

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590234

研究課題名(和文) 情報伝達の基盤となる脂質ドメインの解明

研究課題名(英文) Analysis of lipid domains providing platforms for signal transduction

研究代表者

藤田 秋一 (Akikazu, Fujita)

鹿児島大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：60282232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 私たちは急速凍結・凍結割断レプリカ標識法(quick-freezing and freeze fracture replica labeling method: QF-FRL法)を用いて脂質の微細局在を明らかにしてきた。当初のQF-FRL法では、細胞膜における脂質の微細局在の解析に限られていたが、本研究では解析技術酵母および哺乳類細胞の細胞内の各種オルガネラの膜上の脂質についても解析が可能となった。また新規のプロープの開発によりPtdIns4Pの微細局在についても解析が可能となり、現在、細胞膜および各種細胞内オルガネラにおける微細分布の解析を行っている。

研究成果の概要(英文)： We have developed quick-freezing and freeze-fracture replica labeling (QF-FRL) method to analyze lipid distribution at the nano-meter level. The analysis of lipid distribution was limited to the lipids in the plasma membrane of the cell at first. In this study, we have further developed the QF-FRL method to analyze lipids in the membrane of various organelles at the inside of yeast and mammalian cells. And now we can establish the technique to specifically label phosphatidyl inositol 4-phosphat (PtdIns4P) by using anti-PtdIns4P antibody in the plasma membrane and the membrane of various organelle of inside cell. Now we examine the distribution of PtdIns4P at the nano-scale level.

研究分野：細胞生物学

キーワード：電子顕微鏡 脂質 イノシトールリン脂質 脂質ラフト 凍結活断レプリカ 糖脂質

1. 研究開始当初の背景

生体膜には数千種類にも及ぶ脂質分子が存在し、脂質二重層の内葉と外葉で組成が異なることがよく知られる。また二次元的にも不均一で偏った分布を示し、特に細胞膜の外葉においてはラフトと呼ばれる糖脂質や GPI 結合蛋白質などが集積した脂質ドメインの存在が想定されている。我々は、急速凍結・凍結割断レプリカ標識法 (Quick-freezing & freeze-fracture replica labeling method: QF-FRL) によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示し、以下のことを明らかにした。① 細胞膜の外葉でラフトを構成する糖脂質 GM1 と GM3 はそれぞれ別のクラスターを形成する。② 細胞膜内葉のイノシトール燐脂質 PI(4,5)P2 はカベオラ周囲に集積する。③ アゴニスト刺激、Ca²⁺イオノフォア処理により、平坦膜領域、caveola, coated pit の PI(4,5)P2 はそれぞれ異なる挙動を示す。

QF-FRL 法では急速凍結によって膜分子の動きを一瞬にして止め、膜脂質を炭素(C)と白金(Pt)のレプリカ (真空蒸着した薄膜) の鑄型で物理的に固定したのち、特異的なプローブを結合させて可視化し、定量的に解析する。親水性頭部に特異的に結合するプローブを開発することにより、原理的にはどの膜脂質にも応用可能である。白金・カーボン薄膜でできたレプリカ膜には SDS 処置後にも元の脂質の最低 80%以上が保持されており、他の免疫電顕法よりも遥かに高い標識効率で脂質を標識できることも大きな利点である。

2. 研究の目的

(1) 細胞膜外葉の糖脂質および内葉の PI(4,5)P2 に関しては可視化法を確立できたので、本研究では細胞内オルガネラでの脂質分布を可視化する方法を確立する。細胞内情報伝達、膜トラフィックや細胞骨格制御に深く関与する PIs, ホスファチジルエタノールセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE), コレステロールをターゲットとして方法の確立を目指す。(2) PI(4,5)P2, PI(3,4)P2, PI(3,4,5)P3 は細胞膜, PI3P はエンドソーム, PI4P はゴルジ装置が主な存在部位とされているが、それぞれの膜での超微局在には不明な点が多い。PIs の二次元的分布は情報伝達や小胞輸送などに直接リンクしていると考えられ、その解析は各現象の分子機構を解明する上で不可欠である。上記(1)で確立した方法を駆使し、各 PIs に特異的に結合する蛋白質ドメインをプローブとして、細胞膜および細胞内オルガネラ膜における PIs の二次元的分布を詳細に解析する。

(3) 同一膜の相補的な外葉・内葉を双面レプリカ上で同定・解析する方法を確立する。GPI 結合蛋白質や糖脂質は細胞膜を貫通せず、外葉に局在する。これらの分子は細胞

