

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21687016

研究課題名（和文）細胞膜を構成する脂質分子の同定とその新規機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of functional roles of membrane lipids

研究代表者

池ノ内 順一（IKENOUCHI JUNICHI）

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10500051

研究成果の概要（和文）：細胞を構成する脂質の内、細胞表面に存在する形質膜を構成する脂質はわずかに1%である。細胞表面に存在する脂質にはどのような脂質が存在し、それらの生物学的な役割は何かを明らかにする目的で、細胞表面の脂質分子組成解析する新しい方法論の確立を行った。

研究成果の概要（英文）：The lipid of cell surface membrane accounts for only 1% of total lipids. In this research project, I aimed to determine lipid species enriched at the cell surface membrane and clarify the functional roles of lipids consisting of cell surface membrane. For this purpose, I established a new method to analyze lipid composition of cell surface membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：脂質、生体膜、上皮細胞、スフィンゴミエリン、シリカ、質量分析、ライセニン

1. 研究開始当初の背景

細胞を構成する脂質分子種は、数千種類に及ぶ。しかしながら、このような脂質の多様性の意義はほとんど明らかになっていない。私は上皮細胞に存在するアピカル膜とバソラテラル膜に着目して、それぞれの細胞膜を構成する脂質分子種を比較することにより、脂質分子種の多様性の意義の一端を明らかにすることができるのではないかと考えた。

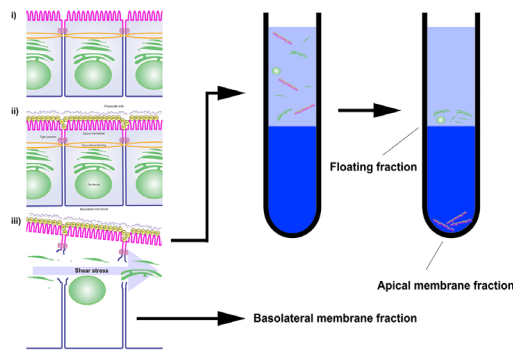
2. 研究の目的

上皮細胞のアピカル膜とバソラテラル膜は、それぞれ機能的に異なる膜タンパク質が分布する。一方で、それぞれの細胞膜を構成する脂質分子種については、量的あるいは質的な違いがあるか否かについて、明らかになっていない。そこでまず、アピカル膜とバソラテラル膜を単離する手法を確立し、それぞれの膜から脂質を抽出して、その組成を質量分析で比較することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シリカ粒子を用いた細胞膜単離手法の確立

細胞を構成する脂質の内、そのほとんどは小胞体をはじめとする細胞内膜に由来するため、形質膜のみを単離する手法の確立を試みた。これまでに、界面活性剤を用いた細胞膜分画法については既に方法論が確立されていたが、脂質の解析を行う上で、界面活性剤の存在下では、膜面同士の脂質が自由に混和してしまうという問題点があった。その点を克服するために、界面活性剤を用いずに形質膜を単離する手法を検討した。今回、私は正電荷を付与したコロイド状のシリカ粒子を用いて、アピカル膜のみを選択的に重みづけする方法が脂質解析を目的とした細胞膜単離法として優れていることを見出した。その概略を下図に示す。



(2) 細胞膜脂質の解析方法

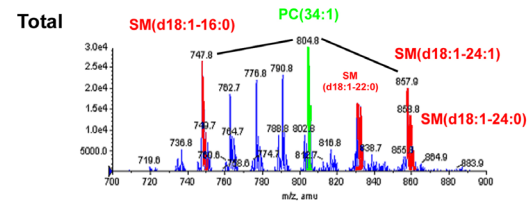
上述のようにして単離したアピカル膜およびバソラテラル膜から Bligh and Dyer 法により脂質を抽出し、液体クロマトグラフィおよび質量分析により、それぞれの細胞膜を構成する脂質分子種を比較した。

