

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657029

研究課題名（和文）

GM2 型脂質ラフトの可視化と構成タンパク質の同定及び新規機能の解明

研究課題名（英文）

Visualization and characterization of GM2-rich lipid raft microdomain

研究代表者

広瀬 茂久 (HIROSE SHIGEHISA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：10134199

研究成果の概要（和文）：神経芽腫細胞とガングリオシド GM2 に対する抗体（anti-GM2）を組み合わせることで、これまで難しかった脂質ラフトの光学顕微鏡レベルでのイメージングに成功した。GM2 ラフトとフロチリンの相互作用（共局在）を確認した。さらにラフトの主要脂質成分（ガングリオシドとコレステロール）の一つであるコレステロール含量に依存してエンドサイトーシス後の運命、すなわちリサイクル系に入るかあるいはリソゾームに送られて分解されるかが決まるという興味深い事実を見出した。

研究成果の概要（英文）：We raised a monoclonal antibody which enables the visualization of ganglioside GM2-rich microdomains as highly punctate dots on a human neuroblastoma cell, GOTO. Using this antibody, we showed that raft-like microdomains of GM2 (GM2 rafts) were colocalized with flotillin-2/reggie-1-positive microdomains. Prelabeling of GM2 rafts with a fluorescent probe, Alexa555-Anti-GM2, demonstrated internalization and delivery of the raft-flotillin assembly to the recycling endosomes. Depletion of cholesterol with methyl-β-cyclodextrin (MβCD) resulted in disruption and targeting of GM2 rafts to lysosomes. These results suggest that in GOTO cells, GM2 rafts are actually present in association with flotillin and undergo internalization into distinct pools of endosomal vesicles depending on their cholesterol contents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計			3,360,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：脂質・タンパク質・糖鎖・細胞膜・脂質ラフト・ガングリオシド・GOTO 細胞・モノクローナル抗体・フロチリン・エンドサイトーシス・神経芽腫・シクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

多くの状況証拠から、細胞膜表面に脂質ラフトが存在し、細胞間シグナリングの基地として働いていると考えられるようになって

いるが、脂質ラフトを単離するには培養細胞を一旦氷上に 1 時間放置する等の特殊な工夫が必要であることから、実験上のアーティファクトではないかと疑問視する向きもある。特に Cell 等のトップジャーナルは、2003

年と 2005 年の総説以来、慎重な姿勢を崩していない [1, 2]。これはひとえに脂質ラフトの主成分である Sphingolipids (GM1, GM2 etc)(図 1) に対する良い抗体がないために、生細胞上で脂質ラフトを可視化することが出来なかったためである。最近の総説でも脂質ラフトの存在に関しては直接的な証明が待たれるとされている [3]。

- [1] Munro S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-388.
- [2] Lin J, Shaw AS. (2005) Getting downstream without a Raft. *Cell* 121, 815-816.
- [3] 小林俊秀 (2009) 脂質ラフトは存在するか. *生化学* 81, 17-23.

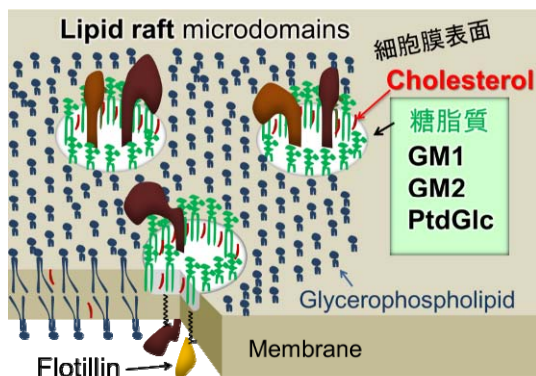


図 1. 脂質ラフトの模式図

2. 研究の目的

これまでの研究で、特定のがん細胞とのみ特異的に反応するモノクローナル抗体の作製に成功し、それが糖脂質の GM2 を認識していることを明らかにした。この抗体で、神経芽腫の一種である GOTO 細胞を染色したところ、細胞表面が斑点上に染色され、しかも脂質ラフトのマーカータンパク質と考えられている Flotillin と染色像が重なった。世界で初めて脂質ラフトの可視化に成功した可能性が高いので、そのことを証明するとともに、GM2-rich ラフトの機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) GM2 型脂質ラフトの可視化と生細胞膜上での動態の解明

