のライセートの共沈実験を行った。共沈したタンパク質は SDS-PAGE で展開した (図 3-3)。未刺激 (Control)、BDNF 刺激後 (BDNF) のライセートはともに beads のみの共沈物、BSA をコートした beads との共沈物、NAP-22 または myrNAP-22 をコートした beads との共沈物の SDS-PAGE 上で差が見られたバンドを選択し、各バンドを同じ高さで切り出した。それぞれの切り出したゲルは、トリプシン消化を行い、質量分析により同定した。同定結果は、NAP-22、myrNAP-22 をコートした beads で同定された結果から、beads のみ、BSA をコートした beads で同定された結果をバックグラウンドとして差し引いた。さらに、同定結果の信頼度を示す Mascot score を平均化し、平均値以上のものを一覧とした (表 1, 2, 3, 4)。

同定結果から、BDNF 刺激によって変化した NAP-22 の相互作用因子が明らかとなった。

これらのタンパク質を機能別に David (Jiao et al., 2012) を用いて分類したところ、刺激前では extracellular exosome, Acetylation, Cytoplasm, Phosphoprotein, translation, ribosome, UbI conjugation, mitochondrion に関わることが挙げられるのに対し、刺激後では Ribosomal protein, extracellular exosome, Ribonucleoprotein, translation, poly(A) RNA binding, cytosolic large ribosomal subunit に関わることが挙げられた。刺激前に比べ刺激後にはタンパク質合成系に NAP-22 が関わっている可能性が示唆された。

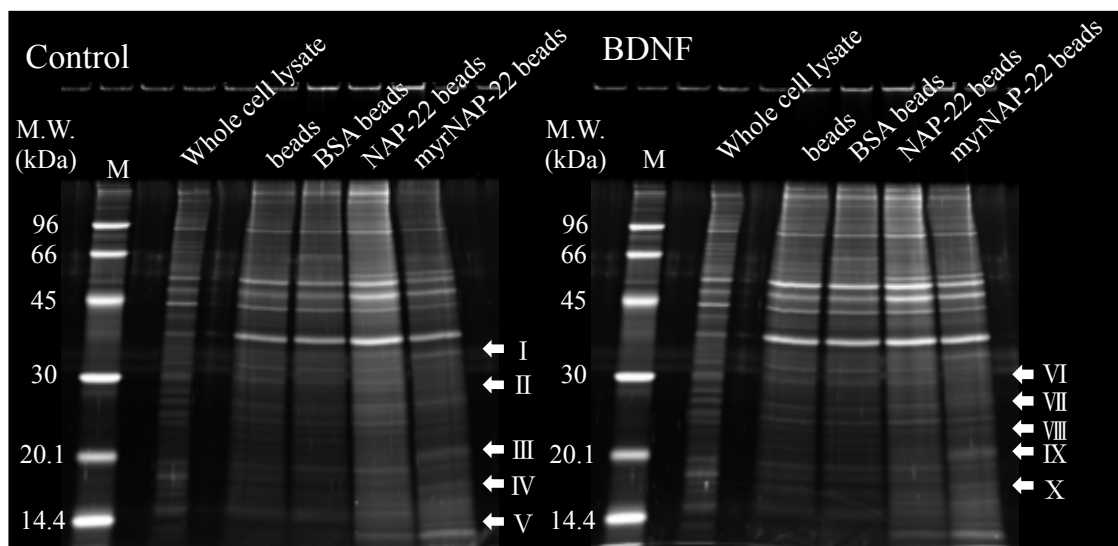


図 3-3 NAP-22 固相化ビーズと神経分化後の P19C6 細胞のライセートの共沈結果  
 右: 未刺激細胞のライセートとの共沈結果。左: BDNF 刺激後の細胞のライセートとの共沈結果。右からマーカー、whole cell lysate (1)、ビーズとの共沈 (2)、BSA 固相化ビーズとの共沈 (2), NAP-22 固相化ビーズとの共沈 (3), myrNAP-22 固相化ビーズとの共沈 (4)を泳動した。切り出したバンドは I ~ X で示した。

表 1 未刺激細胞のライセートと NAP-22 固相化ビーズの共沈で得られたタンパク質の同定結果 表中の項目は左から切り出したバンドの番号 (band)、NCBI Accession (Accession)、タンパク質名 (Description)、同定したペプチドが全長タンパク質に対して占める割合 (Coverage)、想定される分子量 (MW)、同定における信頼度 (Score Mascot)、同定に使用したペプチド数 (Unique peptide)を示した。表 1 と表 2 で差のあったタンパク質を赤文字で示した。

Control NAP-22 coupled beads						
band	Accession	Description	Coverage	MW [kDa]	Score Mascot	Unique peptide
I	P68254	14-3-3 protein theta	21.2	27.8	133.8	3
	P67778	Prohibitin	11.8	29.8	127.0	3
	Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1	19.9	27.0	123.8	4
	P68510	14-3-3 protein eta	13.8	28.2	97.6	3
	P61982	14-3-3 protein gamma	8.9	28.3	97.3	1
	P47757	F-actin-capping protein subunit beta	8.7	31.3	83.6	2
	P48962	ADP/ATP translocase 1	20.1	32.9	83.4	3
	P10126	Elongation factor 1-alpha 1	4.8	50.1	73.2	2
	P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9.3	35.8	66.6	2
	P51881	ADP/ATP translocase 2	17.1	32.9	65.3	2
	Q8VB70	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	4.3	31.4	63.7	1
	Q9CXW3	Calcyclin-binding protein	14.0	26.5	51.7	2
	O89079	Coatmer subunit epsilon	3.9	34.5	49.6	1
	Q8BV13	COP9 signalosome complex subunit 7b	4.9	29.7	41.5	1
	P60710	Actin, cytoplasmic 1	2.7	41.7	40.2	1
	P62918	60S ribosomal protein L8	4.3	28.0	38.4	1
	Q8BFY6	Peflin	4.7	29.2	36.5	1
	Q9Z2U1	Proteasome subunit alpha type-5	4.1	26.4	35.3	1
	Q8R010	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	5.3	35.4	32.4	1
	Q99LD8	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	8.1	29.6	31.3	3
	Q99PM9	Uridine-cytidine kinase 2	4.6	29.4	30.3	1
P70122	Ribosome maturation protein SBDS	3.2	28.8	30.3	1	
II	Q80UW8	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	11.0	24.6	55.8	2
III	Q8BG95	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	2.9	109.0	138.6	2
	P84084	ADP-ribosylation factor 5	10.6	20.5	58.9	2
	P60764	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	5.2	21.4	55.7	1
	Q9JIQ3	Diablo homolog, mitochondrial	4.2	26.8	44.8	1
	Q9D0P8	Intraflagellar transport protein 27 homolog	8.6	20.8	43.4	1
IV	P61089	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	13.8	17.1	64.0	1
	Q9D7P6	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial	4.2	18.1	44.3	2
	P62830	60S ribosomal protein L23	25.7	14.9	41.9	3
	P62900	60S ribosomal protein L31	7.2	14.5	36.6	1
V	Q78XF5	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	8.1	16.8	61.5	1
	Q9D358	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	7.6	18.2	50.4	1
	P10639	Thioredoxin	21.0	11.7	49.2	2
	Q9CZX8	40S ribosomal protein S19	6.9	16.1	43.4	1
	Q9CQR4	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	7.1	15.2	43.3	1
	Q9CPX7	28S ribosomal protein S16, mitochondrial	5.9	15.2	36.1	1
	P62838	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	4.8	16.7	34.8	1
	Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	3.5	22.1	32.0	1

表 2 未刺激細胞のライセートと myrNAP-22 固相化ビーズの共沈で得られたタンパク質の同定結果

表 1 と表 2 で差のあったタンパク質を赤文字で示した。

Control		myrNAP-22 coupled beads					
band	Accession	Description	Coverage	MW [kDa]	Score Mascot	Unique peptide	
I	Q9CYG7	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	9.1	34.3	102.8	2	
	P48036	Annexin A5	9.7	35.7	84.6	1	
	Q7TQI3	Ubiquitin thioesterase OTUB1	17.0	31.3	79.0	4	
	P61982	14-3-3 protein gamma	5.7	28.3	71.3	1	
	Q3THS6	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	3.8	43.7	66.4	1	
	P07356	Annexin A2	2.9	38.7	63.3	1	
	Q9CY64	Biliverdin reductase A	6.8	33.5	61.4	3	
	O88809	Neuronal migration protein doublecortin	9.8	40.6	56.2	3	
	Q8BHZ0	Protein FAM49A	10.8	37.3	54.0	2	
	P97429	Annexin A4	3.4	35.9	51.1	1	
	P67778	Prohibitin	7.7	29.8	50.7	2	
	P60710	Actin, cytoplasmic 1	2.7	41.7	50.7	1	
	Q9JKX6	ADP-sugar pyrophosphatase	6.0	24.0	50.1	1	
	P53810	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	4.8	31.9	47.5	1	
	Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	3.4	32.3	47.5	1	
	P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	6.6	36.5	45.4	1	
	Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1	5.0	27.0	45.1	2	
	Q9CS42	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	2.2	34.8	42.9	1	
	Q9WV55	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	4.8	27.8	40.7	1	
	P17918	Proliferating cell nuclear antigen	10.7	28.8	40.0	2	
	P97351	40S ribosomal protein S3a	3.4	29.9	39.8	1	
	O35593	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	4.2	34.6	38.2	1	
	O88844	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	2.7	46.6	38.1	1	
	Q9R0P3	S-formylglutathione hydrolase	3.5	31.3	37.8	1	
	Q9QYB1	Chloride intracellular channel protein 4	6.3	28.7	36.5	1	
	Q08093	Calponin-2	8.2	33.1	36.0	2	
	P10126	Elongation factor 1-alpha 1	2.4	50.1	34.9	1	
	Q9ES74	Serine/threonine-protein kinase Nek7	6.0	34.5	33.9	1	
	Q64467	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	3.2	47.6	31.8	1	
	Q8VBT0	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	4.3	31.4	30.7	1	
	II	P61087	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	5.0	22.4	52.5	1
		P57722	Poly(rC)-binding protein 3	5.1	39.3	50.6	2
		Q9WTL7	Acyl-protein thioesterase 2	3.5	24.8	33.6	1
III	Q8BG95	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	1.1	109.0	55.1	1	
IV	P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	10.5	35.8	90.5	3	
	P61089	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	13.8	17.1	85.2	1	
	P61327	Protein mago nashi homolog	7.5	17.2	70.5	1	
	P61079	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	16.3	16.7	61.0	3	
	P60867	40S ribosomal protein S20	12.6	13.4	60.2	2	
	Q9D1R9	60S ribosomal protein L34	12.8	13.3	57.9	2	
	Q9D7P6	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial	4.2	18.1	34.7	1	
	P62830	60S ribosomal protein L23	7.1	14.9	31.3	1	
V	Q9D358	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	15.8	18.2	112.2	3	
	P62264	40S ribosomal protein S14	31.8	16.3	108.8	5	
	P10639	Thioredoxin	22.9	11.7	60.0	2	
	Q78XF5	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC	8.1	16.8	54.2	1	
	Q9CRC0	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	8.1	17.8	44.2	1	
	P52483	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E3	3.9	22.9	39.5	1	
	P62838	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	12.2	16.7	36.6	2	
	P83870	PHD finger-like domain-containing protein 5A	13.6	12.4	35.2	2	
	P12815	Programmed cell death protein 6	4.7	21.9	30.1	1	

