

氏名・(本籍)	木内 泰
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理博第2065号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科, 専攻	東北大学大学院理学研究科(博士課程)物理学専攻
学位論文題目	PC12D細胞の神経突起伸長過程における膜流動性の顕微鏡イメージング
論文審査委員	(主査) 教授 新関 駒二郎 教授 大木 和夫 助教授 鈴木 章二, 岩井 伸一郎, 宮田 英威

論文目次

概要	1
第1章 序論	5
1.1 総論	5
1.2 生体膜の構造と膜流動性について	5
1.3 raftの発見とその生理的な役割	11
1.4 PC12D細胞とraftについて	15
1.5 これまでの測定方法とその問題点	19
1.6 研究の目的	21
第2章 実験方法	22
2.1 本章の構成	22
2.2 膜流動性のイメージング	22
2.2.1 蛍光プローブの光学的な特性	22
2.2.2 蛍光プローブの脂質膜中での発光 (GP値及び膜流動性の定義)	24
2.2.3 測定装置について	27
2.2.4 膜流動性画像(GP画像)の算出方法	32
2.2.5 Laurdanによる膜流動性測定の利点	33
2.3 PC12D細胞の培養方法及び各種処理方法について	41
2.3.1 培養方法	41
2.3.2 Laurdan染色方法	41
2.3.3 測定時のNGF処理	41
2.3.4 raftの染色	42
2.3.5 raftの破壊	42
2.4 試薬類	43

第3章 実験結果	44
3.1 本章の構成	44
3.2 PC12D細胞の膜流動性 (DPPCリポソームとの比較)	44
3.3 神経突起伸長過程の膜流動性の経時観察	50
3.3.1 未分化なPC12D細胞	50
3.3.2 分化したPC12D細胞	65
3.4 膜流動性によるraftの観察	70
第4章 考察	79
4.1 結果と考察	79
4.2 今後の展開	81
付録	82
Laurdanの染色条件	82
BSAの問題	94
謝辞	99
参考文献	100

論文内容要旨

「背景と目的」

PC12D細胞は、Nerve Growth Factor (NGF) によって神経突起を伸ばし、さらには各種の性質を変化させ神経類似の細胞へと分化する。このNGFの効果は、交換神経節の細胞と同様であり、交換神経節の細胞は、NGFによって神経突起を伸ばし、神経細胞へと分化する。このためPC12D細胞は、神経細胞の突起伸長及び細胞分化のメカニズムを研究する上で広く用いられている。NGFによって細胞の性質がダイナミックに変化する時のタンパク質の発現や分布の変化については盛んに研究されている。しかし、生化学的な測定から脂質の代謝や組成の変化も報告されているが、活動している細胞の膜への影響についてはよく分かっていない。本研究では、構造が大きく変化する突起伸長部位の膜に特に注目した。細胞は、脂質2分子膜によって細胞の外から隔たれ、さらに細胞内には複雑な膜系が存在する。これまで生体膜（細胞の膜の総称）は、構成分子が自由に拡散できる2次元液体であると考えられてきた。しかし1990年代後半になると、特定のタンパク質や脂質、コレステロールが集積した膜ドメイン (raft) の存在が示唆され、現在では生体膜は、raftが拡散、集合している流動的に不均一な構造であると考えられつつある。このraftの重要な点は、周囲と異なる性質のために特定のタンパク質、特にシグナル伝達に関与する分子がraftに集積することである。NGFシグナル伝達に関与する分子も集積しているため、私は、raftの分布は突起の伸長部位と相関があるのではないかと予想した。しかし、これまでのところraftに関する報告は、細胞をすり潰して調べる生化学的なアプローチが主なものである。活動している細胞では、空間精度数nmの特殊な測定方法によって初めてその存在は確認されたが、raftの分布や寿命といった動態に関する報告はまだ少ないのが現状である。しかも光学顕微鏡でも観察できるサイズのraftに関する報告もあり、その実体にはまだ不明な点が多い。そこで、本研究では顕微鏡を用いた膜流動性の空間分布を画像化する測定方法で、周囲と膜流動性の異なるraftの可視化を試みた。そしてこの測定方法で、PC12D細胞のNGFによる突起伸長過程の経時観察を行なった。

「実験方法」

膜流動性の測定には、環境感受性色素laurdanを用いた。Laurdanは、励起状態で大きな双極子モーメントを持つことを期待されて合成された。このため周囲に極性分子が存在すると極性分子の再配向が起こり、発光スペクトルが長波長側にシフトする（溶媒緩和）。Laurdanは、長い炭化水素鎖をもつために脂質膜中では疎水性領域に入り込んでいる。このため脂質のゲル-液晶相転移による膜内の極性度の変化に応じて発光スペクトルのピークが440nmから490nmへシフトする。この時、465nm付近に等発光点が存在することから、Laurdanの発光に関する励起状態は2つしかないと考えられている。つまり440nmと490nmの蛍光強度の比でこのスペクトルの変化を表現することが可能である。このことからParasassiらは、Generalized Polarization[$GP = \{I(440) - I(490)\} / \{I(440) + I(490)\}$]というパラメータを定義した。GP値は、440nmと490nmの蛍光強度（ $I(440)$, $I(490)$ ）を使って計算される。GP値は、ゲル相では温度に依らずほぼ一定の値（0.6）をとり、相転移温度で急激に低下し、液晶相では温度に依存して-0.3まで低下する。また液晶相の脂質膜にコレステロールを添加することでもGP値は0~0.6まで変化する。脂質膜の相状態やコレステロール濃度は膜流動性を決定する因子のため、GP値は膜流動性のよい指標となる。Laurdanを細胞に導入し、顕微鏡下で440nmと490nmの蛍光画像を取得し、画像演算によって顕微鏡の空間分解能レベルの領域の膜流動性を画像として得ることができる。

