

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16080

研究課題名(和文)上皮細胞の個性決定における細胞膜リン脂質の役割解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of cell membrane phospholipids in determining the characteristics of epithelial cells

研究代表者

金丸 佳織 (Kanemaru, Kaori)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・助教

研究者番号：40838637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞間接着タンパク質が細胞膜リン脂質ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PI(4,5)P2)の近傍に存在することと、PI(4,5)P2が上皮細胞特有の細胞間接着タンパク質の局在を制御することを明らかにした。このことから、PI(4,5)P2は細胞間接着タンパク質と協働して上皮性決定に寄与することが示唆された。さらに細胞膜のPI(4,5)P2を増加させることで非上皮細胞が部分的に上皮細胞様の性質を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において細胞膜リン脂質が上皮性の維持や決定に関与することや、その分子機構の一端を明らかにした。上皮性決定におけるタンパク質の役割については理解が進んでいる一方、上皮性決定における細胞膜リン脂質の役割はほとんど明らかになっていない。そのため本研究の成果は上皮性を決める仕組みについての理解を深めることに貢献し得るものである。また上皮性の喪失は癌をはじめとした多くの疾患に関与するため、本研究の成果は上皮性の喪失が関連する疾患の理解を深めることにも繋がるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified epithelial junctional proteins as PI(4,5)P2 proximal proteins. We also found that PI(4,5)P2 regulates the localization of epithelial junctional proteins. These results suggest that PI(4,5)P2 contributes to epithelial characterization through epithelial junctional proteins. Furthermore, we found that the elevation of plasma membrane PI(4,5)P2 level causes non-epithelial cells to show partial epithelial cell-like properties.

研究分野：脂質生化学

キーワード：細胞膜リン脂質 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする多細胞生物は、多種多様な細胞により構成されており、各々の細胞は特有の性質を有している。各々の細胞が特有の性質を持つことは組織の恒常性維持において重要であり、その乱れは様々な疾患の原因となる。上皮細胞は動物の体内外の表面を覆っている組織である上皮組織を構成する細胞であり、種々の細胞間接着タンパク質により隣り合う細胞が密着し、高度に極性化しており、組織内に整然と配置されるという特徴を有する。一方で、間葉細胞は細胞同士が結合することなく、高い運動性を示す。

上皮細胞特有の性質(上皮性)の決定には接着結合や密着結合を構成するタンパク質が重要な役割を果たしていることが知られている。一方で、上皮性決定における細胞膜脂質の役割はほとんど明らかになっていない。

上皮細胞ではイノシトールリン脂質が形質膜において極性を持って分布していることが知られており、アピカル膜にはホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PI(4,5)P₂)が多く、バソラテラル膜にはホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸が多く存在している。申請者らは現在まで、PI(4,5)P₂を代謝し、セカンドメッセンジャーを産生する酵素、ホスホリパーゼ C (PLC) δ1 が皮膚の表皮に多く存在しており、表皮特異的に PLCδ1 を欠損させた際に皮膚炎や表皮バリア機能異常が起きることを報告してきた。PLC δ1 欠損時に見られる異常の原因について、セカンドメッセンジャー産生不全に着目した解析は行ってきたものの、PLC の基質である形質膜 PI(4,5)P₂に着目した解析は行っていなかった。そこで、PLC δ1 欠損マウスの皮膚において形質膜 PI(4,5)P₂量に変化が見られるのかを検討した。その結果、PLC δ1 欠損により表皮の形質膜 PI(4,5)P₂量に大きな変化は見られなかったが、この実験の過程で、皮膚組織中の上皮細胞では非上皮細胞と比べ、形質膜 PI(4,5)P₂の免疫染色シグナル強度が強いことが判明した。さらに培養細胞を用い PI(4,5)P₂量の比較を行った結果、上皮細胞では非上皮細胞と比べ PI(4,5)P₂量が多いことも明らかになった。加えて、形質膜標的化 PI(4,5)P₂分解酵素や形質膜標的化 PI(4,5)P₂合成酵素を発現させることにより、形質膜の PI(4,5)P₂量を変動させたところ、上皮性の獲得や喪失がおきることが示唆された。これらの予備的な結果は、形質膜に多くの PI(4,5)P₂を持つことが上皮性を決定する要因の一つであることを強く示唆するものである。しかしながら形質膜の PI(4,5)P₂がどのようにして上皮性の決定、維持に関与するのかは不明であった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では形質膜の PI(4,5)P₂がどのようにして上皮性の決定、維持に関与するのかを明らかにすることを目的とした。具体的には以下の2点を目的とした。