表 3 BDNF 刺激した細胞のライセートと NAP-22 固相化ビーズの共沈で得られたタンパク質の同定結果

表 3 と表 4 で差のあったタンパク質を赤文字で示した。

BDNF		NAP-22 coupled beads						
band	Accession	Description	Coverage	MW [kDa]	Score Mascot	Unique peptide		
VI	Q8R2U4	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1	17.9	25.4	61.9	3		
	P68254	14-3-3 protein theta	9.0	27.8	60.2	1		
	Q9CQ60	6-phosphogluconolactonase	23.0	27.2	54.7	5		
	P53026	60S ribosomal protein L10a	13.4	24.9	53.4	3		
	P63073	Eukaryotic translation initiation factor 4E	6.5	25.0	51.6	1		
	P35980	60S ribosomal protein L18	18.6	21.6	51.4	3		
	Q6ZWN5	40S ribosomal protein S9	8.8	22.6	42.9	2		
	Q9ROP9	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	3.6	24.8	36.6	1		
	Q9CPR4	60S ribosomal protein L17	13.0	21.4	35.3	2		
	Q9CQF3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	4.0	26.2	33.3	1		
	Q8BGZ2	Protein FAM168A	4.1	26.2	30.1	1		
	VII	Q504M8	Ras-related protein Rab-26	4.2	28.6	56.1	1	
		P62911	60S ribosomal protein L32	7.4	15.9	37.4	1	
IX	P61205	ADP-ribosylation factor 3	49.2	20.6	246.7	3		
	P61750	ADP-ribosylation factor 4	42.8	20.4	199.0	2		
	E9Q557	Desmoplakin	2.0	332.7	114.9	6		
	O70493	Sorting nexin-12	18.2	19.1	112.6	2		
	O70492	Sorting nexin-3	14.2	18.7	90.7	2		
	P18760	Cofilin-1	37.3	18.5	87.1	4		
	P63325	40S ribosomal protein S10	13.9	18.9	85.3	2		
	Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	13.8	14.2	81.7	2		
	P61924	Coatamer subunit zeta-1	16.9	20.2	79.2	2		
	P62331	ADP-ribosylation factor 6	15.4	20.1	72.7	2		
	P14131	40S ribosomal protein S16	22.6	16.4	72.7	3		
	P68037	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	21.4	17.9	49.6	2		
	P61967	AP-1 complex subunit sigma-1A	10.1	18.7	46.1	1		
	Q9D187	Mitotic spindle-associated MMXD complex subunit MIP18	12.9	17.7	44.2	1		
	P62830	60S ribosomal protein L23	5.7	14.9	41.1	1		
	Q61171	Peroxiredoxin-2	5.6	21.8	39.5	1		
	Q99L45	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	3.0	38.1	39.5	1		
	P62245	40S ribosomal protein S15a	13.8	14.8	37.8	2		
	O55013	Trafficking protein particle complex subunit 3	11.7	20.3	35.9	2		
	P63242	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	4.5	16.8	33.7	1		
	Q9R1Q7	Proteolipid protein 2	9.9	16.6	33.6	1		
	P59999	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	6.5	19.7	33.1	1		
	Q02257	Junction plakoglobin	1.2	81.7	32.6	1		
Q7T5F1	Desmoglein-1-beta	1.5	114.4	27.9	1			
X	Q9DCG9	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein	10.4	14.1	48.7	1		
	P22935	Cellular retinoic acid-binding protein 2	5.1	15.7	41.8	1		
	Q9JME7	Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein	9.4	16.0	39.3	1		
	Q8K273	Membrane magnesium transporter 1	4.6	14.7	30.6	1		

表 4 BDNF 刺激した細胞のライセートと myrNAP-22 固相化ビーズの共沈で得られたタンパク質の同定結果

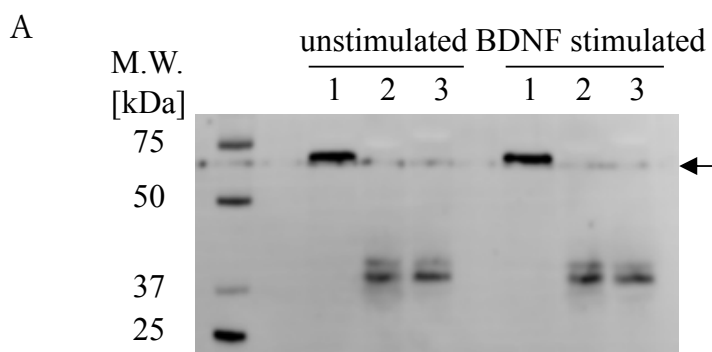
表 3 と表 4 で差のあったタンパク質を赤文字で示した。

band	Accession	Description	Coverage	MW [kDa]	Score Mascot	Unique peptide	
VI	P19253	60S ribosomal protein L13a	16.7	23.4	84.1	3	
	P35980	60S ribosomal protein L18	6.9	21.6	67.7	1	
	O55022	Membrane-associated progesterone receptor component 1	7.2	21.7	66.0	1	
	Q9WTP7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	6.6	25.4	58.9	1	
	Q9CQE8	RNA transcription, translation and transport factor protein	6.6	28.1	55.4	1	
	O35969	Guanidinoacetate N-methyltransferase	5.9	26.3	55.2	1	
	P63073	Eukaryotic translation initiation factor 4E	6.5	25.0	52.5	1	
	P53026	60S ribosomal protein L10a	6.0	24.9	48.5	1	
	Q9CPR4	60S ribosomal protein L17	13.0	21.4	48.0	2	
	P14148	60S ribosomal protein L7	4.1	31.4	44.9	1	
	Q80U09	Membrane-associated progesterone receptor component 2	18.0	23.3	42.9	2	
	Q9CQF3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	4.0	26.2	40.6	1	
	Q8R2U4	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1	6.7	25.4	39.2	1	
	P62259	14-3-3 protein epsilon	3.1	29.2	37.9	1	
	Q9D0B6	Protein PBDC1	13.1	22.2	31.2	2	
	VII	P35980	60S ribosomal protein L18	20.2	21.6	134.7	3
		Q8BP67	60S ribosomal protein L24	13.4	17.8	97.0	2
		Q61171	Peroxisome oxidin-2	18.7	21.8	75.4	3
P36536		GTP-binding protein SAR1a	5.6	22.4	56.8	1	
P97461		40S ribosomal protein S5	4.4	22.9	54.7	1	
Q504M8		Ras-related protein Rab-26	4.2	28.6	33.3	1	
VIII	P14115	60S ribosomal protein L27a	7.4	16.6	67.3	1	
	G3X9C2	F-box only protein 50	4.5	30.4	57.2	1	
	P17932	Putative 60S ribosomal protein L32	5.2	16.0	42.9	1	
	Q9D1N9	39S ribosomal protein L21, mitochondrial	4.3	23.4	41.1	1	
	P63001	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	4.2	21.4	40.9	1	
	Q9D1R9	60S ribosomal protein L34	6.0	13.3	35.6	1	
IX	P68037	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	24.0	17.9	87.7	2	
	P61205	ADP-ribosylation factor 3	11.6	20.6	73.2	1	
	P62331	ADP-ribosylation factor 6	12.0	20.1	49.7	2	
	O70492	Sorting nexin-3	8.6	18.7	42.8	2	
	P15532	Nucleoside diphosphate kinase A	7.9	17.2	42.8	1	
	Q9CYL5	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	8.4	17.1	41.9	1	
	P61750	ADP-ribosylation factor 4	10.0	20.4	39.1	1	
	P18760	Cofilin-1	6.6	18.5	38.8	1	
	P62830	60S ribosomal protein L23	20.0	14.9	33.0	2	
	P63242	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	7.8	16.8	31.1	1	
X	Q9CQS8	Protein transport protein Sec61 subunit beta	10.4	10.0	39.2	1	
	Q78T54	Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein Vma21	11.9	11.4	38.4	1	
	Q9ERR7	Selenoprotein F	5.6	17.8	32.9	1	

### 3-2-4. eIF4E と NAP-22 の相互作用の検証

今回、eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) (表 3 VI、表 4 VI)、eIF5 (表 3 IX、表 4 IX)、eIF2 $\beta$  (表 3 VIII) が BDNF 刺激後に同定された。BDNF 刺激によって TrkB シグナルの下流に位置する mTOR 依存的に eIF4E と eIF4E-binding protein の結合が解離される。このような BDNF 刺激によって惹起されるタンパク質合成は主に樹状突起でタンパク質合成が開始され、細胞骨格に関わるタンパク質、Ca<sup>2+</sup>依存的なリン酸化酵素、シナプス可塑性に関わるタンパク質が合成される (Gray, Steitz, Moore, Jiang, & Schuman, 2002; Jain & Bhalla, 2009; Leal et al., 2014; T. Suzuki et al., 2011)。このような神経突起における局所的タンパク質合成に NAP-22 が関与している可能性があることが示唆された。

BDNF-TrkB シグナリングの下流に位置する eIF4E と NAP-22 が相互作用をす  
ると考え、共免疫沈降法によって直接的な相互作用を検証したが、共免疫沈降に  
よる直接的な相互作用は確認できなかった (図 3-4 A)。また、免疫染色によって  
その局在を観察した。その結果、未刺激の細胞に比べ、BDNF 刺激後の細胞では、  
顕著な共局在が認められた (図 3-4 B)。しかし、免疫沈降では検出出来なかつた  
ので、直接の相互作用ではなくて、何らかの分子を介した間接的な相互作用、あ  
るいは、他の分子も加わった複合体形成時にのみ相互作用を生じる可能性が示  
唆された。



