

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19231

研究課題名（和文）脂質結合タンパク質の改変による新たな脂質プローブの作出

研究課題名（英文）Development of new probes for visualization of subcellular distribution of lipids

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体膜において多様な脂質分子種が時空間的に不均一に分布することが、多様な細胞内機能に関わると考えられている。本研究課題では、多様な脂質の混和物として形成される細胞膜の物性を可視化するツールの開発を目指して研究を行った。ピレン骨格色素（PA）は、Lo相では短波長、Ld相では長波長の蛍光を発するソルバトクロミック色素であり、Red/Blueの比によって膜の秩序性を可視化できる。しかし、ピレン骨格色素は膜透過性が高く、形質膜の不均一性については観察が困難であった。今年度は、ピレン色素を改変し、選択的に形質膜に局在化させることによって、形質膜の膜物性の不均一性を可視化するプローブの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜は多様な脂質分子種によって構成されており、これらの脂質種が時空間的に不均一に分布することが、多様な細胞内機能に関わると考えられている。人工脂質二重膜において、スフィンゴ脂質やコレステロールは、秩序性の高い膜領域を形成し、他の膜領域と相分離する性質を示すが、生細胞の形質膜の物性が不均一であるかについては、解析手法が限られるため未解明である。本研究では、周囲の膜の物性に依存して異なる波長の蛍光を発する環境依存性プローブを改変し、生体膜の不均一性の可視化するプローブの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Biological membranes are composed of diverse lipid molecular species, and the spatiotemporal heterogeneous distribution of these lipid species is thought to be responsible for diverse intracellular functions. In this research project, I aimed to develop tools to visualise such diversity of plasma membrane lipids and the physical properties of plasma membranes formed as admixtures of diverse lipid species. Pyrene is a solvatochromic dye and allows visualisation of the order of the membrane. However, pyrene backbone dyes are highly membrane permeable, so the signal at the plasma membrane is relatively low. In this project, I developed a probe to visualise the heterogeneity of plasma membrane properties by modifying the fluorescent solvatochromic dye of the pyrene dye and selectively localising it to the plasma membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膜流動性 スフィンゴミエリン コレステロール 生体膜 ラフト

### 1. 研究開始当初の背景

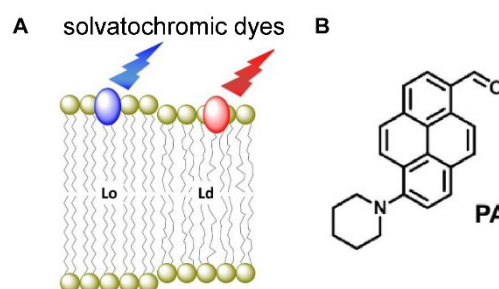
生体膜は多様な脂質分子種によって構成されており、これらの脂質種が時空間的に不均一に分布することが、多様な細胞内機能に関わると考えられている。人工脂質二重膜において、スフィンゴ脂質やコレステロールは、秩序性の高い膜領域を形成し、他の膜領域と相分離する性質を示すが、生細胞の形質膜の物性が不均一であるかについては、解析手法が限られるため未解明である。本研究提案では周囲の膜の物性に依存して異なる波長の蛍光を発する膜環境依存性プローブを改変し、生体膜の不均一性の可視化するプローブの開発を試みた。また、生体膜の流動性を可視化するプローブを用いて、細胞表面に存在する様々な細胞膜構造の膜物性の違いを明らかにし、細胞膜タンパク質や脂質が集積してできる超分子複合体の形成メカニズムの解明に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

生体膜は多様な脂質分子種によって構成されており、これらの脂質種が時空間的に不均一に分布することが、多様な細胞内機能に関わると考えられている。スフィンゴ脂質やコレステロールは、秩序性の高い liquid-ordered (Lo) 相を形成し、周囲の liquid-disordered (Ld) 相から分離する性質があり、この相分離は膜タンパク質の分布制御にも寄与すると考えられている。形質膜はスフィンゴ脂質やコレステロールを高い割合で含むが、生細胞の形質膜の物性が不均一であるかについては、解析手法が限られるため未解明である。

