

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08167

研究課題名(和文)細胞膜脂質二重層の内層で見られる脂質集合体の挙動と相関についての電子顕微鏡解析

研究課題名(英文) Electron microscopic analysis of lipid clusters in the inner leaflet of plasma membrane

研究代表者

村手 源英 (Murate, Motohide)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：30311369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜を構成する脂質二重層の内外層間での脂質分布を明らかにするため、内外層を分離し、そこに分布する脂質を標識して調べた。材料は、ショウジョウバエの培養細胞および内外層の脂質分布の維持に関わると考えられるタンパク質の欠損変異体を利用した。その結果、ヒト細胞ではほぼ内層に限定して分布しているホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリンが外層にもかなり分布していること、外層の脂質を内層に移動させるフリッパーゼの欠損変異体でホスファチジルセリンがより外層に多く分布していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により明らかにされたショウジョウバエ細胞における細胞膜脂質二重層の内外層における脂質の対称分布は、これまで哺乳類細胞を用いて解析され、また認識されてきた非対称分布とは大きく異なり、細胞膜の脂質分布の多様性を示すと同時に、細胞膜研究に対する新たな認識を提供することができた。また、脂質の分布に影響を及ぼすと考えられている酵素を欠損させても、すべての脂質の分布に影響を及ぼすわけではないことを明らかにし、脂質分布の形成と維持の機構に関する知見を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：We examined transbilayer distribution of phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS) in the plasma membrane of normal and lipid transfer protein-depleted *Drosophila* cells by freeze-fracture replica immunoelectron microscopy. Our results indicate that both lipids were considerably localized in the outer leaflet, in addition to the inner leaflet of normal cell plasma membranes, whereas they distributed almost restrictedly in the inner leaflet of mammalian cell plasma membranes as reported by our previous studies. This remarkable distribution of PS in the plasma membranes was disturbed in flippase-depleted cells, but it was not affected in scramblase-depleted cells. Furthermore, the depletion of neither scramblase nor flippase influenced the transbilayer distribution of PE. These results suggest that the mechanism of formation and maintenance of lipid distribution between two leaflets is different in each species.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞膜 脂質二重層 ホスファチジルセリン ホスファチジルエタノールアミン 免疫電子顕微鏡法
ショウジョウバエ ス克蘭ブラーゼ フリッパーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜における膜脂質の役割を解明することを目的として、ヒト培養細胞や血液細胞の細胞膜を構成する多種類の脂質の分布状態を二重層の内外層を別々に解析することで明らかにしてきた。その結果、脂質二重層の内層と外層それぞれで異なる脂質が非対称に分配し、異なるドメインを作っている事が明らかとなった。

2. 研究の目的

以下の2つを目的とした。

- (1) 細胞の種類によって脂質の局在が変化を示すかどうかについて明らかにする。
- (2) 脂質の局在に影響を及ぼすと考えられている酵素が、実際に細胞膜の脂質分布にどのような役割を果たしているかについて明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ショウジョウバエの培養細胞を材料にして、細胞膜におけるホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルセリンの分布を SDS 処理凍結割断レプリカ免疫電子顕微鏡法で解析し、これまでに得られたヒト由来の培養細胞や血球細胞の結果と比較した。
- (2) ショウジョウバエの培養細胞で脂質転移酵素の欠損変異体を材料にして、細胞膜におけるホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルセリンの分布を、(1)と同様に SDS 処理凍結割断レプリカ法により解析した。

4. 研究成果

- (1) ショウジョウバエの培養細胞の細胞膜においては、ヒト細胞の細胞膜でほぼ内層にのみ分布しているホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリンが、外層にも相当程度分布していた。先行研究において、ショウジョウバエのスフィンゴ脂質であるセラミドホスホエタノールアミンが、同じ細胞の細胞膜でほぼ外層に限定して分布していることを明らかにしている。すなわち、すべての脂質が内外層両方ともに分布しているわけではないことを意味しており、細胞膜における脂質分布の制御の複雑さを示唆するものである。また、ヒト細胞においてはホスファチジルセリンの内層から外層への転移は死細胞の目印として用いられるなど、細胞にとって重要な役割を果たしていることが知られている。そのため、これまで細胞膜脂質の分布は同様であると考えられてきたが、種によって異なっていることが本研究により明らかとなった。
- (2) 外層の脂質を内層に転移させるフリッパーゼの欠損変異体の細胞膜において、ホスファチジルセリンが内層に多く局在することが示されたが、ホスファチジルエタノールアミンの分布に大きな変化は見られなかった。また、内外層の脂質を非特異的にそれぞれ反対方向に転移させるスクランブラーゼの欠損変異体の細胞膜では、どちらの脂質の内外層における分布もコントロールの細胞と大差がなかった。これらの結果から、脂質転移酵素と基質となる脂質には、これまで考えられていた以上に厳密な対応関係があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11件)