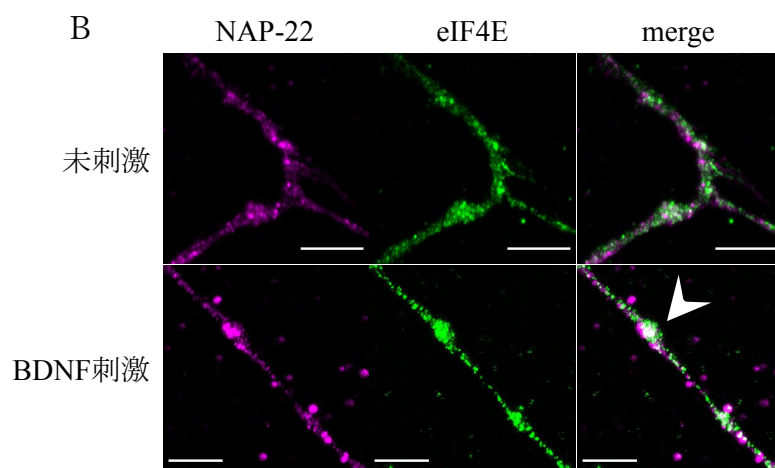


図 3-4 抗 eIF4E 抗体を用いた免疫沈降法と免疫染色による NAP-22 との相互作用の検証

A: BDNF 刺激前後における抗 eIF4E 抗体を用いた免疫沈降の結果。抗 NAP-22 抗体によって NAP-22 を検出した。レーンは左から 5% Input (1), Normal Mouse IgG で免疫沈降した沈降物 (2), 抗 eIF4E 抗体で免疫沈降した沈降物 (3)。矢印は NAP-22 のバンドの位置を示す。B: BDNF 刺激前後における免疫蛍光染色で得られた蛍光像。未刺激の神経分化後の P19 細胞 (上段)、BDNF 刺激後の神経分化後の P19 細胞 (下段)。右から NAP-22 (マゼンタ)、eIF4E (緑)、merge を示した。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  を示す。矢印は NAP-22 と eIF4E の共局在を示す。

### 3-3. 考察

BDNF 刺激によって NAP-22 は DRM への局在が増加することがわかった。NAP-22 は BDNF 刺激によって脂質ラフトへの局在が増加すると考えられる。さらに、共沈実験では NAP-22 と myrNAP-22 で相互作用したタンパク質が異なった。本実験結果で同定された相互作用因子の差はミリストイル基が修飾されていることによる脂質やタンパク質との直接の相互作用の違いであると考えられる。

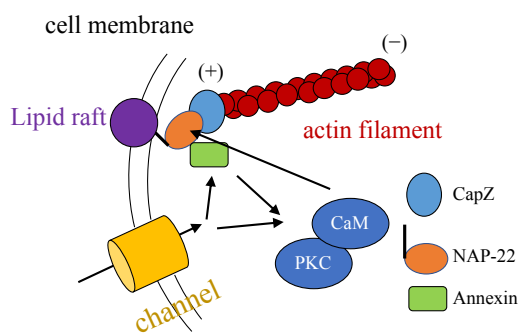
また、これまで報告されている結果から、NAP-22 は細胞骨格に関わることが示唆されていた。本研究では刺激前の細胞でこれまでに同定されている F-actin-capping protein subunit beta (CapZ) (表 1 I) や、actin 以外に actin filament と相互作用する Elongation factor 1-alpha 1 (表 1 I、表 2 I) (Thornton, Anand, Purcell, & Lee, 2003) や ADP-ribosylation factor (Arf) と相互作用することで actin cytoskeleton の制御因子として機能する Coatamer subunit epsilon (表 1 I) (Peterson & Stamnes, 2013)、神経特異的に微小管の形成に関わる Neuronal migration protein doublecortin (表 2 I) (Dehmelt & Halpain, 2004)、F-actin との結合や Tau タンパク質の軸索への局在に関わる Annexin A2 (表 2 I) (Gauthier-Kemper et al., 2018; Gerke & Moss, 2002) が NAP-22 と相互作用する因子として新たに示唆された。その他にも  $Ca^{2+}$  依存的に機能するタンパク質である Calcylin-binding protein (表 1 I) (Kilanczyk, Filipek, & Hetman, 2015)、Peflin (表 1 I) (Kitaura, Matsumoto, Satoh, Hitomi, & Maki, 2001)、Annexin A4 (表 2 I) (Gerke & Moss, 2002) が NAP-22 と相互作用することが示唆された。

Peflin (表 1 I) に関しては、その相互作用因子である Programed death protein 6 (表 2 V) も同定されており、Peflin-Programed death protein 6 複合体 (Hashemi, Bahari, & Markowski,

2018) に NAP-22 が結合している可能性がある。しかし、NAP-22 がその複合体とどのような機能を果たすかは明らかにならなかった。

以下に、同定結果から想定される NAP-22 の細胞内機能の仮説を 3 つ論じる。  
仮説 1. 細胞骨格の細胞膜への係留に関わる機能

脂質ラフトへ細胞骨格を形成する actin filament がどのように会合しているか



は明らかになっていない。NAP-22 は N 末端で細胞膜の脂質と会合し、C 末端で他のタンパク質と相互作用していると想定し、CapZ、Annexin との相互作用による脂質ラフトを介した細胞骨格制御メカニズムを考察した (図 3-5)。CapZ は actin filament のプラス端に結合することで actin filament の重合を促進し、伸長・分解を抑制する。NAP-22 と CapZ が actin 存在下で相互作用していても、actin の重合は促進されない (Odagaki et al., 2009)。さらに Annexin は  $Ca^{2+}$  依存的に PKC を制御する (Gerke & Moss, 2002)。以上の報告から、 $Ca^{2+}$  依存的な PKC の制御因子である Annexin A4 と myrNAP-22 の相互作用による脂質ラフトへの会合制御、NAP-22 と CapZ の相互作用による細胞骨格の細胞膜、特に脂質ラフトへの係留が考えられる。

仮説 2. チャンネルを形成するタンパク質との相互作用による細胞内小器官の輸送

Chloride intracellular channel protein 4 (CLIC4) (表 2 I) が同定されており、CLIC4 は Dynamin I と直接的に相互作用し、actin、tubulin と間接的に相互作用する (Singh, Cousin, & Ashley, 2007; Suginta, Karoulias, Aitken, & Ashley, 2001)。CLIC4-Dynamin I -NAP-22 の複合体形成や CLIC4-NAP-22-actin(-cofilin)、CLIC4-NAP-22-tubulin のような複合体形成をすることで軸索や神経突起におけるミトコンドリアの輸送に関わる可能性がある。

仮説 3. 小胞体への局在

細胞内小胞輸送の方向性が決まった小胞に局在することである。特にゴルジ体の小胞出芽に関わる ADP-ribosylation factor (Arf) (表 3 VII、表 4 IX) (Souza-schorey &

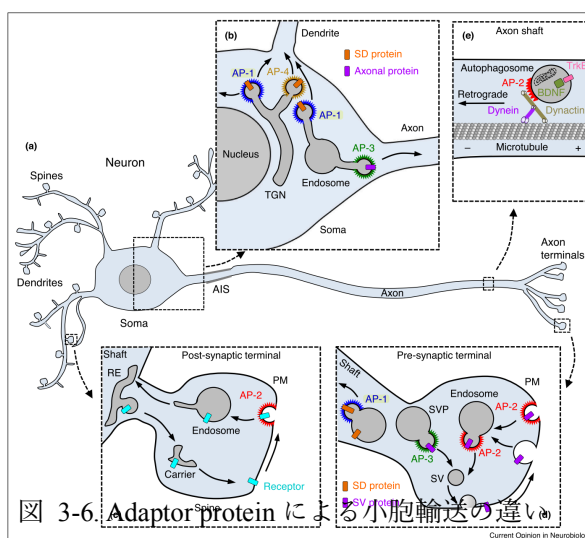


図 3-6. Adaptor protein による小胞輸送の違い (b)

C. Guardia et al. *Current opinion in neurobiology* 51, 103-110 (2018)

Chavrier, 2006)、プレシナプスから細胞体へ、細胞体から神経突起へと輸送される小胞に局在する AP-1 (表 3 IX) (図 3-6) や、小胞体とゴルジ体間を輸送する小胞のマーカである COP II の GTPase として働く SAR1 (表 4 VII) (Sato & Nakano, 2007) が同定されている。これらの同定結果に含まれるタンパク質は、それぞれの小胞に形成場所、輸送先が特定されていることが報告されており、NAP-22 がその小胞に局在している可能性がある。さらに、PS, PI のような酸性脂質

と NAP-22 が強く相互作用を示すことから、輸送先が限定されている小胞に結合することで、BDNF 刺激によって NAP-22 が神経突起の先端に輸送されている (図 3-1 D) 可能性が考えられる。

#### 仮説 4. 細胞骨格の編成に関わる

BDNF 刺激によって NAP-22 がアクチンの再構成に関わる因子であると考えた。これは先述した CapZ との相互作用とは異なり、actin の安定化ではなく、actin を分化して新たな actin を作り直す cofilin (表 3 VIII, 4 IX) (Spence & Soderling, 2015) との相互作用により関わりとされる (図 4-3)。さらに、本研究で同定された Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) (表 4 VIII) は NAP-22 との共局在が観察されている (Kumanogoh, Miyata, Sokawa, & Maekawa, 2001)。これらの知見から、BDNF 刺激によって、NAP-22 と Rac1 の複合体が脂質ラフトに形成され、Cofilin との相互作用をすることで、actin の再構成をしていると考えた (図 3-7)。