生細胞の膜物性を可視化する方法に、周囲の物性に依存して異なる波長の蛍光を発する膜環境依存性プローブの利用が挙げられる。LipiORDER として市販されているピレン骨格色素 (PA) は、Lo 相では短波長 (Blue)、Ld 相では長波長 (Red) の蛍光を発する蛍光ソルバトクロミック色素であり、Red/Blue の比によって膜の秩序性を可視化できる (上図 A)。しかし、ピレン骨格色素は膜透過性が高く、小胞体や脂肪滴などに由来する強いシグナルが細胞内に観察される。そのため相対的に形質膜のシグナルが低く、形質膜における膜物性の不均一性については観察が困難であった。

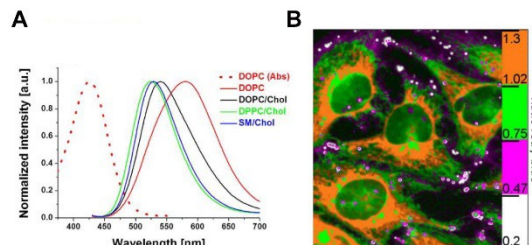
私たちの研究室では、上皮細胞の細胞膜構造に着目して研究を進めてきた。特に、外界との物質交換に関わる微絨毛や上皮細胞のバリア機能を担う細胞間接着装置などの細胞膜構造において、スフィンゴミエリンやコレステロールなどの脂質が集積していることを報告している。細胞膜構造の形成メカニズムを考えるうえで、このような脂質の集積は膜の物性の局所的変化を引き起こし、それにより膜タンパク質の自己集合状態や細胞骨格との相互作用に変化をもたらすと考えられるが、直接的にこれらの細胞膜構造において膜の物性が変化していることを示すことは出来ていない。本研究課題では、ピレン骨格色素の蛍光ソルバトクロミック色素を改変し、選択的に形質膜に局在化させることによって、形質膜の膜物性の不均一性を可視化し、細胞膜構造の構築原理の解明に取り組んだ。



A: 膜の秩序性 (Lo, Ld) の違いによって蛍光特性を変化させるソルバトクロミック色素。  
B: 本研究提案で改変したピレン骨格色素の模式図。

### 3. 研究の方法

ピレン骨格色素は、膜環境の秩序性に応じて、蛍光特性を変化させるソルバトクロミック色素であるため、細胞膜の物性の違いを可視化する上で非常に有用な色素である。一方で、その疎水性の高さから、細胞膜を容易に透過し、形質膜のみならず細胞内膜や脂肪滴に集積してしまうため、細胞のイメージングを行うと細胞の脂質の 90% 以上を占める細胞内膜に由来するシグナルが圧倒的に高く、細胞の脂質の 1% に満たない形質膜のシグナルは検出が困難である。このため、ピレン骨格色素のソルバトクロミズムの特性を失



A: ピレン骨格色素の GU における蛍光特性。  
B: 市販されているピレン骨格色素を用いた細胞の染色像。細胞内膜に由来するシグナルが主で、形質膜の情報が得られない。  
Nico et al. *Sci Rep* (2016) より改変。

わなままに、細胞に添加した際に形質膜に保持されるように改変することができれば、形質膜に存在するスフィンゴ脂質やコレステロールの形成する細胞膜構造の膜物性を評価することが可能になる。

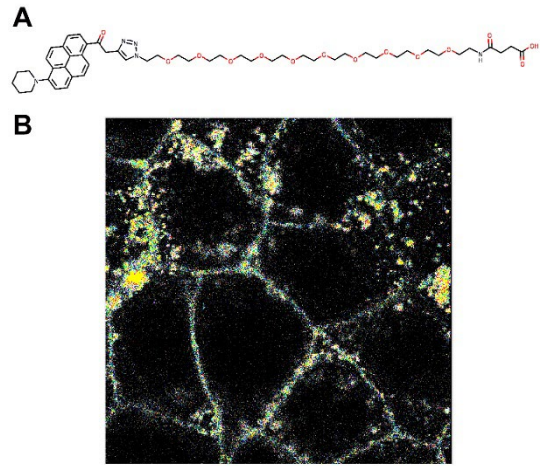
そこで、本研究計画では、ピレン骨格色素に対して、共同研究者の協力を得て、様々な親水基を付与した化合物を作出し、人工脂質二重膜 (GUV: Giant Unilamellar Vesicles) を用いて、改変したピレン骨格色素のソルバトクロミズムの特性を調べた。ソルバトクロミズムの特性を失わずに親水性を付与した化合物については、細胞に添加し、形質膜の膜物性の違いを可視化する条件の検討を行った。

