

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590189

研究課題名(和文)

脂質を基盤とする情報伝達機序の解析

研究課題名(英文)

Analysis of lipid-based signal transduction

研究代表者

藤田 秋一 (Fujita Akikazu)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60282232

研究成果の概要(和文)：主に細胞膜の内葉に存在するイノシトールリン脂質の PI(4,5)P<sub>2</sub> が関与する細胞機能は、細胞内情報伝達、エンドサイトーシス、細胞骨格調節など多岐にわたる。研究代表者は、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法を駆使することにより、細胞膜内葉に局在する PI(4,5)P<sub>2</sub> のアゴニストあるいはイオノマイシン刺激による動態変化が、細胞膜の場所により異なることを免疫電顕で明らかにし、細胞膜中で PI(4,5)P<sub>2</sub> は区画化されており、局所的にその量が調節される可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)： It has been known that inositolphospholipid PI(4,5)P<sub>2</sub>, whose pool is mainly localized in the plasma membrane, has some cellular functions, such as signal transduction, endocytosis, cytoskeleton regulation and so on. In this study, we show that, using freeze-fracture replica labeling method, the time course of reduction in the PI(4,5)P<sub>2</sub> level in the plasma membrane is different in each area of the undifferentiated plasma membrane, caveola, coated pit when cells are stimulated with angiotensin II or Ca<sup>2+</sup> ionophore. These results indicate that PI(4,5)P<sub>2</sub> is compartmentalized in the plasma membrane, resulting in changing the level of PI(4,5)P<sub>2</sub> in the limited area.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：電子顕微鏡, 細胞内情報伝達, カベオラ

## 1. 研究開始当初の背景

種々のイノシトール燐脂質 (PIs) の結合ドメインと GFP の融合蛋白質を用いて、細胞膜内葉および細胞内オルガネラ膜における分布解析が行われているが、空間分解能が低く、膜上での二次元的分布に関する詳細な情報は得られない。よって、本来の脂質の超微細局在を明らかにするには新しい方法が必要

である。

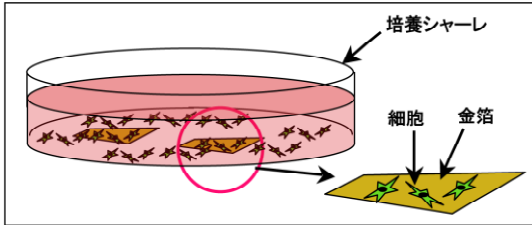
## 2. 研究の目的

種々の細胞機能に関与する種々のイノシトール燐脂質 (PIs), 特に PI(4,5)P<sub>2</sub> の細胞膜での超微細局在を明らかにし、細胞内情報伝達、エンドサイトーシス、細胞接着など、現在までに PI(4,5)P<sub>2</sub> が関与することが報告

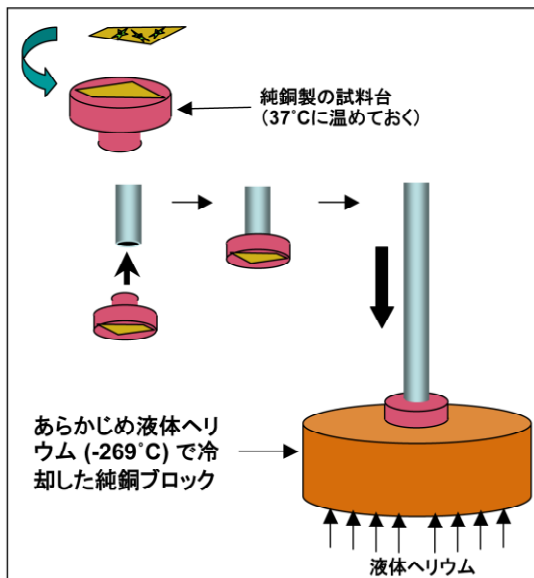
されている細胞現象と細胞膜上での PI(4,5)P<sub>2</sub> の局在の関係を検討する。

### 3. 研究の方法

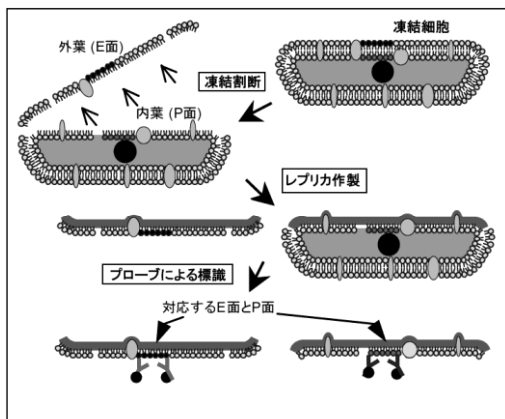
細胞を急速凍結するために熱伝導の良い金箔の上に細胞を培養した (下図)。また急



速凍結法には2つ方法を用いた。細胞膜の PI(4,5)P<sub>2</sub> を標識するにはメタルコンタクト法 (下図) を用い、細胞内オルガネラ膜を標識するには加圧凍結法を用いた。



