

Title	蛍光標識化糖脂質プローブを用いた細胞膜糖脂質の動態解析
Author(s)	新井, 健太
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/72651">https://hdl.handle.net/11094/72651</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 ( 新井 健太 )

論文題名

蛍光標識化糖脂質プローブを用いた細胞膜糖脂質の動態解析

論文内容の要旨

糖脂質は細胞の種類や状態により構造が異なり、その組成比や単一構造そのものが細胞機能を制御することで、様々な生命現象に関与していることが知られている。一般的に糖脂質代謝はゴルジ体で行われるが詳細な機構は解明されていない。解決の糸口として筆者は蛍光標識化糖脂質を用いて、糖脂質の組成および局在の変化を詳細に解析しようと試みた。

これまでにラクトシルセラミド(LacCer)の脂肪酸をBODIPYにより蛍光標識した糖脂質プローブ(LacCer-BODIPY)を培養細胞に導入し、糖脂質の糖鎖修飾あるいは代謝過程を時空間的に解析する系がいくつか報告されている。しかしながら、当該プローブの添加条件が実験ごとに異なるため、細胞内局在変化に対する統一的な見解が得られていなかった。

そこで筆者は、LacCer-BODIPYの取り込みを厳密に制御することで細胞膜糖脂質の動態を正しくイメージできると考え、パルスチェイス法および濃度調節による条件検討を行った。その結果、始め細胞膜に局在していたLacCer-BODIPYがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、ベシクル輸送によりオルガネラに移行した後、再び細胞膜へと戻る循環的な経路の観察に成功した。この経時変化において各種オルガネラを染色して局在観察をおこなった結果、初期エンドソームからトランスゴルジ網を介して輸送されていることを確認した(図1)。

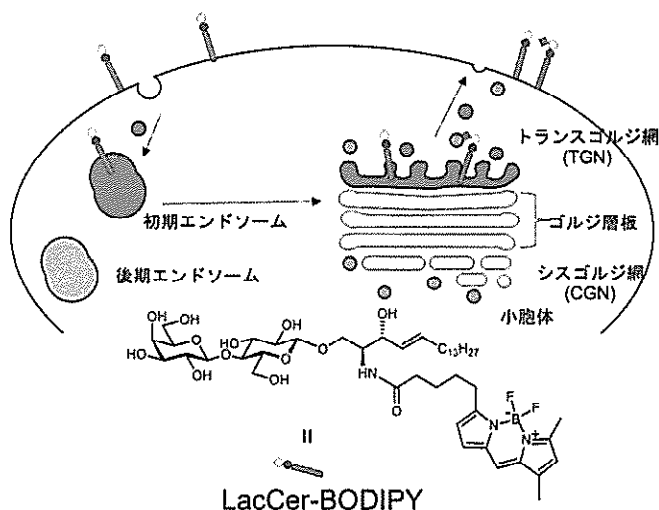


図1.LacCer-BODIPYのリサイクリング経路

さらに、LacCer-BODIPYを細胞膜流動性解析のための蛍光プローブとして活用する実験も行った。PC12D細胞はNGF刺激により神経様突起を伸展することが知られているが、その分化過程の細胞膜の流動性変化は調べられていない。そこで、PC12D細胞にNGF刺激を行った後、LacCer-BODIPYで細胞膜を染色し、細胞膜の流動性を光退色後蛍光回復(FRAP)法により解析した。

NGF stimulation	unstim.	5 min	30 min	24 hr	48 hr
Membrane diffusion	+	++	++	++	++
Neurite growth					
State of F-actin					

図2.NGF刺激とPC12Dの細胞膜流動性、細胞の形態、F-アクチンの状態の相関

その結果、NGF刺激により細胞膜の流動性が上昇することを確認した。さらにNGF刺激の5分後から48時間後までの間、細胞膜の流動性が高い状態が維持されていることも確認された。細胞のタイムラプス観察の結果、上記検討条件では NGF 刺激後 30 分程度から突起伸展が起こるため、膜流動性の上昇が神経様突起伸展の起因となることが示唆された。そこで次に、この流動性変化がNGF刺激による一連のシグナル活性化が引き起こすアクチン骨格の再構成によるものであるかを検証するために、F-アクチン結合ペプチドであるLifeact-EGFPを用いて動態変化をFRAP法により解析した。その結

果、NGF刺激により、Lifeactの動態の速さを示すT-halfが変化していることを確認した。このことから、LacCer-BODIPYの膜流動性が上昇する現象はアクチンの再重合が行われていることに起因するものであることを明らかにした(図2)。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 新井 健太 )										
(職)	氏 名									
論文審査担当者	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">主 査</td> <td style="width: 33%;">教授</td> <td style="width: 33%;">深瀬 浩一</td> </tr> <tr> <td>副 査</td> <td>教授</td> <td>梶原 康宏</td> </tr> <tr> <td>副 査</td> <td>特任教授</td> <td>島本 啓子</td> </tr> </table>	主 査	教授	深瀬 浩一	副 査	教授	梶原 康宏	副 査	特任教授	島本 啓子
主 査	教授	深瀬 浩一								
副 査	教授	梶原 康宏								
副 査	特任教授	島本 啓子								
論文審査の結果の要旨										
<p>新井健太は、蛍光標識化糖脂質プローブを用いたバイオイメーキング研究により、細胞膜糖脂質の動態ならびに細胞膜流動性を解析した。</p> <p>糖脂質代謝はゴルジ体で行われるが、その詳細な機構は解明されていない。新井健太は、蛍光標識化糖脂質を用いたバイオイメーキングにより、リサイクリング経路における糖脂質代謝の動態を解析した。以前にラクトシルセラミド(LacCer)の脂肪鎖をBODIPYにより蛍光標識した糖脂質プローブ(LacCer-BODIPY)を用いて、このプローブが細胞内で糖鎖修飾を受けることが確認されていた。しかしながら、過剰量のプローブ添加により、蛍光イメーキングによる細胞内局在変化を追尾することが困難であった。そこで、LacCer-BODIPYの取り込みを厳密に制御することで細胞膜糖脂質の動態を正しくイメーキングできると考え、パルスチェイス法および濃度調節による条件検討を行った。その結果、当初は細胞膜に局在していた糖脂質がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、ベシクル輸送によりオルガネラに移行した後、再び細胞膜へと戻る循環的な経路の観察に成功した。また、この経時変化において、初期エンドソームからトランスゴルジ網を介して糖脂質が輸送されていることを明らかにした。</p> <p>また、LacCer-BODIPYを用いた細胞膜流動性解析を行った。PC12D細胞は神経成長因子(NGF)刺激により神経様突起を伸展する。その分化過程において、細胞膜の流動性変化を解明するため、PC12D細胞にNGF刺激を行った後、LacCer-BODIPYを細胞膜に導入し、細胞膜の流動性を光退職後蛍光回復(FRAP)法により解析した。その結果、NGF刺激により細胞膜の流動性が上昇することを初めて見出した。さらにNGF刺激後、5分から48時間後まで、細胞膜の流動性が高い状態が維持されていることを確認した。NGF刺激後30分程度から突起伸展が起こるため、膜流動性の上昇が神経様突起伸展の起因となることを示唆した。またアクチンの動態変化をFRAP法により解析したところ、膜流動性の上昇とともにアクチンの再重合が行われていることを明らかにした。</p> <p>以上のように、本研究は糖脂質代謝や膜流動性動態について重要な知見を含むものとして評価できる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>										