- 1) リン脂質である PI(4,5)P₂ は様々なタンパク質と協働して生理機能を示す。そのため、形質膜 PI(4,5)P₂ による上皮性決定機構を解明するにあたり、PI(4,5)P₂ の近傍で PI(4,5)P₂ と協働するタンパク質を知ることは重要である。そこで、PI(4,5)P₂ 近傍で PI(4,5)P₂ と協働し、上皮性決定に寄与するタンパク質を探索し、形質膜 PI(4,5)P₂ による上皮性決定機構を解明する。
- 2) 形質膜の PI(4,5)P₂ が少ない非上皮細胞において形質膜 PI(4,5)P₂ 量を増加させた際に、非上皮細胞に上皮性を付与することができるかを調べる。

3. 研究の方法

1) PI(4,5)P₂ 近傍で PI(4,5)P₂ と協働し上皮性決定に関与するタンパク質の探索

PI(4,5)P₂ に特異的に結合するタンパク質ドメイン(PLCδ1 PH ドメイン)をビオチン化活性を持つ酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ変異体(APEX2)と融合させ、上皮細胞に発現させた。APEX2 融合 PLCδ1 PH ドメインが本来の局在である形質膜への局在を示すことを確認した後、ビオチンフェノールと過酸化水素を加え反応を行わせ、生細胞内で PI(4,5)P₂ のごく近傍 (約 30 nm 以内)に存在するタンパク質をビオチン化した。反応後、細胞より抽出液を回収し、ビオチン化された PI(4,5)P₂ 近傍タンパク質を細胞抽出液中よりストレプトアビジンビーズを用いて単離し、それらを質量分析により網羅的に特定した。その後、特定された PI(4,5)P₂ 近傍タンパク質のうち細胞間接着に関与するタンパク質である E カドヘリンとβ カテニンについては、形質膜を標的化した PI(4,5)P₂ 分解酵素の酵素活性ドメインを発現させ、形質膜の PI(4,5)P₂ を減少させた上皮細胞において局在の変化が見られるかを免疫細胞染色により調べた。

2) 非上皮細胞において形質膜の PI(4,5)P₂ 量を増加させた際に、上皮性付与が可能な検討

形質膜を標的化した PI(4,5)P₂ 合成酵素を非上皮細胞であるヒト骨肉腫細胞株に過剰発現し PI(4,5)P₂ 量を増加させた際に、遺伝子発現や、アクチン構造が上皮細胞様に変化するかを調べた。また、シリコン製のインサートを用いて、明確な間隔(細胞のない領域)を作り、一定時間後の細胞移動度を調べる方法や、細胞が通過可能なサイズの穴を有するメンブレンに基底膜の成分をコートし、その上から PI(4,5)P₂ 合成酵素を発現させたヒト骨肉腫細胞株を播種し、メンブレンを通過した細胞数をクリスタルバイオレットで染色し計数することにより、形質膜における PI(4,5)P₂ の増加が細胞移動能、浸潤能に与える影響を調べた。

