

令和 4 年 4 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03227

研究課題名(和文)細胞膜構造の形成に関わる脂質の機能と細胞内輸送に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the functions and intracellular transport mechanisms of lipids involved in the formation of cell membrane structure

研究代表者

池ノ内 順一 (Ikenouchi, Junichi)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：10500051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、上皮細胞の細胞膜構造形成に関わる脂質、スフィンゴミエリンの細胞内輸送を制御する分子機構の解明に関する内容である。スフィンゴミエリンに特異的に結合するシマミズ由来タンパク質であるLyseninを改変して、アピカル膜へのスフィンゴミエリンの輸送過程を可視化するためのプローブを作成した。このプローブを安定発現する細胞に対して、阻害剤ライブラリーのスクリーニングを行った結果、mTORC2経路がスフィンゴミエリンの細胞内輸送過程を制御することを見出した。さらにmTORC2経路の下流において低分子量Gタンパク質Rab35が活性化し、スフィンゴミエリンの輸送を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTORC2シグナル伝達経路は、細胞の増殖や細胞の運動に関わるシグナル伝達経路で、最近では、がん細胞の悪性化との関連が示唆されています。本研究によって、mTORC2シグナル伝達経路は、細胞膜脂質のスフィンゴミエリンの輸送を制御するという新たな役割を担っていることが明らかになりました。この発見は、上皮細胞に由来する様々な疾患に対する新たな治療法を開発する上で基礎となる知見です。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I elucidated the molecular mechanism that controls the intracellular transport of sphingomyelin, a lipid involved in the formation of membrane structures of epithelial cells. Lysenin, a protein derived from *Eisenia fetida* that specifically binds to sphingomyelin, was modified to create a probe for visualizing the process of transport of sphingomyelin to the apical membrane. We performed the inhibitor library screening on cells that stably express this probe. We revealed that the mTORC2 pathway regulates the intracellular transport process of sphingomyelin. Furthermore, we found that the small G protein Rab35 is activated in the downstream of the mTORC2 pathway and regulates the transport of sphingomyelin to the apical membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：スフィンゴミエリン アピカル膜 上皮細胞 微絨毛 mTORC2シグナル Rab35 低浸透圧ストレス 細胞死

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体膜を構成する脂質分子は数千種類に及び、生体膜を構成する脂質の中でも、スフィンゴミエリンはユニークな性質を持つと考えられている。生体膜に含まれるリン脂質のうち、スフィンゴミエリンは炭素数 20 以上かつ二重結合を含まない長鎖飽和脂肪酸を有しており、脂肪酸鎖間において高いファンデルワールス力が働く。さらに、スフィンゴミエリンのセラミド骨格内のアミド結合と、コレステロールのヒドロキシル基の間で水素結合が生じる。これらの分子間相互作用により、人工脂質二重膜を用いた実験では、スフィンゴミエリンはコレステロールと共に、他のリン脂質によって形成される膜領域よりも、秩序だったマイクロスケールサイズの大きな膜ドメインを形成する。一方で、生体膜においてはこのような大きな膜ドメインの形成は認められず、生体膜におけるスフィンゴミエリンの存在量を厳密に制御する分子機構が存在すると考えられる。

一方、上皮細胞には、外界からの栄養吸収を担う細胞膜の突起構造である微絨毛や上皮細胞同士の機械的結合や情報伝達の間として機能する細胞接着装置などの細胞膜構造が存在する。近年、これらの細胞膜構造を構成する膜タンパク質の同定が進んだものの、膜タンパク質が集合して膜構造の形成に至る過程はほとんど明らかになっていない。

私たちは、これまでの研究において、微絨毛や細胞接着構造の膜タンパク質の集合・離散の制御に細胞膜脂質のスフィンゴミエリンやコレステロールが重要な役割を果たしていることを見出した (Ikenouchi et al. J Cell Sci 2013, Shigetomi et al. J Cell Biol 2018)。しかしながら、スフィンゴミエリンやコレステロールの細胞内輸送の制御機構や局在化機構については殆ど明らかになっていない。そこで、本研究課題において私は、スフィンゴミエリンの輸送や局在の制御を規定する分子機構の解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

上述のような背景を踏まえて、上皮細胞の細胞膜構造の形成に重要なスフィンゴミエリンの輸送制御メカニズムの解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

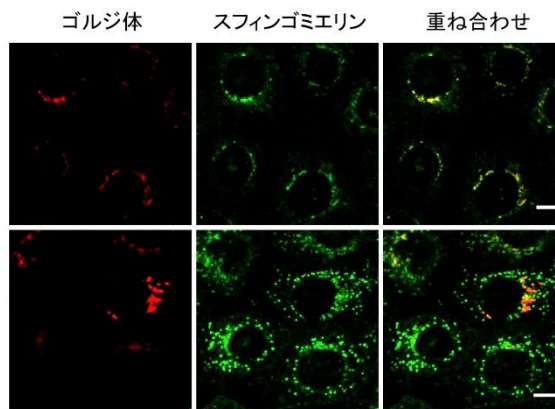
本研究において、スフィンゴミエリンの形質膜への輸送の制御機構を明らかにするために、まず上皮細胞におけるスフィンゴミエリンの細胞内の輸送過程を可視化することを試みた。スフィンゴミエリンに特異的に結合することが報告されている、シマミミズ *Eisenia foetida* の体腔液由来タンパク質である Lysenin (Lys) に、分泌タンパク質のシグナル配列 (SS) 及び緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させたキメラタンパク質 (SS-GFP-Lys) を考案し、このコンストラクトを安定発現する上皮細胞を樹立した。この細胞を用いて、アピカル膜へのスフィンゴミエリンの輸送がどのように制御されているかを調べた。