#### 4. 研究成果

ピレン骨格色素の合成に長じた共同研究者 (小西玄一准教授) および化学修飾についての共同研究者 (松森信明教授) の協力を得て、様々な親水基を付与した化合物を合成し、学術振興会特別研究員の松本 惇志氏の協力を得て、それらの化合物の性状解析を行った。具体的には、人工脂質二重膜を用いて合成した化合物のソルバトクロミックな蛍光特性の変化を調べた。また、細胞に添加した際の蛍光輝度、細胞内分布などを調べて、本研究の目的とする形質膜の膜物性の不均一性を可視化するツールとして有用な化合物の選抜を行った。

その中で、ピレン骨格色素に対して、細胞内膜への移行を阻止し、形質膜における保持性を上げる目的で親水性のノナエチレングリコール (NEG) とカルボン酸を付与した化合物が形質膜の膜の流動性を可視化するプローブとして有望であると判断し、詳細な性状解析を行った。細胞に添加すると右図に示すように、細胞内膜に移行せず形質膜に保持されることから、形質膜の膜の秩序性や流動性の違いを可視化するツールとして有望である。ただし、この化学修飾によって、人工脂質二重膜におけるソルバトクロミックな蛍光特性が、Ld側にシフトしており、秩序性の高いLo膜における蛍光強度が低下していた。このため、引き続き今後も、化合物の改変・検討を進めていく予定である。

今後は、今回開発した形質膜の膜の流動性の局所的な違いを検出するプローブを用いて、上皮細胞の微絨毛や細胞接着装置の形成において、膜の物性の変化が観察されるか、といった細胞膜の構築における脂質の寄与を検討したい。また、上皮間葉転換など細胞の癌化に伴って、形質膜の流動性がどのように変化するかについても検討を行いたい。更には、細胞増殖因子受容体やGPCR などの刺激によって、形質膜に一過性に形成されると考えられている脂質ラフトの観察についても取り組みたい。



A: ピレン骨格色素の先端に NEG およびカルボン酸を付加した改変型ピレン骨格色素の模式図。

B: 改変型ピレン骨格色素を用いたマウス乳腺上皮細胞の染色像 (投稿準備中)。Bar は 10 $\mu$ m。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

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 the Journal of Cell Biology	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 the Journal of Cell Biology	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 -

1. 著者名 Shigetomi K, Ono Y, Matsuzawa K, Ikenouchi J.	4. 巻 120
2. 論文標題 Cholesterol-rich domain formation mediated by ZO proteins is essential for tight junction formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2217561120.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2217561120.	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11件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 池ノ内 順一、青木 佳南
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73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長 佑磨、池ノ内 順一
2. 発表標題 上皮細胞シートにおける Tricellulin による三細胞間接着の形成機構
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 松沢 健司、池ノ内 順一
2. 発表標題 MAG1-ASPP を介した細胞の収縮力調節による上皮細胞シートの恒常性維持機構
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 重富 健太、池ノ内 順一
2. 発表標題 タイトジャンクション領域における細胞膜脂質の集積機構
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 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

1. 発表者名 池ノ内順一
2. 発表標題 上皮細胞におけるスフィンゴリエリンの輸送に関わる分子機構の解析
3. 学会等名 生理学研究所上皮研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junichi Ikenouchi
2. 発表標題 Roles of membrane lipids in the organization of cell-cell adhesion structure.
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池ノ内 順一
2. 発表標題 細胞膜構造形成における脂質の機能解析
3. 学会等名 第20回 医用分光学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野由美子、松沢健司、池ノ内順一
2. 発表標題 mTORC2はスフィンゴミエリン輸送を促進することにより、低浸透圧ストレスによる細胞死を抑制する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室のHP <a href="http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/">http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/</a>
---

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
研究協力者	松本 惇志  (Matsumoto Atsushi)	九州大学・理学研究院・特別研究員(PD)	

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
---------	---------