4. 研究成果

1) PI(4,5)P₂ 近傍で PI(4,5)P₂ と協働し、上皮性決定に関与するタンパク質の探索

PI(4,5)P₂ の近傍に存在するタンパク質の探索を行い(図 1)、候補タンパク質群を得た。得られた候補タンパク質群に対して遺伝子オントロジーエンリッチメント解析を行なったところ、PI(4,5)P₂ のごく近傍に存在するタンパク質群には細胞間接着に関連するものが多く含まれていることが明らかとなった。次に、これらタンパク質のうち E カドヘリンとβ カテニンに着目し、形質膜 PI(4,5)P₂ の量の変化に伴いどのような局在変化が見られるかを調べた。その結果、形質膜 PI(4,5)P₂ の減少により E カドヘリン、β カテニンの局在が変化するという結果が得られた(図 2)。この際に、E カドヘリンやβ カテニンのタンパク質の量をウエスタンブロッティングにより解析したところ、形質膜 PI(4,5)P₂ の減少により、これらのタンパク質の量には変化がないことが明らかになった。このことから、形質膜 PI(4,5)P₂ による細胞間接着タンパク質の局在制御が上皮細胞特有の性質の維持や獲得に重要である可能性が考えられた。

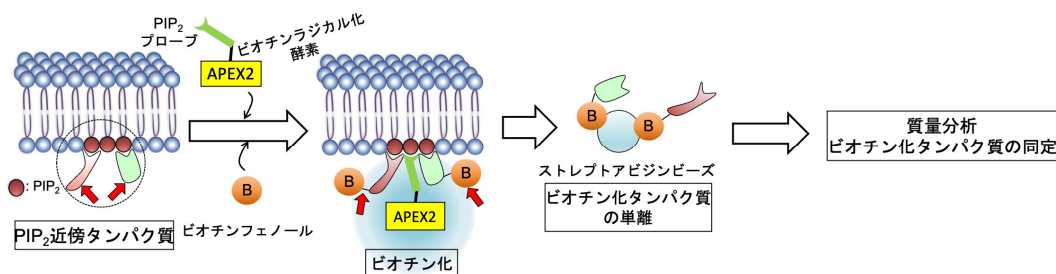


図 1: PI(4,5)P₂ 近傍タンパク質探索方法の流れ

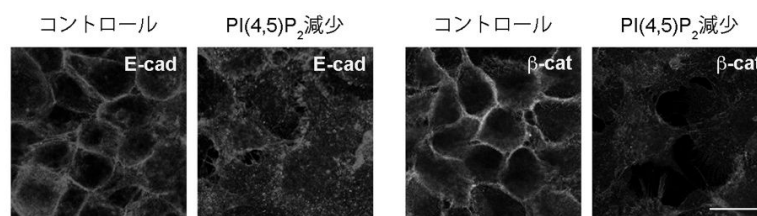


図 2 : PI(4,5)P₂ を減少させた際の細胞間接着タンパク質の局在の変化

2) 非上皮細胞において形質膜の PI(4,5)P₂ 量を増加させた際に、上皮性付与が可能な検討

ヒト骨肉腫細胞株 U2OS 細胞に、形質膜を標的化した PI(4,5)P₂ 合成酵素を発現させることで形質膜の PI(4,5)P₂ を増加させた。U2OS 細胞は通常時は強固な細胞間接着を形成していないが、形質膜を標的化した PI(4,5)P₂ 合成酵素を発現させた際には、細胞間接着が形成された。またアクチン細胞骨格が上皮細胞様に変化することも確認された。一方で、遺伝子発現に関しては、形質膜を標的化した PI(4,5)P₂ 合成酵素を発現させ、形質膜の PI(4,5)P₂ を増加させた場合でも、上皮細胞様の遺伝子発現様式への変化は見られなかった。次に、形質膜を標的化した PI(4,5)P₂ 合成酵素を発現させた U2OS 細胞の細胞移動能、浸潤能を検討したところ、通常の U2OS 細胞と比較し、細胞移動能、浸潤能ともに大幅に低下することが明らかになった。さらに、U2OS 細胞以外のヒト骨肉腫細胞株に形質膜を標的化した PI(4,5)P₂ 合成酵素を発現させた際にも、U2OS 細胞同様に強固な細胞間接着の形成、アクチン細胞骨格の上皮細胞様への変化、細胞移動能の低下が見られるかを調べた。その結果、ヒト骨肉腫細胞株 MG-63 細胞を用いた際にも U2OS 細胞を用いた際と同様の結果が得られることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoneda Atsuko, Kanemaru Kaori(co-1st), Matsubara Ai, Takai Erika, Shimozawa Makoto, Satow Reiko, Yamaguchi Hideki, Nakamura Yoshikazu, Fukami Kiyoko	4. 巻 527
2. 論文標題 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is localized in the plasma membrane outer leaflet and regulates cell adhesion and motility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1050 ~ 1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.040	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 Nakamura Yoshikazu, Kanemaru Kaori, Shoji Madoka, Totoki Kengo, Nakamura Karen, Nakaminami Hidemasa, Nakase Keisuke, Noguchi Norihisa, Fukami Kiyoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Phosphatidylinositol-specific phospholipase C enhances epidermal penetration by Staphylococcus aureus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 web
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74692-8	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 Shiratori Kanako, Kanemaru Kaori(co-1st), Ogura Takahiro, Nakajima Aya, Sugizaki Yuko, Fukuyama Takatsugu, Iwakura Yoichiro, Nakamura Yoshikazu, Fukami Kiyoko	4. 巻 511