4. 研究成果

SS-GFP-Lys を安定発現する上皮細胞を、共焦点顕微鏡を用いてライブイメージング観察を行うと、スフィンゴミエリンの生合成が開始される Golgi 体に SS-GFP-Lys が集積する様子が観察された。さらに Golgi 体から出芽する輸送小胞においては、アピカル膜に局在する膜タンパク質を含む輸送小胞に SS-GFP-Lys が含まれることを見出した。このことから、Golgi 体からアピカル膜への輸送小胞の形成の際にスフィンゴミエリンを含む輸送小胞が形成されることが明らかになった。

次に、スフィンゴミエリンの形質膜への輸送を制御する分子機構を明らかにする目的で、SS-GFP-Lys を安定発現する上皮細胞に対して、スフィンゴミエリンの輸送に影響を及ぼす化合物のライブラリースクリーニングを行った。細胞内にスフィンゴミエリンの輸送小胞の蓄積をもたらす化合物として、Torin-1 と Ku-0063794 を同定した。これらの化合物はいずれも mammalian target of rapamycin (mTOR) に対する阻害剤であることから、mTOR complex (mTORC) 経路がスフィンゴミエリンの輸送に関与することが示唆された。mTORC は mTOR キナーゼ以外の構成タンパク質群の違いによって mTORC1 と mTORC2 の 2 種類存在することが報告されている。そこで、各 mTOR 複合体のキナーゼ活性に必須の足場タンパク質である Raptor (mTORC1) と Rictor (mTORC2) をそれぞれノックダウンした細胞を樹立した。Rictor ノックダウン (Rictor KD) 細胞のみ、mTOR に対する阻害剤で処理した細胞と同様の表現型を示したことから、mTORC2 経路がスフィンゴミエリンの細胞内輸送過程を制御すると結論した。Rictor KD 細胞において、アピカル膜へのスフィンゴミエリンの輸送が障害された結果、アピカル膜のスフィンゴミエリン量が減少し、アピカル膜の微絨毛が消失していることを見出した。

さらに、イヌ腎臓尿管上皮細胞 MDCK 細胞の 3 次元培養を用いて、mTOR 経路がアピカル膜形成に与える影響を検討した。スフィンゴミエリンの生合成阻害剤もしくは mTOR 阻害剤を添加した条件で培養を行うと、いずれの場合も、アピカル膜の形成と管腔の融合が障害され、複数の管腔を有する異常な管腔構造を示すことが明らかになった。このような表現型は、先行研究において低分子量 G タンパク質 Rab35 のノックアウト細胞の表現型とよく一致していたことから、Rab35 が mTORC2 経路の下流でスフィンゴミエリンの輸送を制御するのではないかと考え、その可能性を検証した。Rab35 の恒常活性化型を過剰発現は mTORC2 経路の阻害によるスフィンゴミエリンを含む輸送小胞の蓄積を解消することを見出した。また逆に Rab35 の恒常不活性化型を過剰発現した細胞においては、スフィンゴミエリンの輸送小胞が細胞内に蓄積する様子が観察された。このことから、mTORC2 経路の下流において Rab35 が活性化することが示唆された。



SS-GFP-Lys によって、上皮細胞におけるスフィンゴミエリンの輸送過程を可視化することに成功した。この細胞を用いることにより、mTORC2 シグナル伝達経路の活性化がアピカル膜への輸送に必要であることが明らかになった。