GM2 抗体の標識とラフトの可視化: マウス腹水から回収した抗 GM2 モノクローナル抗体を Alexa Fluor 555 で蛍光標識し、培養 Neuroblastoma GOTO 細胞を用いてラフトを可視化した。2 次抗体法による可視化に加えて、1 次抗体を直接標識することにより、2 次抗体による凝集体形成の可能性等を除外した。

Flotillin の標識とラフトへの集積過程の追跡: Flotillin は細胞内タンパク質で

あるが、脂質修飾により細胞膜の内側に結合することが知られている (図 1) 。この Flotillin を GFP (Green Fluorescent Protein) との融合タンパク質として GOTO 細胞に発現させることにより、Flotillin-GFP がラフトに集積するか否かを調べた。さらに、ラフトの動態を明らかにするために、GM2 抗体-Alexa fluor 555 と Flotillin-GFP の二重標識を試みた。Flotillin が GM2 ラフトの裏打ちタンパク質となっていることの確認は、市販の Flotillin 抗体を用いて細胞染色を行うことにより実施した。GOTO 細胞への遺伝子導入はすでに確立済みの方法に従った。

機能解析: Flotillin-GFP を用いて GM2 型ラフトの機能解析に必要な GM2 ラフト-Flotillin 複合体の追跡を行った。

(2) GM2 型ラフトの機能解析

“ 新規エンドサイトーシスの基点 ”

仮説の提唱と検証: GOTO 細胞を無血清培地に移すと GM2 型ラフトのエンドサイトーシスが Flotillin 依存的に、しかも従来から知られているエンドサイトーシスとは異なり、Dynamin や Clathrin に依存しない新しい系であることを示唆する結果が得られていたので、Flotillin の RNAi や Dynamin のドミナントネガティブ体 (DN) を用いて詳細に検討したが、GOTO 細胞のドミナントネガティブ体が不安定で、期待したデータをとることができなかった。今後に残された課題である。

ラフト内におけるタンパク質の動態とエンドサイトーシス過程の Live imaging: 蛍光標識タンパク質 (抗体、ラフト局在タンパク質、及び上記タンパク質) を Live imaging により追跡し、それらの機能的動態を明らかにした。

4. 研究成果

(1) モノクローナル抗体を用いた GM2 raft とその Endocytosis 過程の可視化: 特定のがん細胞とのみ特異的に反応するモノクローナル抗体の作製に成功し、それが糖脂質の GM2 を認識していることを明らかにした。この抗体で、神経芽腫の一種である GOTO 細胞を染色したところ、細胞表面が斑点上に染色され (図 2) , しかも脂質ラフトのマーカータンパク質と考えられている Flotillin と染色像が重なった (図 3, 4) 。世界で初めて脂質ラフトの可視化に成功した可能性が高いので、そのことを証明するべく細胞生物学的な研究を行い以下の成果を得た。

GM2 型脂質ラフトの可視化と生細胞膜上での動態の解明: マウス腹水から回収した抗 GM2 モノクローナル抗体を Alexa Fluor 555 で蛍光標識し、培養神経芽腫細胞 (GOTO 細胞) を用いてラフトを可視化することに成功し

た(図2)。共焦点蛍光顕微鏡で問題のラフトのエンドサイトーシス過程を追跡することにも成功した(図5)。

Flotillin の標識とラフトへの集積過程の追跡: Flotillin は細胞内タンパク質であるが、脂質修飾により細胞膜の内側に結合することが知られている(図1)。このFlotillin を GFP (Green Fluorescent Protein) との融合タンパク質として GOTO 細胞に発現させることにより、Flotillin-GFP がラフトに集積する過程を可視化することに成功した。さらに、GM2 抗体 -Alexa Fluor 555 と Flotillin-GFP で二重標識し、染色像の多くが重なることより(図3, 6)、これまで推定されていたFlotillinが脂質ラフトの裏打ちタンパク質であることを実験的に初めて示すことができた。