#### 仮説 5. 局所タンパク質合成に関わる

BDNF によって誘導される局所的なタンパク質合成、もしくは、タンパク質合成の活性化に NAP-22 が関わりとされた。BDNF 刺激後の細胞において eIF タンパク質群、eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) (表 3 VI, 表 4 VI)、eIF5 (表 3 VIII, 表 4 IX), eIF2 $\beta$  (表 3 VIII) や Cleavage and polyadenylation specificity factor protein (CPSF) (表 3 VI, 4 VI)、RNA transcription, translation and transport factor protein (表 4 VI) が同定された。実際に BDNF 刺激によってタンパク質合成が活性化される。これらの同定結果は mRNA の 3'末端のポリアダニル化、mRNA の輸送、翻訳に関わるタンパク質であり、eIF 複合体形成をした際に NAP-22 が含まれている可能性を考えた (図 3-7)。しかし、本論文中で検証した eIF4E との直接的な相互作用が確認できなかったことから、NAP-22 は翻訳開始複合体形成に関わる、もしくは脂質などの他のファクターが起因となる複合体相互作用であることが考えられる。

本研究では NAP-22 がどのような機能を発揮しているかは明らかではなく、現段階ではタンパク質複合体を安定させる糊のような機能であることが想定される。今後の研究において、リコンビナントタンパク質を用いて検証による NAP-22 との複合体形成、相互作用の検証や、転写翻訳に関わる GTPase との関連性を追求していくことによって本論文で明かすことができなかった NAP-22 の機能を明らかにできる可能性がある。

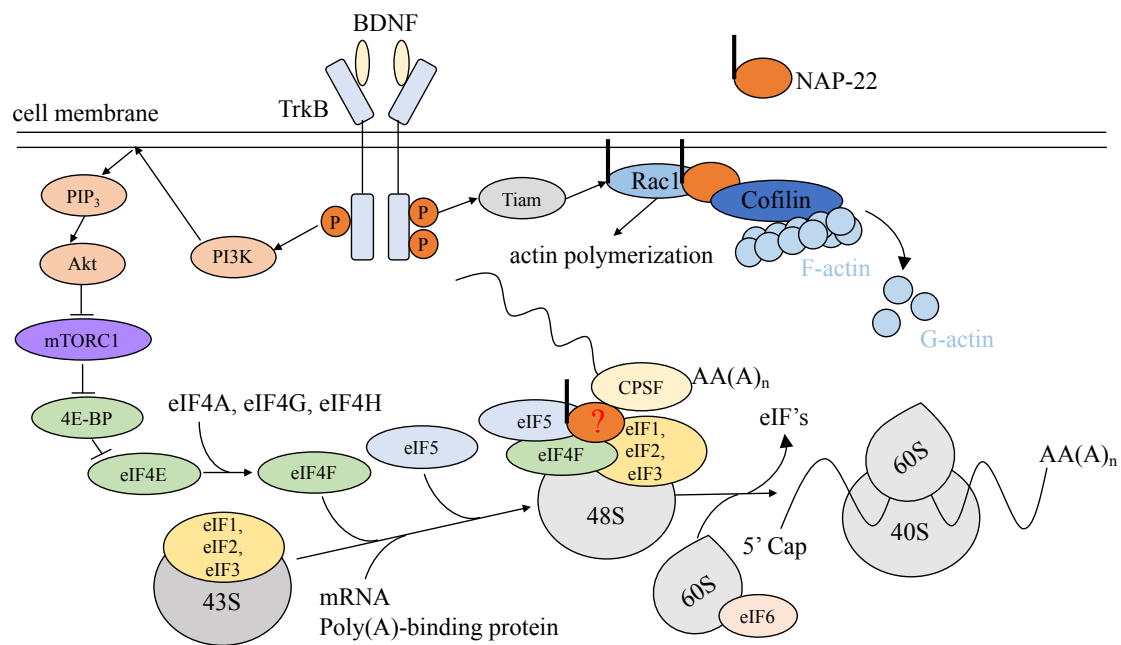


図 3-7. BDNF-TrkB シグナリングに関わる NAP-22 の生理機能に関する仮説

## 第4章

### 総括と今後の展望

本学位論文では、神経分化前後における脂質ラフトの解析、BDNF 刺激下における NAP-22 の機能解明の 2 つの研究によって、脂質ラフト構成タンパク質を解析することで脂質ラフトの機能構造に関する研究を行なった。

第 2 章では、神経分化に伴って生じる自己分泌物質を受容した刺激による脂質ラフトの形成、ならびにそれによる神経細胞特異的な機能発現が存在することを想定し、研究をおこなった。着目したラフトマーカータンパク質である Flot2 は神経分化に従って発現量が増加し、特に GM1 の脂質ラフトへの局在も増加した (図 2-1, 2-2, 2-3)。神経分化後に脂質ラフトマーカーである Fyn、リン酸化体 Fyn または c-Src、ノンラフトマーカーである NKA の発現量または存在量が増加したが、c-Src は発現量に変化が見られなかった (図 2-1)。しかし、c-Src とリン酸化体 Fyn もしくは c-Src の DRM への局在はショ糖密度勾配遠心法による分画では減少した (図 2-2)。さらに、Fyn は GM1 との共局在率が増加し、Flot2 との共局在率には差が見られなかった (図 2-3)。この結果から、Flot2, Fyn, c-Src は未分化細胞と比べ、神経分化後の細胞において平均的に見た場合に脂質ラフトへの局在が減少しているが、神経突起に着目した場合は増加している部分もあることが考えられる。

P19C6 細胞は他の神経モデル細胞に比べ、化学物質への応答に感受性が高いことが報告されている。P19C6 細胞の刺激への感受性の高さは脂質ラフトの効率的な刺激応答を研究するためには適している可能性がある。PC12 細胞などの神経様細胞では神経分化による Flot2 の発現量には変化がないとされており、ヒト由来多能性間質細胞ではその発現量が増加していることが報告されている。今回の結果から、P19C6 細胞のような神経細胞に分化する細胞では、分化に伴い Flot2 は発現量が増加すると考えられた。また、分化する神経系の違いによって脂質ラフトを構成する因子が異なると捉えた場合、末梢神経系に分化する PC12 細胞、中枢神経系に分化する P19 細胞の違いであると考えられることもできる。

今後の展望として、細胞種の違いに着目した本実験系のような解析、さらに細胞膜を構成する脂質の解析を行うことで、脂質ラフトの機能構造を追求できる可能性がある。特に脂質ラフトによる情報伝達の効率化が細胞種によって異なることは十分考えられるため、脂質ラフトを構成する脂質の種類とその領域に会合するタンパク質のプロファイリングをしていくことで、生理現象や疾患の明らかになっていないメカニズムの基盤となる分子メカニズムが示せる可能性がある。

第3章では、外部刺激に対する脂質ラフトの形成による NAP-22 の機能を解明することを目的として研究を行なった。使用した BDNF による刺激は医学分野でも注目されており、精神疾患に関連した結果が得られた場合には、それが治療や創薬のターゲットとして研究の着眼点となる可能性があると考えた。着目した NAP-22 は相互作用因子が多数同定されているにも関わらず、その機能が明らかではないため、BDNF 刺激前後で NAP-22 の相互作用因子を同定した。

NAP-22 の BDNF 刺激による動きを観察したところ、DRM への局在や神経突起先端への局在が示唆された (図 3-1)。しかし、その分子メカニズムや意義は本研究結果では明らかにできなかった。

NAP-22 をコートしたビーズで行なった共沈実験では、同定結果から、BDNF によって NAP-22 の相互作用因子が大きく変化したことが明らかになった (表 1, 2, 3, 4)。同定結果を組み合わせることで、NAP-22 が刺激前後でどのような機能を果たしているか、仮説を考えた。刺激を与えていない状態では、細胞骨格の細胞膜への係留、機能チャネルを形成するタンパク質との相互作用による細胞内小器官の輸送に関わると考え、BDNF 刺激後では、小胞体への局在、細胞骨格の編成、局所タンパク質合成に関わると考えた。これらの仮説は同定されたタンパク質に関する報告を元に考察したものであり、本研究では BDNF 刺激後に局所タンパク質合成に関わる仮説を NAP-22 と eIF4E との直接的な相互作用と免疫染色によって検証した。しかし、NAP-22 と eIF4E の直接的な相互作用は確認できず、免疫染色による共局在のみ観察できた (図 3-4)。脂質ラフトに局在するタンパク質は脂質分子との相互作用が他のタンパク質との相互作用に影響することがあり (Toska et al., 2012)、本研究において、その影響を考慮しない検証実験を行なった。そのため、NAP-22 と eIF4E が相互作用を示さないことは断定できない。さらに、直接的ではなく、複合体形成時に関わることも可能性として挙げられる。

他の相互作用因子には、ユビキチン化に関わるタンパク質や sorting nexin のような、細胞膜に局在するタンパク質を制御する因子が含まれていた。この結果からだけでは、そういった相互作用により NAP-22 自身が脂質ラフトへ局在することに意味があるのか、あるいは、NAP-22 が他のタンパク質をリクルートすることに意味があるのかは解らなかった。また、多くのミトコンドリア内に含まれるタンパク質が同定されたが、NAP-22 が関わる詳細な分子メカニズムはわからなかった。

今後の展望として、本研究で考察した仮説に関してはリコンビナントタンパク質を用いた検証が必要であり、第2章、第3章の結果を詳細に解析するためには、脂質とタンパク質の相互作用、また、超解像顕微鏡を用いた観察、もしくは電子顕微鏡を用いた観察が必要である。また、actinの再構成に関しては、リコンビナントタンパク質を複数用いた *in vitro* での解析が必要であり、小胞体への局在に関しては、小胞体を分画法によって取得し、その小胞体に含まれるタンパク質を解析することで、なぜ、NAP-22が小胞体に局在するかが明らかになると考えられる。

## 第 5 章

### 材料と方法

## 5 章 材料と方法

### 5-1. 材料

P19C6 細胞は RIKEN Bioresource Center Cell Bank (茨城、日本)から入手した。Goat polyclonal anti-Mouse IgG antibody Alexa405 conjugated (ab175660 は Abcam (Cambridge, UK)から購入した。Mouse monoclonal anti-Flotillin-2 antibody (60383)、Mouse monoclonal anti-Fyn (pY528) /c-Src (pY530) antibody (612668) は BD Biosciences (Richmond, CA, USA)から購入した。Goat polyclonal anti-mouse IgG antibody HRP conjugated (No.330)、Goat polyclonal anti-Rabbit IgG antibody HRP conjugated (No.458), Mouse IgG2a antibody (M076-3), Mouse Monoclonal anti-eIF4E antibody (RN006M)は MBL (名古屋、日本)から購入した。Chemiluminescent HRP Substrate (P36599)は Millipore (Billerica, MA, USA)から購入した。2-D Quant kit は GE Healthcare (Little Chalfont, UK)から購入した。Mouse monoclonal anti-MAP2 Clone HM-2 (M9942)、Sheep polyclonal anti-Rabbit IgG Cy3 conjugated (C2306)、Mammalian Cell Lysis Kit (MCL1)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入した。Rabbit polyclonal anti-serum  $\alpha$ -Tubulin (NH<sub>2</sub>-QPDGQMPSDKTIGGC-COOH immunized)、Rabbit polyclonal anti-serum Na/K ATPase  $\alpha$  1 subunit (NH<sub>2</sub>-CRRPGGWVEKETYY-COOH immunized)は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)で作製したまた、Rabbit polyclonal anti-serum Na/K ATPase  $\alpha$  1 subunit は Protein G Sepharose 4 Fast Flow (17061801, GE Healthcare)を用いて精製を行なった後に使用した。