最後に、mTORC2 経路によって制御されるスフィンゴミエリンのアピカル膜への輸送機構の生理的な役割について検討を行った。上皮細胞は体表や臓器の表面に位置し、様々な浸透圧溶液に曝されている。消化管上皮細胞においては、アピカル膜側の管腔を流れる唾液 (30 mOsm/L) や真水などの極めて浸透圧の低い溶液に曝されている。このような低浸透圧溶液に曝された上皮細胞において、1 分以内に急速にアピカル膜のみが選択的に拡大するという現象を見出した。その意義として、アピカル膜が拡大することによって細胞の容積を増加し、水分子の流入による膨圧を和らげて、細胞膜の破裂による細胞死を回避していると考えた。低浸透圧溶液の負荷に対するアピカル膜の選択的な拡大において、アピカル膜を構成するスフィンゴミエリンの輸送が重要な役割を果たしているのではないかと考えて、アピカル膜へのスフィンゴミエリンの輸送が障害される Rictor KD 細胞並びに Rab35 KO 細胞を低浸透圧溶液に曝したところ、野生型細胞と比較して、形質膜の破裂を伴う細胞死が有意に増加した。さらに、Rictor KD 細胞に Rab35 の恒常活性化型を発現させると、低浸透圧ストレスによる形質膜の破裂が抑制された。このことから、mTORC2 経路の下流において Rab35 の活性化が、上皮細胞の低浸透圧ストレス応答に必須であることが示唆された。上皮細胞を低浸透圧溶液に曝した際に、アピカル膜のアクチン皮質が著しく減少する一方で、基底側膜のアクチン皮質はほとんど変化しないことから、mTORC2-Rab35 経路はアピカル膜のアクチン皮質の選択的な分解を促進している可能性が示唆された。そこで mTORC2-Rab35 経路の下流で働くアクチン皮質の制御に関わる因子を探索したところ、アクチン重合に必要な細胞膜脂質である phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) が低浸透圧ストレスによって急激な減少することを見出した。解析の結果、mTORC2-Rab35 経路の下流で、PI(4,5)P2 の分解酵素が活性化し、アピカル膜のアクチン皮質が減少することで、スフィンゴミエリンを含むアピカル膜への輸送小胞と形質膜の融合が促進されることが明らかになった。

以上のことから、本研究によって上皮細胞のスフィンゴミエリンの輸送に関わる分子機構として、mTORC2-Rab35 経路を同定した。また、mTORC2-Rab35 経路を阻害すると、アピカル膜のスフィンゴミエリンが減少し、微絨毛が形成されなくなることを見出した。さらに、この経路を介したスフィンゴミエリンの輸送の促進は、上皮細胞が低浸透圧ストレスに対する細胞死を回避する上で必須であることを見出した。今後は、mTORC2-Rab35 経路の更に詳細な制御メカニズムを明らかにすることによって、形質膜のスフィンゴミエリン量を感じ取るメカニズムや、微絨毛の形成を制御する分子機構の解明に迫りたい。

参考文献

mTORC2 suppresses cell death induced by hypo-osmotic stress by promoting sphingomyelin transport. Ono Y, Matsuzawa K, Ikenouchi J. *J Cell Biol* (2022)
 Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition. Shigetomi K, Ono Y, Inai T, Ikenouchi J. *J Cell Biol* (2018)
 Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli. Ikenouchi J, Hirata M, Yonemura S, Umeda M. *J Cell Sci* (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kana Aoki, Shota Harada, Keita Kawaji, Kenji Matsuzawa, Seiichi Uchida, Junichi Ikenouchi	4. 巻 12
2. 論文標題 STIM-Orai1 signaling regulates fluidity of cytoplasm during membrane blebbing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-20826-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kenji Matsuzawa, Hayato Ohga, Kenta Shigetomi, Tomohiro Shiiya, Masanori Hirashima, Junichi Ikenouchi	4. 巻 4
2. 論文標題 MAGIs regulate aPKC to enable balanced distribution of intercellular tension for epithelial sheet homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol .	6. 最初と最後の頁 337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01874-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shigetomi K, Ikenouchi J	4. 巻 41
2. 論文標題 Cell Adhesion Structures in Epithelial Cells Are Formed in Dynamic and Cooperative Ways.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioessays.	6. 最初と最後の頁 e1800227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bies.201800227.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoki K, Satoi S, Harada S, Uchida S, Iwasa Y, Ikenouchi J	4. 巻 31
2. 論文標題 Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Biol Cell.	6. 最初と最後の頁 833-844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E19-12-0691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Y, Matsuzawa K, Ikenouchi J	4. 巻 221
2. 論文標題 mTORC2 suppresses cell death induced by hypo-osmotic stress by promoting sphingomyelin transport	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cell Biol	6. 最初と最後の頁 e202106160.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202106160.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cho Y, Haraguchi D, Shigetomi K, Matsuzawa K, Uchida S, Ikenouchi J.	4. 巻 221
2. 論文標題 Tricellulin secures the epithelial barrier at tricellular junctions by interacting with actomyosin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cell Biol	6. 最初と最後の頁 e202009037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202009037.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 池ノ内順一
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying dynamic behavior of membrane blebbing
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池ノ内順一
2. 発表標題 Reciprocal regulation of Adherens Junction and Tight Junction during the assembly of apical adhesion complex
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池ノ内順一
2. 発表標題 プレブの動的な振る舞いを制御する分子機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junichi Ikenouchi
2. 発表標題 Reciprocal Regulation of AJ and TJ During the Assembly of Apical Adhesion Complex
3. 学会等名 Gordon Research Conference "Cell Contact and Adhesion"（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 由美子、池ノ内 順一
2. 発表標題 上皮細胞において mTORC2経路はアピカル膜へのスフィンゴミエリンの輸送を促進することで低浸透圧による細胞死を抑制する
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junichi Ikenouchi
2. 発表標題 Roles of membrane lipids in tight junction formation
3. 学会等名 4th International TJ Conference 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junichi Ikenouchi
2. 発表標題 Roles of membrane lipids in tight junction formation
3. 学会等名 第51回 生理研国際シンポジウム Frontiers in Epithelial Cell Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学理学部生物学科代謝生理学研究室ホームページ http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------