凍結した細胞は凍結割断によりレプリカ膜を形成した後、グルタチオン-s-トランスフェラーゼ (GST) と PLCδ1 の PH ドメインの融合蛋白質 (GST-PLCδ1-PH) で細胞膜の PI(4,5)P<sub>2</sub> を標識した (下図)。

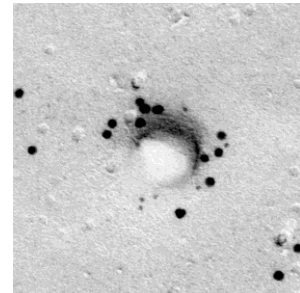


### 4. 研究成果

#### (1) 細胞膜での PI(4,5)P<sub>2</sub> の微細分布

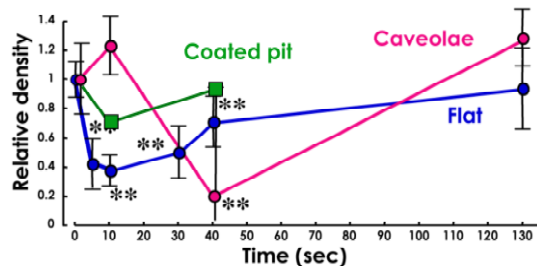
イノシトール磷脂質 (PIs) は種々の細胞現象に関与することが報告されており、特に PI(4,5)P<sub>2</sub> はシグナル伝達、小胞輸送、細胞骨格制御など関与する現象は多岐にわたる。同一分子が異なる機能を制御するためには、局所的に PI(4,5)P<sub>2</sub> の量が緻密に制御されていると推測されているが、その詳細は明らかでない。PIs の局在は、PIs 結合ドメインと GFP の融合蛋白質によるイメージングで解析されてきたが、この方法では空間分解能が低く二次元的分布の詳細な情報は得られない。一方、通常の免疫電顕法では化学固定できない磷脂質の局在を正確に決定することは困難である。そこで我々は凍結割断レプリカを用いて、PI(4,5)P<sub>2</sub> の超微局在を検索する方法を開発した。凍結割断レプリカでは細胞膜分子は白金・カーボンの薄膜で物理的に固定されるため、生細胞での分子分布が超微形態レベルで維持される。本研究では PI(4,5)P<sub>2</sub> に特異的に結合する PLCδ1 の PH ドメインと GST の融合蛋白質でレプリカを標識し、細胞膜上での二次元的分布を解析した。ヒト線維芽細胞の細胞膜では、

PI(4,5)P<sub>2</sub> 標識はカベオラ開口部 (右図) およびコーテッドピット周囲に集中する傾向が見られ、標識密度は平坦な領域に比べ有意に高かった。



また angiotensin II (Ang II) 刺激によって細胞膜の PI(4,5)P<sub>2</sub> の量が減少し、平坦な領域の方がカベオラ開口部よりも早い段階で減少することがわかった。これに対しコーテッドピット周囲での集積は Ang II 刺激によって変化しなかった (下図)。さらに、ionomycin によっては逆にカベオラ開口部の方が平坦な領域の方よりも早い段階で減少することから、少なくとも細胞膜には3つの異なる PI(4,5)P<sub>2</sub> のプールが存在することがわかった。このように凍結割断レプリカ標識法を用いることにより、PI(4,5)P<sub>2</sub> のナノスケールレベルでの局在を検討できることが示された。

#### (2) 細胞内オルガネラ膜上での微細分布



上述のようにイノシトール燐脂質 (PIs) は、細胞内シグナル伝達、小胞輸送、細胞接着、オートファジーなど種々の細胞現象に関与することが知られる。同一膜上での PIs の偏在は膜陥凹の形成、小胞の出芽・融合、細胞骨格などの局所的制御と直接リンクしていると考えられるが、その微細分布には不明な点が多い。しかしながら、これまでの方法では、細胞内を切断することが出来ず、細胞内オルガネラ膜での PIs の微細構造を検討することが困難であった。そこで我々が開発した凍結切断レプリカ法をさらに改良し、培養細胞並びに生体内組織において細胞内が切断され効率的に細胞内オルガネラを観察できる方法を確認した。すでに膵臓の外分泌細胞の各オルガネラでの PI(4,5)P<sub>2</sub> の分布を明らかにし、そして現在、培養細胞内で観察されるオルガネラ膜を同定するために、それぞれのオルガネラに特異的に局在するマーカーを細胞内に発現させ、レプリカ膜上で標識することを試みている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Fujita A, Cheng J, Fujimoto T: Quantitative electron microscopy for the nanoscale analysis of membrane lipid distribution. **Nature Prot** 5, 661-669, 2010. 査読有
2. Fujita A, Fujimoto T: High resolution molecular localization by freeze-fracture replica labeling, Schwartzbach, S.D., Osafune, T. (eds.), **Immuno-electron Microscopy: Methods and Protocols**, **Methods Mol Biol** 657, p205-216, 2010, Humana Press. 査読有
3. 藤田秋一, 藤本豊土: ナノメートルレベルでの膜脂質局在解析, **実験医学**, 28, 3248-3254, 2010. 査読無
4. 藤田秋一, 藤本豊土: 膜脂質のナノスケール分布解析, **実験医学** 28, 1220-1227, 2010. 査読無
5. Fujita A, Cheng J, Tauchi-Sato K, Takenawa T, Fujimoto T: A distinct pool of phosphatidyl- inositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique, **Proc Natl Acad Sci USA** 106, 9256-9261, 2009. 査読有
6. Fujita A, Cheng J, Fujimoto T: Segregation of GM1 and GM3 clusters in the cell membrane depends on the intact actin cytoskeleton, **Biochim Biophys Acta** 1791, 388-396, 2009. 査読有
7. Cheng J, Fujita A, Ohsaki Y, Suzuki M, Shinohara Y, Fujimoto T: Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. **Histochem Cell Biol** 132, 281-291, 2009.