### 5-2. 方法

#### 細胞培養、神経分化、タンパク質抽出

P19C6 mouse embryonal carcinoma cells は High glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)に 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone)と 1% penicillin-streptomycin (P/S, Gibco)を添加して 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。1.8×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度で播種し、2 日おきに継代を行なった。

P19C6 細胞の神経分化誘導は Macpherson らの手法を改変して行なった (MacPherson, 1995)。培養した P19C6 細胞を phosphate buffered saline (PBS)で 3 回洗い、0.25% Trypsin-1 mM EDTA を用いて剥離し、セルカウントを行なった。5% FBS、1% P/S、1  $\mu$ M RA (Sigma)を添加した DMEM/F12 (3:1)に 1.0×10<sup>5</sup> cells/mL

で懸濁し、50 mL コニカルチューブに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で浮遊培養を行い、胚様体を形成した。4 日後に培地上清を除き、0.25% Trypsin-1 mM EDTA を用いて細胞塊を乖離させた。100 μm nylon mesh に細胞懸濁液を通した後にセルカウントを行い、DMEM(10% FBS, 1% P/S)に懸濁した後に 2.0 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度で Poly-D-Lysin をコートしたディッシュに播種した。翌日に 1% P/S と 1% N2 supplement (Gibco または富士フィルム純薬工業)を添加した DMEM/F12 (1:1)に培地を交換した。神経分化誘導後の培養は 2 日おきに培地を交換した。

培養した P19C6 細胞を PBS で 3 回洗った後に、MCL buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholic acid, sodium salt, 1% Igepal CA-630, 1.0 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% protease inhibitor cocktail) を添加し、30 分間氷上で静置した。細胞破碎液を 1.5 mL エッペンドルフチューブに回収し、12,000 rpm, 15 分, 4°C の条件で遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は 2D-Quant kit を用いてタンパク質量を定量した。

#### シヨ糖密度勾配遠心法による分画

P19C6 細胞を培養した後に、培地上清を除き PBS で 2 回洗った。その後、Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM EGTA, 1% (w/v) Triton X-100, 1.0 mM Sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 1% protease inhibitor cocktail)を加え、ピペッティングによって細胞をディッシュから乖離させた。この細胞懸濁液はダウンズホモジナイザーを用いて氷上で 10 回のストロークを行い、細胞を破碎した。破碎液の溶液量を Lysis buffer で 2.0 mL に調整し、遠心管に移した。この後の操作は 4°C 室内で行った。2.0 mL 80% Sucrose 溶液 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM EGTA, 80% (w/v) Sucrose)を加えよく懸濁した。その懸濁液の上に 4.0 mL 30% Sucrose 溶液、4.0 mL 5% Sucrose 溶液を重層した。重層後、SW41Ti ローター (Beckman)を用いて 37,697 × g, 16 時間, 4°C の条件下で遠心操作を行い、分画した。分画後の溶液は遠心管内の上層から 1.0 mL ずつ回収し、12 フラクションを得た。

#### ウエスタンブロットティング

サンプルと Precision Plus protein WesternC standards を SDS-PAGE で展開後に ImmobilonP-PVDF 膜に 2 mA/cm<sup>2</sup>, 60 分の定電流条件で転写した。転写後の PVDF

膜は 5% スキムミルク/TBS-T (0.1% Tween 20) または 3% BSA/TBS-T でブロッキング後に一次抗体を加えた 5% スキムミルク/TBS-T または 3% BSA/TBS-T、Can Get Signal solution 1 のいずれかを用いて一晩、4°C の条件で静置し、抗原抗体反応を行った。一次抗体反応を終えた PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗い、HRP が結合した二次抗体を加えた 5% スキムミルク/TBS-T または 3% BSA/TBS-T、Can Get Signal solution 2 のいずれかを用いて 1 時間、室温の条件で二次抗体反応を行った。その後、TBS-T で 3 回洗い、Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate を添加し、LuminoShot 400Jr (TAKARA TOMY) で検出した。得られたデータは ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012) を用いて解析した。

### 免疫染色

ガラスボトムディッシュ (MatTek) に培養した P19C6 細胞を PBS で洗った後に、Cholera toxin B subunit で GM1 を染色する場合は、氷上で 30 分間 10 nM Cholera toxin B subunit Alexa488 conjugated と反応させ、PBS で洗浄した。さらに、4% Paraformaldehyde (Sigma) で 15 分間固定し、0.1% Triton X-100/PBS で 5 分間、膜透過処理を行った。3 回 G-PBS (200 mM Glycine/PBS) で洗った後に、3% BSA/PBS で 1 時間、室温の条件でブロッキングを行なった。一次抗体を加えた 3% BSA/PBS に溶液を置換し、一晩、4°C の条件で一次抗体反応を行なった。0.1% BSA/PBS で 5 分間の洗いを 3 回繰り返し、二次抗体反応を 3% BSA/PBS に二次抗体を加え、1 時間、室温、遮光の条件下で行なった。0.1% BSA/PBS で 5 分間の洗いを 3 回繰り返したのちに、75% Glycerol/PBS でマウントした。LSM780 (Carl Zeiss) で撮影した。解析は ImageJ/Fiji を用いて CTB の染色像をもとに未分化細胞では細胞膜近傍のマスクを侵食処理によって作成し、神経突起では CTB の染色像を用いてマスクを作成した。これらのマスクにおける共局在率を plug-in である colocalize threshold を用いて行なった。解析結果は Mander's coefficient (tM1, tM2, 0~1) を示した。

### リコンビナント NAP-22 の調製

pET14b の制限酵素サイト (Nco I — Xho I) に *baspl* 遺伝子 (accession: NP\_071636, *Rattus norvegicus*) を挿入したベクター (Takasaki et al., 1999) を用いて BL21(DE3) を形質転換した。形質転換した大腸菌は LB 培地 (アンピシリン 100 µg/mL) 中で 37°C, 200 rpm の条件下で培養し、OD600 nm が 1.0 に到達した時点

で IPTG (終濃度 1 mM) を添加し、発現誘導を行なった。発現誘導後は 30°C で 6 時間培養し、菌体を 6,500×g、4°C、15 分の条件で遠心分離により回収した。回収した菌体は Terashita らの手法 (Terashita et al., 2002) を改変して破碎、精製を行なった。200 mL 培養菌体あたりに 10 mL の TEG buffer を加えて懸濁し、超音波で破碎した。破碎上清に 95°C、10 分の熱処理を加えた後に、11,840×g、4°C、1 時間の条件で遠心分離し、上清を回収した。上清に過塩素酸 (終濃度 2.5%) を加え氷上で 10 分間反応させ、11,840×g、4°C、1 時間の条件で遠心分離し、上清を回収した。上清に対して硫酸アンモニウムを 80% 飽和で一晩攪拌して硫酸沈殿を行なった。溶液は遠心分離後に上清を除き TEG を用いて 40% 飽和にした硫酸アンモニウムで可溶化させ、粗精製画分とした。TEG buffer で調製した 40% 飽和硫酸アンモニウム溶液で平衡化した 1 mL Phenyl Sepharose column に粗精製画分を通し、TEG buffer で調製した 40% 飽和硫酸アンモニウム溶液で洗いを行なったのちに、TEG buffer と硫酸アンモニウムを用いたステップワイズで溶出を行なった。TEG buffer を外液とした透析 (カットオフ 10 kDa) を行なったのちに、1 mL DEAE-Sepharose column で NaCl のグラジエント (0-200 mM) で溶出を行い、再び TEG buffer を外液とした透析をおこなった。

#### リコンビナント NMT-1 の調製

Dr. Richard A. Kahn から御恵与いただいたヒト由来 *nmt1* 遺伝子(ref) を pET28a の制限酵素サイト (Nde I — Xho I) に挿入したベクターを用いて形質転換した BL21(DE3) を形質転換した。形質転換した大腸菌は LB 培地 (カナマイシン 30 µg/mL) 中で 37°C、200 rpm の条件下で培養し、OD<sub>600</sub> nm が 1.0 に到達した時点で IPTG (終濃度 0.4 mM) を添加し、発現誘導を行なった。発現誘導後は 18°C で 6 時間培養し、菌体を 6,500×g、4°C、15 分の条件で遠心分離により回収した。回収した菌体は 200 mL 培養あたり 5 mL の Cell Lytic B () を添加し、室温で 15 分間静置することで破碎した。破碎上清の体積の 5 倍量に相当する平衡化 buffer を加え、0.45 µm のフィルターを通したのちに 1 mL HISTRAP column を用いて精製した。Wash buffer で洗浄後、Elution buffer で溶出した。

#### *In vitro* myristoylation

精製した NAP-22 (終濃度 15.2 µM) と NMT-1 (終濃度 1.5 µM) を反応 buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 0.2 mM EGTA) に可溶化させたミリストイル CoA (終濃度 61

$\mu\text{M}$ )を混合して、一晚、 $30^{\circ}\text{C}$ の条件下で静置して反応を行なった。ミリストイル化反応の確認は MALDI-TOF MS (bruker)を用いた質量分析により行なった。10 mg/mL シナピン酸アセトン溶液を質量分析用のプレートに滴下して薄層を作製した。タンパク質溶液と 10 mg/mL のシナピン酸 50%エタノール溶液を 1:20 で混合し、作製した薄層上に滴下して結晶化させた。キャリブレーションは Calibration Mixture2 (bruker)を用いた。