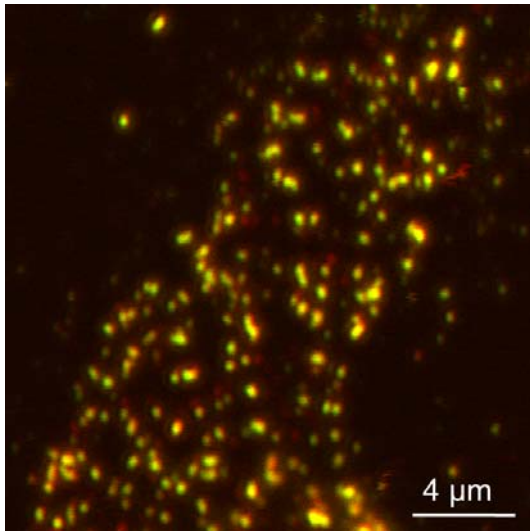


図2. GM2 脂質ラフト。糖脂質の一種であるガングリオシド GM2 を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて神経芽腫由来の GOTO 細胞を染色すると多数の斑点状の染色像が得られることから、GM2 を主成分とする脂質ラフトの可視化に初めて成功したと考えられる。

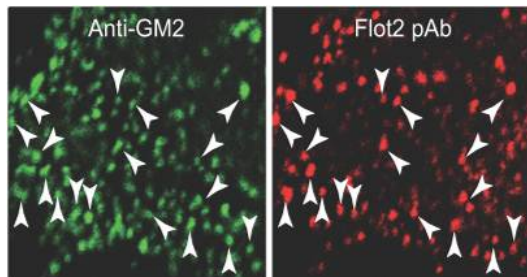


図3. GM2 と Flotillin 2 (Flot2) の重なり。GM2 の染色像とラフトのマーカールとみなされているフロチリンの染色像が良く重なることも、GOTO 細胞上に GM2 ラフトが存在することを強く支持する。

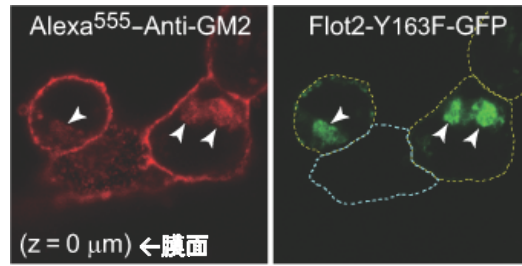


図4. GM2 ラフトと Flot2 の強固な相互作用: Flotillin 2 が凝集を示す変異株 (Flot2-Y163F) を用いた実験モデルにおいて脂質ラフトもフロチリンに引きずられる形で凝集を起こすことがわかった。Flot2-Y163F を発現していない GOTO 細胞(青点線)では、GM2 ラフトは点在したままだった。Tyr-163 を Phe に置換した変異体 Flot2-Y163F は細胞膜にとどまり凝集しやすいことが知られている。

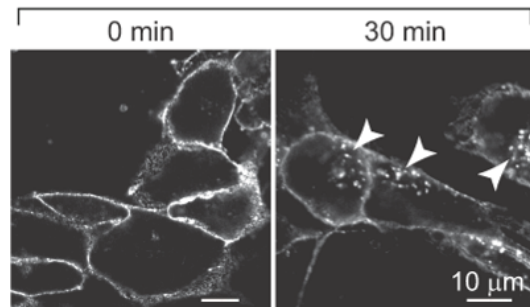


図5. GM2 ラフトのエンドサイトーシス: 蛍光標識した Anti-GM2 を含む培地で GOTO 細胞を 37 °C で培養したところ、蛍光標識した Anti-GM2 を細胞内小胞としての観察することができた(矢頭)。また、この GM2 を含む細胞内小胞は、膜透過処理した GOTO 細胞 (Antibody induction step 無し) を用いた免疫染色によっても観察された。これらの結果は、GM2 リッチラフトは定常的にエンドサイトーシスを起こしていることを強く示唆している。