査読有

8. Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y, Fujita A, Fujimoto T: Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure, **Biochim Biophys Acta** 1791, 399-407, 2009. 査読有
9. 藤田秋一, 藤本豊土: 膜脂質分子をナノレベルで可視化する, **顕微鏡**, 44, 206-209, 2009. 査読無
10. 藤田秋一, 大崎雄樹, 藤本豊土: 脂質の組織化学, 日本組織細胞化学会編, **組織細胞化学** 2009, 京都, p35-44, 2009. 査読無
11. Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Fujita A, Fujimoto T: Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tightbinding of lipidated apolipoprotein B-100. **J Cell Sci** 121, 2415-2422. 2008. 査読有
12. 藤田秋一, 藤本豊土: 凍結レプリカ標識法による膜脂質の分布解析 電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ, 藤本豊土, 山本章嗣 (監修) 57-63, 2008. 秀潤社, 査読無
13. 藤田秋一, 藤本豊土: 蛋白質と脂質を見るための電子顕微鏡法, **組織細胞化学** 2008, p25-33, 2008. 日本組織細胞化学会, 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. Fujita A, Cheng J, Fujimoto T: Nanoscale detection of membrane lipids by electron microscopy. 第 116 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 第 88 回 日本生理学会大会 合同学術集会, 横浜, 2011 年 3 月 28-30 日
2. Fujita A, Cheng J, Fujimoto T: Nanoscale detection of membrane lipids by electron microscopy. The 2nd International Symposium on Membrane Biology, Ningbo, China, 2010 年 11 月 9-12 日 招待講演
3. 藤田秋一: 細胞膜における脂質分子のナノスケールレベルでの局在解析, 第 150 回 日本獣医学会学術集会, 教育講演, 帯広, 2010 年 9 月 17 日 招待講演
4. Fujita A, Cheng J, Fujimoto T: Nanoscale detection of membrane lipids by electron microscopy, The 4th International Society for Neurochemistry Special Neurochemistry Conference "Membrane domains in CNS physiology and pathology", Erice, Italy, 2010 年 5 月 22-25 日 招待講演
5. 藤田秋一, 程晶磊, 藤本豊土: 免疫電顕法を用いたホスホイノシタイトの微細局在, 第 115 回 日本解剖学会総会, シンポジウム, 盛岡, 2010 年 3 月 29 日 招待講演
6. 藤本豊土, 藤田秋一, 程晶磊: 凍結切断レプリカ標識法によるイノシトール燐脂質局在の解析, 第 82 回 日本生化学会年会, シンポジウム, 神戸, 2009 年 10 月 21-24 日 招待講演
7. 藤田秋一: 細胞膜における脂質分子のナノスケールレベルでの局在解析, 帯広畜産大学基礎

獣医学部門, 第1回基礎研究部門研修会, 帯広,  
2009年2月6日 招待講演

8. Fujimoto T, Ohsaki Y, Suzuki M, Fujita A, Cheng J, Shinohara Y: Lipid droplets as a new functional platform, The 6th Symposium of the Asian Biophysics Association, Hong Kong, 2009年1月11~14日 招待講演

9. 藤本豊士, 藤田秋一, 程晶磊: 凍結切断レプリカ標識法による膜脂質のナノ局在解析, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会年会合同大会 (BMB2008), シンポジウム, 神戸, 2008年12月9~12日 招待講演

10. 藤本豊士, 藤田秋一, 程晶磊: 電子顕微鏡による膜脂質のナノ局在解析, 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会, シンポジウム, 大分, 2008年3月27~29日 招待講演

11. 藤田秋一, 程晶磊, 佐藤久美, 藤本豊士: 細胞膜脂質のナノスケール局在解析, 日本薬学会第128回年会, シンポジウム, 横浜, 2008年3月26日 招待講演

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 秋一 (FUJITA AKIKAZU)

名古屋大学 大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 60282232

### (2) 研究分担者

藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)

名古屋大学 大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 50115929