2. 論文標題 Epidermal loss of phospholipase C 1 attenuates irritant contact dermatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 330 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.046	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 Fukuyama Takatsugu, Nakamura Yoshikazu, Kanemaru Kaori, Toyoda Chiho, Jang Hyun Jun, Suh Pann Ghil, Fukami Kiyoko	4. 巻 28
2. 論文標題 Phospholipase C 1 is required for normal irritant contact dermatitis responses and sebaceous gland homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.14009	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi Isao, Kondo Mao, Yamamori Shiiori, Kobayashi-Sun Jingjing, Taniguchi Makoto, Kanemaru Kaori, Katakura Fumihiko, Traver David	4. 巻 9
2. 論文標題 Enrichment of hematopoietic stem/progenitor cells in the zebrafish kidney	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50672-5	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 該当する

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金丸佳織、米田敦子、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトール(4,5)二リン酸の細胞膜外葉における検出
3. 学会等名 第62回脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田萌佳、米田敦子、金丸佳織、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 イノシトールリン脂質PI(4,5)P2の細胞膜外葉における機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田敦子、金丸佳織、高井えりか、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 細胞膜内葉と外葉に局在するイノシトールリン脂質PIP2による細胞-基質接着の制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金丸佳織、米田敦子、松原愛、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 細胞膜外葉に存在するホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の検出および生理機能の解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸佳織、米田敦子、松原愛、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 細胞膜外葉におけるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の検出と機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaori Kanemaru, Kanako Shiratori, Takahiro Ogura, Takatsugu Fukuyama, Yoshikazu Nakamura, Kiyoko Fukami
2. 発表標題 Epidermal loss of phospholipase Cd1 protects mice from irritant contact dermatitis
3. 学会等名 第44回日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須川結衣、下澤誠、萱野日菜子、金丸佳織、中村由和、深見希代子
2. 発表標題 上皮細胞と間葉細胞の形質膜におけるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸量の比較
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山堯嗣、豊田千穂、金丸佳織、Pann-Ghill Suh, 中村由和、深見希代子
2. 発表標題 マウス表皮におけるホスホリパーゼC 1の機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村由和、下澤誠、金丸佳織、萱野日菜子、須川結衣、千葉優希、福山堯嗣、深見希代子
2. 発表標題 上皮性の獲得、維持におけるホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸の役割の解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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			
韓国	Korea Brain Research Institute			
米国	University of California San Diego			