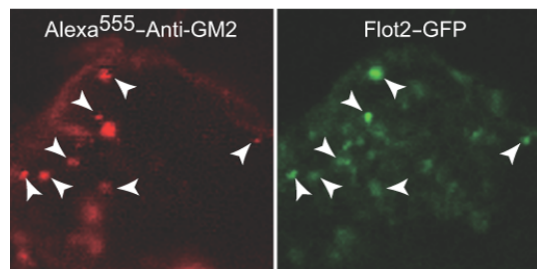


図6. エンドサイトーシス顆粒における GM2 と Flotillin 2 (flot2) の共局在

(2) Endocytosis された GM2 ラフトの運命:
 上述の GM2 ラフトがエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、どのような細胞内トラフィックルートを経て、どのような運命をたどるかを詳細に検討し、以下の成果を得た。

GM2 ラフトの動態を Alexa Fluor 555 標識抗体でモニタリングした結果、GM2 ラフトは通常は、トランスフェリン受容体に代表されるリサイクルエンドゾーム系を介して定期的に細胞内輸送されていることが明らかになった(図7)。

コレステロール包接試薬シクロデキストリン(図8)を作用させてラフトの構成成分であるコレステロールを引き抜き、ラフト構造を不安定化すると細胞内輸送経路はリサイクルエンドゾーム系からライソゾームに至る分解系に変化することが判明した(図9)。これは、これまで未知であった脂質ラフトの細胞生物学的な機能がコレステロール代謝の基地である可能性を示唆するものであり、今後の研究の発展が期待される。脂質ラフトが細胞間コミュニケーション等の情報伝達の基地であることを示唆する研究は多数なされているが、脂質ラフトがコレステロール代謝の基地(貯蔵庫)としての重要な役割を果たしている可能性を示唆したのは初めてであり興味深い。

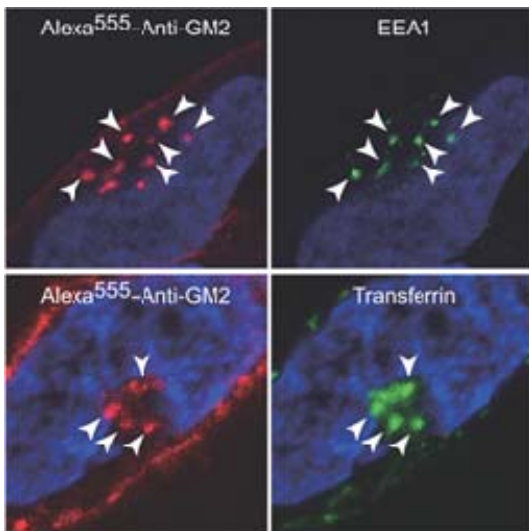


図7. GM2 ラフトのリサイクル: 各種の細胞内マーカーを用いた実験の結果、細胞内に取り込まれた GM2 ラフトは初期エンドゾームマーカー EEA1 やリサイクルエンドゾームマーカー Transferrin と重なり、リサイクル系を通じて細胞内輸送をされ、必要に応じて細胞膜に戻されている可能性が高いことがわかった。