4. 研究成果

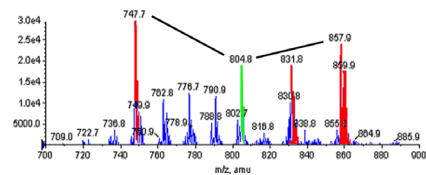
(1) アピカル膜とバソラテラル膜の細胞膜脂質組成の比較

上皮細胞のアピカル膜とバソラテラル膜の脂質組成については、これまで Van Meer と Kai Simons らによる先行研究が報告されている。彼らは、それぞれの細胞膜から出芽するエンベロープウイルスに着目し、ウイルスの脂質解析を行うことによって、アピカル膜では、バソラテラル膜に比べて、スフィンゴミエリンが豊富に存在することを示した (Van Meer and Kai Simons 1988)。一方、今回、私がシリカ粒子を用いて、培養上皮細胞からアピカル膜とバソラテラル膜を単離し脂質解析を行ったところ、どちらの細胞膜面分においてもスフィンゴミエリンは豊富に存在

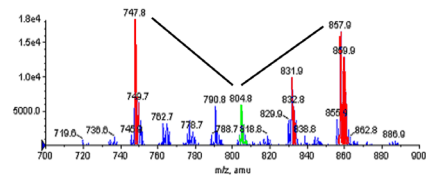
しており、両者の間に含有量の明確な差は認められなかった。質量分析の結果を下図に示す。



Apical



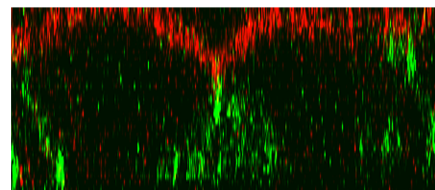
Basolateral



(2) ライセニンを用いたスフィンゴミエリンの分布の可視化

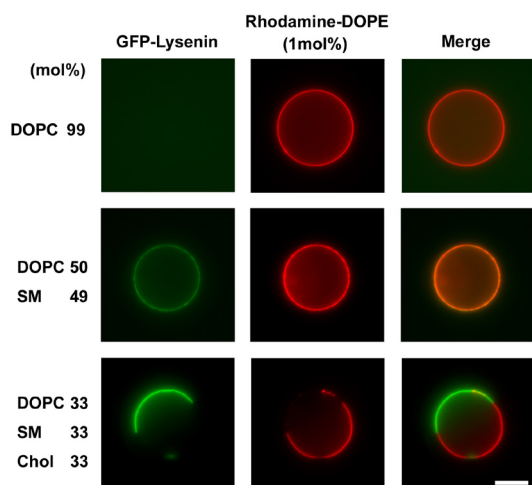
スフィンゴミエリンに結合することが知られているタンパク質ライセニンを用いて培養上皮細胞を染色すると、アピカル膜のみを選択的に認識することを見出した。前述の結果を併せて考えると、バソラテラル膜においてもスフィンゴミエリンが豊富に存在するにも関わらず、ライセニンはバソラテラル膜を認識しないことがわかった。

RFP Lyseinin E-cadherin



(3) ライセニンの認識する膜ドメインの解析

以上の結果を元に、ライセニンは、スフィンゴミエリンの分布状態を識別しているのではない様々な脂質組成の人工脂質二重膜を作製し、どのような状態のスフィンゴミエリンを認識するか検討を行った。その結果、ライセニンはコレステロールの存在下で、スフィンゴミエリンが集積した状態の膜領域 (スフィンゴミエリンクラスター) に対して特異的に結合することを見出した (次図)。



これらの結果を総合すると、上皮細胞のアピカル膜には、スフィンゴミエリンが集積した膜ドメインが存在することがわかった。このような細胞膜脂質の非対称な分布の存在については殆ど明らかになっておらず、独自性の高い知見である。