- (1) Inaba T., Murate M., Tomishige N., Lee Y. F., Hullin-Matsuda F., Pollet B., Humbert N., Mély Y., Sako Y., Greimel P., Kobayashi T. (2019). *equally contributed. Formation of tubules and helical ribbons by ceramide phosphoethanolamine-containing membranes. *Sci. Rep.* 9, 5812. (査読あり) DOI: 10.1038/s41598-019-42247-1
- (2) Hullin-Matsuda F., Murate M. and Kobayashi T. (2018). Protein probes to visualize sphingomyelin and ceramide phosphoethanolamine. *Chem. Phys. Lipids* 216, 132-141. (査読あり) DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2018.09.002
- (3) Makino A., Hullin-Matsuda F., Murate M., Abe M., Tomishige N., Fukuda M., Yamashita S., Vidal H., Lagarde M., Delton I. and Kobayashi T. (2016). Acute accumulation of free cholesterol induces the degradation of perilipin 2 and Rab18-dependent fusion of ER and lipid droplets in cultured human hepatocytes. *Mol. Biol. Cell* 27, 3293-3304. (査読あり) DOI: 10.1091/mbc.E15-10-0730
- (4) Hullin-Matsuda F., Makino A., Murate M. and Kobayashi T. (2016). Probing phosphoethanolamine-containing lipids in membranes with duramycin/cinnamycin and aegerolysin proteins. *Biochimie* 130, 81-90. (査読あり) DOI: 10.1016/j.biochi.2016.09.020
- (5) Makino A. *, Abe M. *, Ishitsuka R. *, Murate M. *, Kishimoto T. *, et al. (32人中4番目) (2016). *equally contributed. A novel sphingomyelin/cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of

the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C. *FASEB J.* 31, 1301-1322. (査読あり) DOI: 10.1096/fj.201500075R

(6) Murate M., and Kobayashi T. (2016). Revisiting transbilayer distribution of lipids in the plasma membrane. *Chem. Phys. Lipids* 194, 58-71. (査読あり) DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2015.08.009

(7) Inaba T.*, Kishimoto T.*, Murate M.*, Tajima T.*, Sakai S., Abe M., Makino A., Tomishige N., Ishitsuka R., Ikeda Y., Takeoka S., and Kobayashi T. (2016). *equally contributed. Phospholipase Cβ1 induces membrane tubulation and is involved in caveolae formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 7834-7839. (査読あり) DOI: 10.1073/pnas.1603513113

(8) Wakana Y., Kotake R., Oyama N., Murate M., Kobayashi T., Arasaki K., Inoue H., and Tagaya M. (2015). CARTS biogenesis requires VAP-lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *Mol. Biol. Cell* 26, 4686-4699. (査読あり) DOI: 10.1091/mbc.E15-08-0599

(9) Bhat H. B., Ishitsuka R., Inaba T., Murate M., et al. (21人中4番目) (2015). Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *FASEB J.* 29, 3920-3934. (査読あり) DOI: 10.1096/fj.15-272112

(10) Murate M., Abe M., Kasahara K., Iwabuchi K., Umeda M., and Kobayashi T. (2015). Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J. Cell Sci.* 128, 1627-1638. (査読あり) DOI: 10.1242/jcs.163105

(11) Makino A., Abe M., Murate M., Inaba T., Yilmaz N., Hullin-Matsuda F., Kishimoto T., Schieber N. L., Taguchi T., Arai H., Anderlueh G., Parton R. G., and Kobayashi T. (2015). Visualization of the heterogeneous membrane distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity and sphingolipidosis. *FASEB J.* 29, 477-493. (査読あり) DOI: 10.1096/fj.13-247585

[学会発表] (計 19 件)

(1) Kobayashi T., Inaba T., Kishimoto T., Murate M., Tajima T., Abe M., Makino A., Tomishige N., Takeoka S. (2018). Phospholipase C beta 1 induces membrane tubulation and is involved in caveolae formation. 第 91 回日本生化学会大会 .

(2) Murate M. (2017). Transbilayer distribution of lipids in the plasma membrane revealed by immunoelectron microscopy. University of Strasbourg-RIKEN Workshop on Membrane Lipidology.