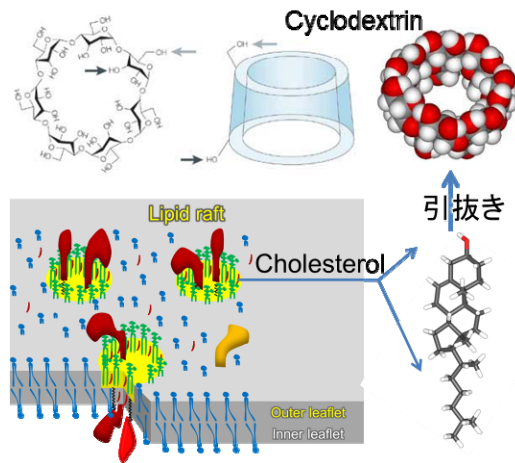


図8. ラフトを不安定化する Cyclodextrin の作用機構

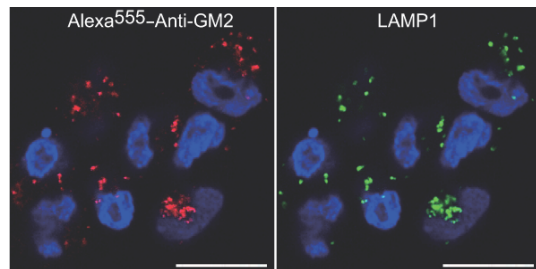


図9. コレステロール剥離による GM2 ラフトの不安定化: GOTO 細胞にコレステロール包接試薬 Methyl-β-cyclodextrin (M CD) を作用させて、GM2 ラフトの態様およびそのエンドサイトーシスに与える影響を観察した。その結果、GM2 ラフトは M CD に依存して細胞膜から消失し、細胞内のリソソームに送達されることがわかった。これらの結果は、GM2 ラフトの細胞生物学的機能がエンドサイトーシスの基地であること、GM2 ラフトがコレステロールの代謝に関連していることを示唆する。私たちは、ラフトの不安定化が癌細胞のアポトーシスを引き起こすことを見出しており、そのメカニズムの解明にもつながると期待される。LAMP: lysosome-associated membrane protein 1.

(3) GM2 ラフト研究の新展開: GM2 抗体でゼブラフィッシュの幼生を染色したところ、体表及びエラのイオン輸送細胞のアピカル側が特異的に、かつ強く染まった。イオン輸送細胞のアピカル膜はピットとよばれる特殊な構造を有し、そこに種々のイオン輸送体がスーパーtransportソームを作って、淡水からのイオンの取込みという難しい仕事をこなしていると考えられているが、このスーパーtransportソームの形成に GM2 ラフトが重要な役割を果たしている可能性を示唆する結果で、興味深い。

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3件)

Kato, A., Muro, T., Kimura, Y., Li, S.-S., Islam, Z., Ogoshi, M., Doi, H., Hirose, S. Differential expression of Na⁺-Cl⁻ cotransporter and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 in the distal nephrons of euryhaline and seawater pufferfishes. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 300, R284-R297, 2011.

Saito K, Nakamura N, Ito Y, Hoshijima K, Esaki M, Zhao B, Hirose S. Identification of zebrafish Fxyd11a protein that is highly expressed in ion-transporting epithelium of the gill and skin and its possible role in ion homeostasis. **Front Physiol.** 1:129 (1-14), 2010.

Tomioka, R., Minami, N., Kushida, A., Horibe, S., Izumi, I., Kato, A., Fukushima, K., Ideo, H., Yamashita, K., Hirose, S., and Saito, Y. Neuroblastoma GOTO cells are hypersensitive to disruption of lipid rafts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 389, 122-127, 2009.

[学会発表](計2件)

広瀬茂久「ガングリオシド GM2 を主成分とするラフトの挙動」第27回動物細胞工学シンポジウム, キャンパス・イノベーションセンター, 東京, 2012.

Tomioka, R., Kato, A., and Hirose, S. Methyl-beta-cyclodextrin-mediated lipid raft disruption causes acute apoptosis in neuroblastoma GOTO cell. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Molecular Basis for Biological Membrane Organization and Dynamics (A5)", Snowbird, Utah, USA, 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.hirose.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

広瀬 茂久 (HIROSE SHIGEHISA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：10134199

(2)研究分担者

なし()

研究者番号：

(3)連携研究者

加藤 明 (KATO AKIRA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：40311336