(4) スフィンゴミエリンクラスターの解析

このような結果を踏まえて、以下の二つの実験を行った。まずは、遺伝子操作により作出されたタイトジャンクションを持たない上皮細胞において、このような脂質の非対称な分布が維持されているかを検討した。その結果、タイトジャンクションを持たない上皮細胞においても、アピカル膜のスフィンゴミエリンクラスターが形成されることがわかった。これまでタイトジャンクションはアピカル膜とバソラテラル膜の境界に存在し、細胞膜脂質の自由拡散を防ぐ装置であると考えられていたが、そのような機能を担っていないことを明確に示すことができた。

また、ライセニンを用いた免疫電顕を行うことにより、スフィンゴミエリンクラスターは、アピカル膜の微絨毛に分布していることを見出した。またアピカル膜のスフィンゴミエリンを、スフィンゴミエリン分解酵素で分解すると、微絨毛が完全に消失することを見出した(論文未発表)。今後、スフィンゴミエリンが微絨毛形成において果たしている役割を解明したい。

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5件)

1. Area-Gomez E, Lara Castillo M, Tambini M, Guardia-Laguarta C, Ad J.C. de Groof,

Madra M, Ikenouchi J, Umeda M, Bird T, Sturley S, and Schon E. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease.

EMBO J. 2012 31(21):4106-23. doi:

10.1038/emboj.2012.202. (査読有)

2. †Ikenouchi J, Suzuki M, Umeda K, Ikeda K, Taguchi R, Kobayashi T, Sato SB, Kobayashi T, Stolz DB, Umeda M. Lipid polarity is maintained in absence of tight junctions. *J Biol Chem.* 2012

287(12):9525-33. doi:

10.1074/jbc.M111.327064. († Corresponding author) (査読有)

3. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, Furuse M. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells.

J Cell Sci. 2011 124(Pt 4):548-55. doi:

10.1242/jcs.072058. (査読有)

4. Yoshihara K, Ikenouchi J, Izumi Y, Akashi M, Tsukita S, Furuse M. Phosphorylation state regulates the localization of Scribble at adherens junctions and its association with E-cadherin-catenin complexes.

Exp Cell Res. 2011 317(4):413-22. doi:

10.1016/j.yexcr.2010.12.004. (査読有)

5. †Ikenouchi J, Umeda M. FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2010

107(2):748-53. doi:

10.1073/pnas.0908423107. (†)

Corresponding author) (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 池ノ内順一 細胞接着装置における超分子複合体の解析: 第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術集会: 2012 年 3 月 26 日: 山梨
2. 池ノ内順一 タイトジャンクションにおける超分子複合体の解析: 第 84 回 日本生化学会: 2011 年 9 月 24 日: 京都
3. 池ノ内順一、梅田一彰、梅田真郷 Re-examination of the role of tight junctions as a lipid diffusion barrier. : 第 53 回日本脂質生化学会: 2011 年 5 月 12 日: 東京
4. Ikenouchi J Supramolecular complexes at tight junctions. In: KyotoUniversity GCOE symposium “Biomembrane and Channels”: 2010 Dec 10: Kyoto, Japan
5. 池ノ内順一、梅田真郷 上皮細胞の細胞膜ドメインを規定する脂質の探索. : 第 61 回日本細胞生物学会. 若手優秀発表賞受賞講演: 2009 年 6 月 3 日: 名古屋

[図書] (計 3 件)

1. 池ノ内順一、梅田真郷. 上皮細胞の細胞膜における膜ドメイン. 実験医学 2010;28(8) 1212-1219. 羊土社
2. 池ノ内順一、藤本豊土. 膜ドメインの姿と生体脂質のダイナミクス. 実験医学 2010;28(8) 1206-1211. 羊土社
3. 池ノ内順一、梅田真郷. 生体膜における脂質分子の局在および動態のイメージング. 浜地格/二木史朗編. 生命現象を理解する分子ツール 2010. pp25-40. 化学同人

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
池ノ内 順一 (IKENOUCHI JUNICHI)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 10500051