#### ビーズへのタンパク質の固相化

Activation buffer で可溶化した BSA、NAP-22、myrNAP-22 (各 150  $\mu\text{g}$ )と 25  $\mu\text{L}$  Dynabeads Amine coated を混合し、EDC/NHS 溶液を加えて室温で 2 時間ゆっくりと攪拌した。Ethanamine (終濃度 100 mM)を加え室温で 15 分間ゆっくりと攪拌したのちに TEG buffer で洗浄し、ビーズは  $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### BDNF 刺激

BDNF 刺激の方法は Evan らの手法を用いた (Elliott et al., 2005)。PDL コートディッシュに培養した神経分化後の P19C6 細胞の培地を DMEM (1% P/S)に置換し、 $37^{\circ}\text{C}$ で 2 時間、5%  $\text{CO}_2$ の条件下で静置し、飢餓状態にした。飢餓状態にした細胞に BDNF (終濃度 25 ng/mL)を添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ の条件下で静置して刺激を行なった。

#### ビーズによる共沈

未刺激の細胞と BDNF 刺激を行なった細胞を PBS で洗い、TME (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% inhibitor cocktail)を添加し、セルスクレーパーで細胞を剥離した。細胞懸濁液はダウンスホモジナイザーを用いて氷上で 10 回のストロークを行うことで破砕し、破砕上清を得た。破砕上清のタンパク質量は Bradford 法を用いて定量し、150  $\mu\text{g}$  分の破砕上清に 75  $\mu\text{g}$  分のタンパク質を結合させたビーズを混合し、室温で 2 時間、ゆっくりと攪拌しながら反応させた。反応後の上清を除き、TMEN-T (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 140 mM NaCl, 0.1% TritonX-100)で 5 回洗浄した。洗浄後のビーズは 2×sample buffer とビーズを混合し  $95^{\circ}\text{C}$ で 3 分間加熱し、その上清を 12.5% SDS-PAGE にて展開した。泳動後のゲルは Sypro Ruby 染色後に Typhoon FLA9500 (GE Healthcare)で撮影した。

## 共免疫沈降法

PBS で洗浄した細胞を IP Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Ippgepal CA630, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% inhibitor cocktail) で可溶化し、遠心分離後に上清を回収した。その上清のタンパク質量を Bradford 法で定量し、1 mg/mL の濃度のライセートを調整した。200  $\mu$ L のライセートに対して IP buffer で平行化した Sepharose 4B beads (GE Healthcare) を 40  $\mu$ L 加え、60 min, 4°C で静置した。その後遠心分離によって上清を回収し、抗体を加え (1:25)、室温で一時間反応させたのちに、Protein G Mag Sepharose を加えさらに一時間反応させた。反応後に磁気によって沈殿を回収し、3 回 IP wash Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% inhibitor cocktail) で洗浄し、加えた beads の 10 倍量の 1×Sample Buffer で懸濁し、熱処理後に上清を SDS-PAGE に供し、ウエウスタンプロティングを行った。

## トリプシン消化、質量分析による同定

切り出したゲル片をプロテオセーブチューブに移し、180  $\mu$ L の溶液 A を添加し、室温で 15 分間静置した。上清を除いた後に 50  $\mu$ L の溶液 B を加え 60 °C で 30 分間静置した。上清を除いた後に 50  $\mu$ L の溶液 C を加え、5 分間振盪した。上清を除き、50  $\mu$ L の溶液 D を加え、30 分間遮光条件で振盪した。上清を除き、500  $\mu$ L の溶液 C を加えて転倒混和させたのちに上清を再び除き、100  $\mu$ L の acetonitrile を加えて室温で 5 分間静置した。上清を除き、20  $\mu$ L のトリプシン溶液を加えて約 5 分間程度ゲルの色が透明に変色するまで静置し、上清を除いた。40  $\mu$ L のトリプシン(-)溶液を加え、37°C で一晩静置した。

上清を回収したのちに、100  $\mu$ L の Ultrapure water を加えて室温で 10 分間静置したのちに再び上清を回収した。0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)-60% acetonitrile 溶液、0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)-80% acetonitrile 溶液、0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)-100% acetonitrile 溶液の順で 50  $\mu$ L 加えてから 20 分静置し、回収する操作を行なった。0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)-100% acetonitrile の操作は 2 度おこなった。この操作中で回収した上清はひとまとめにし、遠心エバポレーター CVE-2000 (EYELA) で溶液量が 2  $\mu$ L 程度になるまで遠心した。

得られた溶液は c-tip (AMR) で脱塩処理を行なった。TFA\_A 溶液を用いてサンプルの溶媒を置換した。また、試薬 A で平衡化、試薬 B で洗い、試薬 A で溶出し、再び遠心エバポレーターで溶液量が 2  $\mu$ L 程度になるまで遠心し、TFA\_A で

20  $\mu$ L に調整した。

質量分析は国立研究開発法人・材料研究開発機構 (NIMS) の Zaplous nano-advanced LC (AMR) と Q-Exactive plus (Thermo Fisher) を組み合わせた液体クロマトグラフ-オービタルトラップ型質量分析装置 (LC/MS/MS) を使用し、得られた質量電荷比ピーク群は Proteome discoverer (Thermo Fisher) を用いて解析を行なった。解析アルゴリズムには Mascot を使用し、Database Swiss-Prot を使用した。同定条件には carbamoyl-methyl 修飾が起きること、また、oxidation の可能性を含めた条件とした。

## 参考文献

- Alam, M. A., Subramanyam Rallabandi, V. P., & Roy, P. K. (2016). Systems biology of immunomodulation for post-stroke neuroplasticity: Multimodal implications of pharmacotherapy and neurorehabilitation. *Frontiers in Neurology*, 7(JUN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00094>
- Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., & Tikkanen, R. (2009). Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cellular Signalling*, 21, 1287–1297. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.03.012>
- Banning, A., Regenbrecht, C. R. a, & Tikkanen, R. (2014). Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model. *Cellular Signalling*, 26(2), 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.001>
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., ... Canaider, S. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40(6), 463–471. <https://doi.org/10.3109/03014460.2013.807878>
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., & Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13793–13802. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13793>
- Blum, R., & Konnerth, A. (2005). Neurotrophin-Mediated Rapid Signaling in the Central Nervous System :
- Bodrikov, V., Pauschert, A., Kochlamazashvili, G., & Stuermer, C. A. O. (2017). Reggie-1 and reggie-2 (flotillins) participate in Rab11a-dependent cargo trafficking, spine synapse formation and LTP-related AMPA receptor (GluA1) surface exposure in mouse hippocampal neurons. *Experimental Neurology*, 289, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.12.007>
- Boerner, R. J., Kassel, D. B., Barker, S. C., Ellis, B., DeLacy, P., & Knight, W. B. (1996). Correlation of the phosphorylation states of pp60(c-src) with tyrosine kinase activity: The intramolecular pY530-SH2 complex retains significant activity if Y419 is phosphorylated. *Biochemistry*, 35(29), 9519–9525. <https://doi.org/10.1021/bi960248u>
- Brignatz, C., Paronetto, M. P., Opi, S., Cappellari, M., Audebert, S., Feuillet, V., ... Collette, Y. (2009). Alternative splicing modulates autoinhibition and SH3 accessibility in the Src kinase Fyn. *Molecular and Cellular Biology*, 29(24), 6438–6448. <https://doi.org/10.1128/MCB.00398-09>
- Brugge, J. S., & Erikson, R. L. (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*, 269(5626), 346–348. <https://doi.org/10.1038/269346a0>
- Cai, T., Wang, H., Chen, Y., Liu, L., Gunning, W. T., Quintas, L. E. M., & Xie, Z. J. (2008). Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na/K-ATPase. *Journal of Cell Biology*, 182(6), 1153–1169. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712022>

- Carpenter, B., Hill, K. J., Charalambous, M., Wagner, K. J., Lahiri, D., James, D. I., ... Roberts, S. G. E. (2004). BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1. *Molecular and Cellular Biology*, 24(2), 537–549. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.537>
- Cui, Y., Yang, Z., & Teasdale, R. D. (2018). The functional roles of retromer in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 592(7), 1096–1112. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12931>
- Cunha, C., Brambilla, R., & Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 3(February), 1. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.001.2010>
- De Juan-Sanz, J., Enrique Nuñez, Zafra, F., Berrocal, M., Corbacho, I., Ibáñez, I., ... Aragón, C. (2014). Presynaptic control of glycine transporter 2 (GlyT2) by physical and functional association with plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX). *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 34308–34324. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.586966>
- Dehmelt, L., & Halpain, S. (2004). Protein family review The MAP2 / Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 6, 1–10.
- den Hertog, J., Pals, C. E. G. M., Peppelenbosch, M. P., Tertoolen, L. G., de Laat, S. W., & Kruijer, W. (1993). Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates pp60c-src and is involved in neuronal differentiation. *EMBO Journal*, 12(10), 3789–3798. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06057.x>
- Edwards, M. K. S., & McBurney, M. W. (1983). The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Developmental Biology*, 98(1), 187–191. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90348-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90348-2)
- Elliott, E., Atlas, R., Lange, A., & Ginzburg, I. (2005). Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 Kinase signalling mechanism. *The European Journal of Neuroscience*, 22(5), 1081–1089. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04290.x>
- Forsova, O. S., & Zakharov, V. V. (2016). High-order oligomers of intrinsically disordered brain proteins BASP1 and GAP-43 preserve the structural disorder. *FEBS Journal*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/febs.13692>
- Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C., & Caroni, P. (2000). Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *Journal of Cell Biology*, 149(7), 1443–1453. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1443>
- Gauthier-Kemper, A., Alonso, M. S., Sündermann, F., Niewidok, B., Fernandez, M. P., Bakota, L., ... Brandt, R. (2018). Annexins A2 and A6 interact with the extreme N terminus of tau and thereby contribute to tau's axonal localization. *Journal of Biological Chemistry*, 293(21), 8065–8076. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000490>
- Gerke, V., & Moss, S. E. (2002). Annexins : From structure to function. *Physiological Reviews*, 82(2), 331–371. <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2001>
- Goodfellow, S. J., Rebello, M. R., Toska, E., Zeef, L. A. H., Rudd, S. G., Medler, K. F., & Roberts, S. G. E. (2011).