「結果と考察」

顕微鏡下でPC12D細胞にNGFを加えて経時観察した結果、細胞の縁では、複数の膜流動性の低い領域が移動と合併を繰り返し、この領域から突起が伸びることが観察された。NGFを加えなかった場合でも細胞の縁に膜流動性の低い領域が存在するが、移動は観察されず、また突起伸長も起こらなかった。また伸長後は、突起先端に細胞全体で最も膜流動性の低い領域が局在するのが観察された。さらに突起中間部には膜流動性の低い突出構造が存在するのも観察された。この突出構造は、細胞体から突起先端へ、又はその逆の方向へ移動していた。次にraftの構成成分の一つであるGM1をCholera toxin B subunit-Alexa555(CTB)で染色し、さらにlaurdanと2重染色を行なった。その結果、突起先端や突起中間部の突出構造はCTBで強く染色され、その大部分は突起での膜流動性の低い領域と一致した。またコレステロールを除く薬剤であるmethyl- β -cyclodextrinでraftを破壊すると、突起の膜流動性の低い領域は消失することが観察された。以上の結果をまとめるとCTBの染色結果からPC12D細胞の突起先端には、raftの集積地が存在することが初めて示唆された。このraftの集積地と突起の膜流動性の低い領域との相関から、細胞の縁や突起の膜流動性の低い領域はraftの集積度を反映していると考えられる。これまでraftの動態については、実験的な制約のためほとんど分かっていなかった。しかし本研究で、活動している細胞ではraftは盛んに動いており、しかも突起の伸長部位と相関があることが初めて明らかになった。このことからPC12D細胞は、raftに膜流動性の低い性質を利用してNGFシグナル伝達に必要な物質を留め、さらにraftを特定の部位に集積させることで、シグナル伝達の効率化と突起の伸長部位の決定を行なっていることが考えられる。さらに突起先端にraftを輸送することで、神経突起の伸長能力を維持していると考えられる。今後、突起の伸長部位や方向を実験的にコントロールすることで、raftの集積度と突起の長さの相関を定量的に解析し、突起伸長におけるraftの関与について定量的な理解が得られることと思われる。また他の細胞で報告されているraftの関与した現象、例えば神経細胞でのシナプス形成におけるraftの関与など様々な現象への応用が考えられる。

論文審査の結果の要旨

生命の基本単位である細胞は脂質二重層に蛋白質が組み込まれた生体膜で構築されている。最近、細胞の外周である形質膜上にスフィンゴ脂質とコレステロールが集積し、特定の蛋白質が存在することで部位特異的な機能を担う膜ドメインとしてラフト (raft) の存在が示されている。ラフトはその脂質構成から特別な膜構造 (liquid-ordered phase) を取ると考えられている。また、PC12D 細胞は、Nerve Growth Factor (NGF) によって神経突起を伸ばし、回路網の形成にまで至るので、神経細胞の突起伸長機構の研究に広く用いられている。そこで本研究では、ラフトの部位特異的な機能に注目し、その分布が神経突起の伸長場所とどのように相関するかを解明することを目的とした。

実験方法は、環境感受性色素Laurdanの特性を利用した顕微鏡イメージング法である。Laurdanは環境の極性によりその発光波長がシフトする性質をもち、脂質膜のゲル相では440nmにピークを持つが、流動相では490nmにシフトする。この変化を数値化したGeneralized polarization (GP) を用いることにより、周囲と膜流動性の異なるラフトの可視化に成功した。この方法をPC12D 細胞に適用した結果、NGFによる突起伸長過程の経時観察に成功した。その結果、細胞の縁では、複数の膜流動性の低い領域が移動と合併を繰り返し、この領域から突起が伸びていた。伸長後は、突起先端に最も膜流動性の低い領域が局在していた。さらに、突起中間部を膜流動性の低い領域が、根本から先端へあるいはその逆方向へ、移動しているのが観察された。次にラフトのマーカであるコレラトキシン(CTB) とLaurdan で2重染色をすると、突起先端にはCTB で強く染色される場所が観察され、突起での膜流動性の低い領域と相関があった。また、ラフトを破壊する薬剤で処理すると、突起の膜流動性の低い領域は消失することが観察された。これらの結果はPC12D 細胞の突起先端にラフトの集積地が存在することを示唆している。

以上の成果は、本人が自立して研究活動を行うに必要な研究能力と学識を有していることを示している。よって、木内泰提出の博士論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。