

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THE S I S S U M M A R Y

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	花房 慶		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	林 宣宏	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「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」と題し、5章より構成されている。

第1章「序論」では、研究の背景を述べ、着目した分子について説明している。まず、本研究では培養神経細胞を用いて、その細胞膜脂質ラフトに着目した研究により神経の機能を解明することを目的とすることを述べている。次に、第二章では神経分化前後における脂質ラフト、第三章では 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ことを述べている。脂質ラフトについては、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こと、また、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ことを説明している。次に、脂質ラフトに集積するタンパク質として、Flotillin2 (Flot2), Fyn, c-Src の説明をしている。また、神経細胞に関しては、分化と BDNF 刺激による細胞の応答を説明している。最後に、脂質ラフトの構成タンパク質であり、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 Neuronal tissue-enrichment acidic protein 22 kDa (NAP-22)に今回着目したと述べている。

第2章「神経分化前後における脂質ラフトの解析」では、脂質ラフトマーカータンパク質の(1)神経分化過程における発現量と存在量の変化の解析、(2)ショ糖密度勾配遠心法による局在解析、(3)免疫蛍光染色による局在解析を行ったと述べている。その結果、Flot2 は神経分化後に脂質ラフトにおける存在量が増加し、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がわかったと述べている。また、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 は脂質ラフトへの局在が増加し、c-Src の脂質ラフトへの局在が減少していることがわかったと述べている。

第3章「BDNF 刺激下における NAP-22 の機能解明」では、BDNF-TrkB シグナリングとの関連性が高いと先行研究により考えられている NAP-22 の機能を、その相互作用因子を同定することによって明らかにすることを目的とすると述べている。最初に、今回使用した細胞の BDNF 刺激を検討している。次に、NAP-22 を固相化したビーズを作製し、これを用いて NAP-22 と細胞内タンパク質の相互作用因子を同定したと述べている。同定されたものの中で eIF4E に着目し、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こと、免疫染色によってその局在を観察し、未刺激の細胞に比べ、BDNF 刺激後の細胞では両者の顕著な共局在が認められたことから、両者は直接の相互作用ではなく、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と述べている。

第4章「総括と今後の展望」では、本論文で得られた結果について総括し、考察を述べている。最初に、ノンラフトマーカーである Na/K ATPase と共局在を示さない Flot2 が神経突起に局在していたことから、Flot2 が脂質ラフトに局在し、刺激によるエンドサイトーシスに関わると考えられると述べている。次に、NAP-22 が BDNF 刺激によって脂質ラフトに移行したことから、BDNF 刺激によって脂質ラフトを介した細胞応答が起きていると考えられると述べている。また、TrkB 受容体も BDNF を認識することで脂質ラフトに移行するため、NAP-22 がその移行メカニズムに関わる可能性があると述べている。さらに、NAP-22 がミトコンドリアやシナプス小胞などの酸性脂質領域、さらに脂質ドメインに N 末端のミリストイル基によって局在し、C 末端側で細胞骨格と相互作用することで細胞内分子輸送に関わっている可能性があるとも述べている。NAP-22 が神経突起での局所タンパク質合成に関わっている可能性にも言及している。

第5章「材料と方法」では、本研究で用いた手法の手順について具体的に説明している。

以上を要するに、本論文は細胞膜脂質ラフトの動態を神経分化や成長因子による刺激に伴うマーカータンパク質や構成因子の変化により調べることにより、神経細胞の機能構造の一端を解明した。これらの知見は、今後の脂質ラフトを介した神経細胞の機能発現に関する機能構造を示唆したものであり、理学上貢献するところが大きい。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THE S I S S U M M A R Y

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	花房 慶		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	林 宣宏	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Lipid rafts are microdomains that are rich with Glycosphingolipids and cholesterol and are constructed on the biological membrane, and some acylated proteins localized reversely to these regions. Lipid rafts are considered as platform for responses to stimuli of the cells. However, the molecular mechanisms such as lipid raft formation and the signaling have been almost unknown. This study focused on neuronal functions via lipid rafts.

Flot2, a component of the lipid raft, changes the location during neural differentiation of P19C cells. Flotillin-2 (Flot2) is a lipid raft scaffold protein that is thought to be related to neural differentiation. Flot2 is phosphorylated by Fyn, a Src kinase, and causes raft-dependent endocytosis; however, the exact role of Flot2 in neural differentiation remains unclear. In this study, we found that the expression levels of the Flot2 and Fyn proteins increased in whole-cell lysates of P19C6 cells after neural differentiation. In addition, sucrose density fractionation and immunofluorescence experiments revealed enhanced localization of Flot2 at lipid rafts after neural differentiation. In addition, we found that Fyn tend to colocalize with Flot2 lipid rafts in neural cells. Overall these findings suggest that Flot2 lipid rafts are associated with Fyn, and that Fyn phosphorylates Flot2 during neural differentiation of P19C6 cells.

Functionl analysis of NAP-22 under BDNF stimulation in P19 neural differentiation cells. It has been reported that NAP-22 interact with many proteins related to some neuronal functions such as BDNF stimulation pathway. However, neuronal functions that NAP-22 bears in the cells have not well known yet. To elucidate functions of NAP-22 under BDNF stimulation, co-precipitation assay was carried out. In the results, it was revealed that NAP-22 would interact with cytoskeletal related proteins, translation related proteins, and Ca²⁺ interaction related proteins. Especially among them, relation of NAP-22 with local protein synthesis in the neurite was a significant knowledge obtained from this study.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on [Tokyo Tech Research Repository Website \(T2R2\)](#).