(3) Murate M. (2016). Transbilayer distribution of lipids in the plasma membrane revealed by immuno-electron microscopy. 第 57 回 International Conference on the Bioscience of Lipids.

(4) Inaba T., Kishimoto T., Murate M., Tajima T., Sakai S., Abe M., Makino A., Tomishige N., Ishitsuka R., Ikeda Y., Takeoka S., and Kobayashi T. (2016). Phospholipase C beta 1 induces membrane tubulation and is involved in caveolae formation. 第 57 回 International Conference on the Bioscience of Lipids.

(5) 村手源英, 阿部充宏, 笠原浩二, 岩渕和久, 梅田真郷, 小林俊秀 . (2015). 細胞膜の脂質二重層を構成する各種の脂質が示す非対称分布とその破綻 . 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会 .

(6) Makino A., Abe M., Murate M., Inaba T., Hullin-Matsuda F., Kishimoto T., Taguchi T., Arai H., Kobayashi T. (2015). Visualization of the heterogenous membrane distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity and sphingolipidosis. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会 .

(7) 塩見晃史, 長尾耕治郎, 村手源英, 小林俊秀, 梅田真郷 . (2015). ショウジョウバエ細胞の特異なリン脂質膜の形成機構の解析 . 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会 .

(8) Murate M., Abe M., Kasahara K., Iwabuchi K., Umeda M., and Kobayashi T. (2015). Transbilayer lipid distribution in the plasma membrane at nano scale. 第 11 回 GERLI Lipidomics Meeting.

(9) Kobayashi T., Makino A., Abe M., Ishitsuka R., Inaba T., Yilmaz N., Hullin-Matsuda F., Murate M. (2015). Imaging lipids and lipid domains. 第 11 回 GERLI Lipidomics Meeting.

(10) 稲葉岳彦, 村手源英, Yan-Fen Lee, Françoise Hullin-Matsuda, Peter Greimel, 小林俊秀. (2015).

Microstructural polymorphism of ceramide phosphoethanolamine. 第 53 回日本生物物理学会年会 .

(11) Murate M., Abe M., Kasahara K., Iwabuchi K., Umeda M., Kobayashi T. (2015). Transbilayer and lateral distribution of lipids in the plasma membrane at nano scale. 第 10 回スフィンゴセラピー研究会 .

(12) 山路顕子, 稲葉岳彦, 村手源英, 堂前直, 佐藤真之, 西堀耕三, 藤森文啓, 小林俊秀. (2015). 特異なコレステロールを認識する新規な脂質解析プローブの作製. 第 67 回日本細胞生物学会年会 .

(13) 牧野麻美, 阿部充宏, 村手源英, 稲葉岳彦, Neval Yilmaz, 小林俊秀. (2015). 異なったスフィンゴミエリンの分布状態の可視化 . 第 67 回日本細胞生物学会年会 .

(14) 村手源英, 阿部充宏, 笠原浩二, 岩渕和久, 梅田真郷, 小林俊秀. (2015). 細胞膜の脂質二重層を構成する様々な脂質が示す非対称分布の電子顕微鏡レベルでの解析. 第 67 回日本細胞生物学会年会 .

(15) 稲葉岳彦, 岸本拓磨, 田島拓也, 牧野麻美, 阿部充宏, 村手源英, 石塚玲子, 池田康夫, 武岡真司, 小林俊秀. (2015). リポソームの暗視野顕微鏡観察による脂質膜変形因子の探索 . 第 67 回日本細胞生物学会年会 .

(16) 長尾耕治郎, 塩見晃史, 原雄二, 村手源英, 小林俊秀, 梅田真郷. (2015). ショウジョウバエ細胞の特徴的なリン脂質膜構築機構の解析 . 第 57 回日本脂質生化学会年会 .

(17) 牧野麻美, 阿部充宏, 村手源英, 稲葉岳彦, 小林俊秀. (2015). 異なったスフィンゴミエリンの分布状態の可視化 . 第 57 回日本脂質生化学会年会 .

(18) 村手源英, 阿部充宏, 岩渕和久, 梅田真郷, 小林俊秀. (2015). 細胞膜の内外層における構成脂質のナノメートルレベルでの局在解析 . 第 57 回日本脂質生化学会年会 .

(19) Murate M., Abe M., Umeda M., and Kobayashi T. (2015). Transbilayer lipid distribution in nano scale. Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology in 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://lipidology.riken.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。