- WT1 and its transcriptional cofactor BASP1 redirect the differentiation pathway of an established blood cell line. *The Biochemical Journal*, 435(1), 113–125. <https://doi.org/10.1042/BJ20101734>
- Gray, N., Steitz, T., Moore, P., Jiang, C., & Schuman, E. M. (2002). Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites, 27(10), 506–513.
- Green, L. M., Wagner, K. J., Campbell, H. A., Addison, K., & Roberts, S. G. E. (2009). Dynamic interaction between WT1 and BASP1 in transcriptional regulation during differentiation. *Nucleic Acids Research*, 37(2), 431–440. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn955>
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2424–2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>
- Haney, C. H., & Long, S. R. (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 478–483. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910081107>
- Hashemi, M., Bahari, G., & Markowski, J. (2018). Association of PDCD6 polymorphisms with the risk of cancer : Evidence from a meta-analysis, 9(37), 24857–24868.
- Hayashi, N., Nakagawa, C., Ito, Y., Takasaki, A., Jinbo, Y., Yamakawa, Y., ... Matsushima, N. (2004). Myristoylation-regulated direct interaction between calcium-bound calmodulin and N-terminal region of pp60v-src. *Journal of Molecular Biology*, 338(1), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.041>
- Iino, S., Kobayashi, S., & Maekawa, S. (1999). Immunohistochemical localization of a novel acidic calmodulin-binding protein, NAP-22, in the rat brain. *Neuroscience*, 91(4), 1435–1444. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00701-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00701-5)
- Ilangumaran, S., & Hoessli, D. C. (1998). Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochemical Journal*, 335, 433–440. <https://doi.org/10.1042/bj3350433>
- J. Nakai, M. Ohkura, & K. Imoto. (2001). A high signal-to-noise  $ca^{2+}$  probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 3, 137–141. <https://doi.org/10.1038/84397>
- Jain, P., & Bhalla, U. S. (2009). Signaling logic of activity-triggered dendritic protein synthesis: An mTOR gate but not a feedback switch. *PLoS Computational Biology*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000287>
- Jiao, X., Sherman, B. T., Huang, D. W., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2012). DAVID-WS: A stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics*, 28(13), 1805–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts251>
- Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. a, & Kalnins, V. I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *The Journal of Cell Biology*, 94(2), 253–262.
- Kalka, D., Reitzenstein, C. Von, & Cantz, M. (2001). The Plasma Membrane Ganglioside Sialidase Cofractionates

- with Markers of Lipid Rafts, 993, 989–993. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4864>
- Kilanczyk, E., Filipek, A., & Hetman, M. (2015). Calcyclin-binding protein/Siah-1-interacting protein as a regulator of transcriptional responses in brain cells. *Journal of Neuroscience Research*, 93(1), 75–81. <https://doi.org/10.1002/jnr.23466>
- Kitaura, Y., Matsumoto, S., Satoh, H., Hitomi, K., & Maki, M. (2001). Peflin and ALG-2, Members of the Penta-EF-Hand Protein Family, Form a Heterodimer That Dissociates in a Ca<sup>2+</sup>-dependent Manner\*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 14053–14058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008649200>
- Kobayashi, Y., da Silva, R., Kumanogoh, H., Miyata, S., Sato, C., Kitajima, K., ... Maekawa, S. (2015). Ganglioside contained in the neuronal tissue-enriched acidic protein of 22 kDa (NAP-22) fraction prepared from the detergent-resistant membrane microdomain of rat brain inhibits the phosphatase activity of calcineurin. *Journal of Neuroscience Research*, 00(April), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jnr.23599>
- Kotani, N., Nakano, T., Ida, Y., Ito, R., Hashizume, M., Yamaguchi, A., ... Murakoshi, T. (2017). Analysis of lipid raft molecules in the living brain slices. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.08.012>
- Kropotova, E., Klementiev, B., & Mosevitsky, M. (2013). BASP1 and its N-end fragments (BNEMFs) dynamics in rat brain during development. *Neurochemical Research*, 38(6), 1278–1284. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1035-y>
- Kukharsky, V., Sulimenko, V., Macůrek, L., Sulimenko, T., Dráberová, E., & Dráber, P. (2004). Complexes of  $\gamma$ -tubulin with nonreceptor protein tyrosine kinases Src and Fyn in differentiating P19 embryonal carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 298(1), 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.04.016>
- Kumanogoh, H., Miyata, S., Sokawa, Y., & Maekawa, S. (2001). Biochemical and morphological analysis on the localization of Rac1 in neurons. *Neuroscience Research*, 39(2), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00211-X)
- Kurrlle, N., John, B., Meister, M., & Tikkanen, R. (2012). Function of flotillins in receptor tyrosine kinase signaling and endocytosis: role of tyrosine phosphorylation and oligomerization. *Protein Phosphorylation in Human Health*, (4). Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/protein-phosphorylation-in-human-health/function-of-flotillins-in-receptor-tyrosine-kinase-signaling-and-endocytosis-role-of-tyrosine-phosph>
- Lang, D. M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrausch, B., Laessing, U., ... Stuermer, C. a O. (1998). Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *Journal of Neurobiology*, 37(4), 502–523. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199812\)37:4<502::AID-NEU2>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199812)37:4<502::AID-NEU2>3.0.CO;2-S)
- Langelier, B., Linard, A., Bordat, C., Lavielle, M., & Heberden, C. (2010). Long chain-polyunsaturated fatty acids modulate membrane phospholipid composition and protein localization in lipid rafts of neural stem cell

- cultures. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(6), 1356–1364. <https://doi.org/10.1002/jcb.22652>
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., & Caroni, P. (2000a). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P2 at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *Journal of Cell Biology*, 149(7), 1455–1471. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1455>
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., & Caroni, P. (2000b). Rafts , and Regulate Cell Cortex Actin Dynamics through a Common Mechanism. *Cell*, 149(7), 1455–1471. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.7.1455>
- Leal, G., Comprido, D., & Duarte, C. B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76(PART C), 639–656. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., ... Brade, Y.-A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 341, 149–152. <https://doi.org/10.1038/340301a0>
- Li, Z., & Xie, Z. (2009). The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotoxic steroid-activated protein kinase cascades. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 457(3), 635–644. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0470-0>
- Lingwood, D., Harauz, G., & Ballantyne, J. S. (2005). Regulation of fish gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase by selective sulfatide-enriched raft partitioning during seawater adaptation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 36545–36550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506670200>
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>
- López-Muñoz, F., Boya, J., & Alamo, C. (2006). Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramón y Cajal. *Brain Research Bulletin*, 70(4–6), 391–405. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.07.010>
- López, D., Kolter, R., & Lo, D. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes, 1893–1902. <https://doi.org/10.1101/gad.1945010>
- Lucero, H. A., & Robbins, P. W. (2004). Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426(2), 208–224. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.020>
- MacPherson, P. (1995). P19 Embryonal Carcinoma Cells: A Source of Cultured Neurons Amenable to Genetic Manipulation. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.1995.1029>
- Maekawa, S., Kobayashi, Y., Morita, M., & Suzaki, T. (2015). Tight binding of NAP-22 with acidic membrane lipids. *Neuroscience Letters*, 600, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.06.025>
- Maekawa, S., Kobayashi, Y., Odagaki, S. I., Makino, M., Kumanogoh, H., Nakamura, S., ... Hayashi, F. (2013). Interaction of NAP-22 with brain glutamic acid decarboxylase (GAD). *Neuroscience Letters*, 537, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.01.030>

- Maekawa, S., Maekawa, M., Hattori, S., & Nakamura, S. (1993). Purification and molecular cloning of a novel acidic calmodulin binding protein from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(18), 13703–13709.
- Maekawa, S., Murofushi, H., & Nakamura, S. (1994). Inhibitory effect of calmodulin on phosphorylation of NAP-22 with protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(30), 19462–19465.
- Makdissy, N., Haddad, K., Albacha, J. D. A., Chaker, D., Ismail, B., Azar, A., ... Fajloun, Z. (2018). Essential role of ATP6AP2 enrichment in caveolae/lipid raft microdomains for the induction of neuronal differentiation of stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, *9*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0862-9>
- Marte, A., Messa, M., Benfenati, F., & Onofri, F. (2016). Synapsins Are Downstream Players of the BDNF-Mediated Axonal Growth. *Molecular Neurobiology*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9659-3>
- Matsubara, M., Nakatsu, T., Kato, H., & Taniguchi, H. (2004). Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *The EMBO Journal*, *23*(4), 712–718. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600093>
- Matsubara, M., Titani, K., Taniguchi, H., & Hayashi, N. (2003). Direct involvement of protein myristoylation in myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)-calmodulin interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(49), 48898–48902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305488200>
- Maurer-Stroh, S., Gouda, M., Novatchkova, M., Schleiffer, A., Schneider, G., Sirota, F. L., ... Eisenhaber, F. (2004). MYRbase: analysis of genome-wide glycine myristoylation enlarges the functional spectrum of eukaryotic myristoylated proteins. *Genome Biology*, *5*(3), R21. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r21>
- McBurney, M. W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *The International Journal of Developmental Biology*, *37*(1), 135–140. <https://doi.org/8507558>
- Mosevitsky, M., Capony, J., Skladchikova, Gy., Novitskaya, V., Plekhanov, Ay., & Zaharov, V. (1997). The BASP1 family of myristoylated proteins abundant in axonal termini. Primary structure analysis and physico-chemical properties. *Biochimie*, *79*, 373–384.
- Mosevitsky, M. I. (2005). Nerve ending “signal” proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. *International Review of Cytology*, *245*(05), 245–325. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)45007-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)45007-X)
- Mosevitsky, M. I., Novitskaya, V. A., Plekhanov, A. Y., & Skladchikova, G. Y. (1994). Neuronal protein GAP-43 is a member of novel group of brain acid-soluble proteins (BASPs). *Neuroscience Research*, *19*(2), 223–228. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(94\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)90146-5)
- Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., ... Aizawa, S. (1993). Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell*, *73*(6), 1125–1135. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90642-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90642-4)
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Lüers, G., Stuermer, C. a O., ... Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and

- oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *The Biochemical Journal*, 378(Pt 2), 509–518.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20031100>
- Odagaki, S. I., Kumanogoh, H., Nakamura, S., & Maekawa, S. (2009). Biochemical interaction of an actin-capping protein, CapZ, with NAP-22. *Journal of Neuroscience Research*, 87(9), 1980–1985.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.22040>
- Peitzsch, R. M., & McLaughlin, S. (1993). Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry*, 32(39), 10436–10443. <https://doi.org/10.1021/bi00090a020>
- Peterson, T. A., & Stannnes, M. (2013). ARF1-regulated coatamer directs the steady-state localization of protein kinase C epsilon at the Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(3), 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.011>
- Pietrini, G., Matteoli, M., Banker, G., & Caplan, M. J. (1992). Isoforms of the Na,K-ATPase are present in both axons and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), 8414–8418. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8414>
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Pittenger, M. F. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Poo, M. ming. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(1), 24–32.  
<https://doi.org/10.1038/35049004>
- Popova, D., Karlsson, J., & Jacobsson, S. O. P. (2017). Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical- and toxin-induced neurotoxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40360-017-0151-8>
- Resh, M. D. (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cellular Signalling*, 8(6), 403–412. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(96\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(96)00088-5)
- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristylated and palmitoylated proteins. *BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA*, 1451, 1–16.
- Resh, M. D. (2016). Fatty Acylation of Proteins: The Long and the Short of it. *Progress in Lipid Research*, 63, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.05.002>
- Riento, K., Frick, M., Schafer, I., & Nichols, B. J. (2009). Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *Journal of Cell Science*, 122, 912–918. <https://doi.org/10.1242/jcs.039024>
- Riento, K., Zhang, Q., Clark, J., Begum, F., Stephens, E., Wakelam, M. J., & Nichols, B. J. (2018). Flotillin proteins recruit sphingosine to membranes and maintain cellular sphingosine-1-phosphate levels. *Plos One*, 13(5), e0197401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197401>

- Sanchez-Niño, M. D., Sanz, A. B., Lorz, C., Gnirke, A., Rastaldi, M. P., Nair, V., ... Ortiz, A. (2010). BASP1 promotes apoptosis in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, *21*, 610–621. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009020227>
- Sato, K., & Nakano, A. (2007). Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Letters*, *581*(11), 2076–2082. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.091>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schulte, T., Paschke, K. a, Laessing, U., Lottspeich, F., & Stuermer, C. a. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development (Cambridge, England)*, *124*(2), 577–587.
- Sebastião, A. M., Colino-Oliveira, M., Assaife-Lopes, N., Dias, R. B., & Ribeiro, J. a. (2013). Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: Impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology*, *64*, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.053>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, *387*(6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, *1*(1471-0072), 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, *175*(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.175.4023.720>
- Singh, H., Cousin, M. A., & Ashley, R. H. (2007). Functional reconstitution of mammalian “chloride intracellular channels” CLIC1, CLIC4 and CLIC5 reveals differential regulation by cytoskeletal actin. *FEBS Journal*, *274*(24), 6306–6316. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06145.x>
- Souza-schorey, C. D., & Chavrier, P. (2006). REVIEWS ARF proteins : roles in membrane traffic and beyond, *7*(May). <https://doi.org/10.1038/nrm1910>
- Spence, E. F., & Soderling, S. H. (2015). Actin out: Regulation of the synaptic cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(48), 28613–28622. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.655118>
- Staines, W. a. et al. (1994). NEURONS DERIVED FROM P19 EMBRYONAL CARCINOMA CELLS HAVE VARIED MORPHOLOGIES AND NEUROTRANSMITTERS. *Pergamon*, *58*(4), 735–751.
- Stuermer, C. a O. (2011). Reggie/flotillin and the targeted delivery of cargo. *Journal of Neurochemistry*, *116*(5), 708–713. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07007.x>
- Suginta, W., Karoulias, N., Aitken, A., & Ashley, R. H. (2001). Chloride intracellular channel protein CLIC4 (p64H1) binds directly to brain dynamin I in a complex containing actin, tubulin and 14-3-3 isoforms. *The*

- Biochemical Journal*, 359(Pt 1), 55–64. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590055>
- Suzuki, K. G. N., & Akihito, K. (2013). New Raft Hypothesis: Mechanisms for Signal Transduction via Rafts in Cell Membranes. *生物物理*, 53(6), 295–300.
- Suzuki, S., Numakawa, T., Shimazu, K., Koshimizu, H., Hara, T., Hatanaka, H., ... Kojima, M. (2004). BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: Roles in synaptic modulation. *Journal of Cell Biology*, 167(6), 1205–1215. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404106>
- Suzuki, T., Zhang, J., Miyazawa, S., Liu, Q., Farzan, M. R., & Yao, W. D. (2011). Association of membrane rafts and postsynaptic density: Proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. *Journal of Neurochemistry*, 119(1), 64–77. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07404.x>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takaichi, R., Odagaki, S. I., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Morita, M., & Maekawa, S. (2012). Inhibitory effect of NAP-22 on the phosphatase activity of synaptojanin-1. *Journal of Neuroscience Research*, 90(1), 21–27. <https://doi.org/10.1002/jnr.22740>
- Takasaki, A., Hayashi, N., Matsubara, M., Yamauchi, E., & Taniguchi, H. (1999). Identification of the calmodulin-binding domain of neuron-specific protein kinase C substrate protein CAP-22/NAP-22: Direct involvement of protein myristoylation in calmodulin-target protein interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11848–11853. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11848>
- Takayama, Y., Nada, S., Nagai, K., & Okada, M. (1997). Role of Csk in neural differentiation of the embryonic carcinoma cell line P19. *FEBS Letters*, 406(1–2), 11–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00224-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00224-X)
- Tapia-Arancibia, L., Aliaga, E., Silhol, M., & Arancibia, S. (2008). New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Research Reviews*, 59(1), 201–220. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.07.007>
- Terashita, A., Funatsu, N., Umeda, M., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., Epand, R. M., & Maekawa, S. (2002). Lipid binding activity of a neuron-specific protein NAP-22 studied in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 70(2), 172–179. <https://doi.org/10.1002/jnr.10407>
- Thornton, S., Anand, N., Purcell, D., & Lee, J. (2003). Not just for housekeeping: Protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *Journal of Molecular Medicine*, 81(9), 536–548. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0461-8>
- Tian, J., & Xie, Z. (2008). The Na-K-ATPase and Calcium-Signaling Microdomains, 205–211. <https://doi.org/10.1152/physiol.00008.2008>
- Toska, E., Campbell, H. A., Shandilya, J., Goodfellow, S. J., Shore, P., Medler, K. F., & Roberts, S. G. E. (2012). Repression of Transcription by WT1-BASP1 Requires the Myristoylation of BASP1 and the PIP2-Dependent

- Recruitment of Histone Deacetylase. *Cell Reports*, 2(3), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.005>
- Ueno, S., Miyoshi, H., Maruyama, Y., Morita, M., & Maekawa, S. (2018). Interaction of dynamin I with NAP-22, a neuronal protein enriched in the presynaptic region. *Neuroscience Letters*, 675(February), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.061>
- Vacaresse, N., Møller, B., Danielsen, E. M., Okada, M., & Sap, J. (2008). Activation of c-Src and Fyn kinases by protein-tyrosine phosphatase RPTPa is substrate-specific and compatible with lipid raft localization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(51), 35815–35824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807964200>
- Vetrivel, K. S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., ... Thinakaran, G. (2004). Association of  $\gamma$ -secretase with lipid rafts in post-golgi and endosome membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44945–44954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407986200>
- Volonté, D., Galbiati, F., Li, S., Nishiyama, K., Okamoto, T., & Lisanti, M. P. (1999). Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo: Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12702–12709. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12702>
- Watkins, J., Basu, S., & Bogenhagen, D. F. (2008). A Quantitative Proteomic Analysis of Mitochondrial Participation in P19 Cell Neuronal Differentiation. *Journal of Proteome Research*, 7, 328–338.
- Widmer, F., & Caroni, P. (1990). Identification, localization, and primary structure of CAP-23, a particle-bound cytosolic protein of early development. *Journal of Cell Biology*, 111(6 II), 3035–3047. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.6.3035>
- Ye, Q., Lai, F., Banerjee, M., Duan, Q., Li, Z., Si, S., & Xie, Z. (2013). Expression of mutant  $\alpha$ 1 Na/K-ATpase defective in conformational transition attenuates src-mediated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5803–5814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442608>
- Yokoyama, H., Fujii, S., & Matsui, I. (2008). Crystal Structure of a Core Domain of Stomatin from *Pyrococcus horikoshii* Illustrates a Novel Trimeric and Coiled-Coil Fold. *Journal of Molecular Biology*, 376(3), 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.024>
- Zakharov, V. V., Capony, J. P., Derancourt, J., Kropolova, E. S., Novitskaya, V. A., Bogdanova, M. N., & Mosevitsky, M. I. (2003). Natural N-terminal fragments of brain abundant myristoylated protein BASP1. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1622(1), 14–19. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00099-0)
- Zemelman, B. V., Lee, G. A., Ng, M., & Miesenböck, G. (2002). Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron*, 33(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00574-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00574-8)

## 報文目録

### 公表論文

1. Kei Hanafusa, Nobuhiro Hayashi. The Flitillin2 component of the lipid raft changes localization during neural differentiation of P19C6 cells. *BMC Molecular and Cell Biology* (受理)

### 学会発表

1. 花房 慶、池田-朴明宣、大野敏、横川隆志、林宣宏「脂質ラフト構成因子の部位特異的蛍光標識による局在解析」、第八回光塾 2016/12/17～2016/12/18 東京工業大学すずかけ台キャンパス（口頭兼ポスター）

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導を賜りました東京工業大学 林宣宏准教授に感謝いたします。

また、様々な面でご支援を頂きました東京工業大学 一瀬宏教授、ならびに原怜助教授に感謝いたします。所属していた情報生命博士教育院の教員・スタッフの皆様に感謝いたします。メンターとして相談にのっていただき、アドバイスをいただいた国立遺伝学研究所 黒川裕美子博士に感謝いたします。

本研究を行うにあたり、質量分析装置を使用させていただき、その解析をご教授いただいた国立研究開発法人物質・材料研究機構 (NIMS)のみなさまにお礼を申し上げます。

本研究以外の研究に関してもご支援いただき、研究に関連したアドバイスや今後の生活等についてご指導いただいた順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所 岩渕和久教授、中山仁志助教授、横山紀子博士に深く感謝いたします。環境医学研究所のみなさまにお礼を申し上げます。

共に研究を行い、励ましあった猫田侑希さん、岩田翔さん、川島春来さん、重松桃子さん、渡邊和哉さん、新井淳さん、宮川まどかさんに感謝します。共同研究を引き継がせていただいた井田加奈子さん、土居里奈さんに感謝いたします。また、情報生命博士教育院で交流を深め、度々励ましあった皆様に感謝いたします。

最後に、長い大学生活を支えていただき、暖かく見守っていただいた家族に感謝いたします。