外刺激の細胞内伝達に関わるが、細胞膜内葉の分子とどのように相関しているのかはよくわかっていない。今回の方法を用い、外葉の分子 (GM1, GM3, GPI 結合蛋白質など) あるいは膜貫通蛋白質 (EGF など成長因子の受容体) と、内葉の情報伝達に関与する PIs やラフト分子との分布相関について解析し、トランスフォーメーション、細胞増殖にともなう変化を定量的に解析し、細胞の癌化に伴う情報伝達破綻について検討する。

3. 研究の方法

- (1) 膜脂質を特異的に認識するプローブを新たに開発し、方法の適用範囲を拡張する。
- (2) 細胞膜内葉に存在するラフト分子を標識し、その微細分布を解析する方法を確立する。
- (3) 細胞内オルガネラの燐脂質局在を効率的に可視化する方法を確立する。
- (4) 細胞形質膜の外葉と内葉の相関を解析する方法を確立する。
- (5) トランスフォーメーション、増殖刺激に伴う PIs の分布を定量的に解析する。
- (6) PS, PE の非対称性分布を定量的に解析する。
- (7) 生体内細胞の燐脂質の分布を解析する。

4. 研究成果

- (1) 新規のプローブの開発により、イノシトールリン脂質の 1 つである PI(4)P, PI(3)P の微細局在についても解析が可能となり、現在、細胞膜および各種細胞内オルガネラにおける微細分布の解析を行っている。
- (2) 我々が開発してきた QF-FRL 法では、従来の方法では、培養細胞の細胞膜の外葉 (E 面) と内葉 (P 面) しか観察できないという欠点を有する。そこで、本研究では培養細胞の細胞内も急速凍結し、電子顕微鏡下で鮮明に観察でき、しかも脂質の微細局在を観察できる方法を開発・確立することを目的の 1 つとする。

細胞を培養する金箔の表面をペーパーヤスリで処置することにより、凍結割断される箇所が細胞内となり、電子顕微鏡下で細胞膜の他に核膜、ミトコンドリア、ゴルジ体などを明瞭に観察することが出来た。

小胞体に関しては、細胞膜や他のオルガネラ (細胞膜やエンドソームなど) と区別することが困難であったため、小胞体のマーカーであるチトクローム b5 の膜貫通領域と GFP の融合タンパク質 (GFP-b5) を Huh7 細胞に強制発現し、抗 GFP 抗体で標識することで他のオルガネラとの区別を行った。その結果、抗 GFP 抗体で標識され

る小胞体膜を特異的に標識することに成功した。

イノシトール燐脂質である PI(4,5)P₂ は従来の報告より、細胞膜の他にも、ゴルジ体、小胞体などにも存在することが示唆されていた。しかしながら、QF-FRL 法で約 50 枚のレプリカ膜において PI(4,5)P₂ の標識を試みた結果、細胞膜には PI(4,5)P₂ の標識は確認することは出来たが、ゴルジ体、小胞体には PI(4,5)P₂ の標識は観察出来なかった。他にも核膜、あるいは特定できない細胞内オルガネラ膜にも PI(4,5)P₂ の標識はなかった。細胞膜での標識は GST-PH_{K30N,K32N} では観察されなかったことより、細胞膜には PI(4,5)P₂ は局在するが、他の細胞内オルガネラには局在しないことが示唆された。以上の結果から、QF-FRL 法において、従来の方法を改善、つまり金箔表面にペーパーヤスリで処置を施した上に細胞を培養し、そして急速凍結を金属圧着法の代わりに加圧凍結することにより、細胞内オルガネラを電子顕微鏡下で鮮明に観察することができた。また PI(4,5)P₂ は QF-FRL 法では、細胞膜の他には観察できなかったことより、細胞内のオルガネラ膜にはほとんど存在しないか、あるいは存在したとしても非常に少ないものであることが示唆された。

(3) 従来の QF-FRL 法では、培養細胞の脂質分布に最適な方法開発に特化した技術を開発してきた。本研究では、動物生体内の組織にも応用できる技術を開発・確立する。動物生体内の組織としては、分化の進んだ細胞を効率良く観察できるようにするために、ラットの膵臓の外分泌細胞を標的に方法の開発を試みた。

加圧凍結装置で急速凍結したラット膵臓のレプリカ膜を電子顕微鏡下で観察することにより、細胞膜、核膜、小胞体、ゴルジ体、分泌顆粒、ミトコンドリアなどが観察することができた。

従来の方法を用いることにより PI(4,5)P₂ を標識することに成功した。細胞膜での PI(4,5)P₂ の微細分布はランダム型となり、クラスターなど特別な分布様式は示さないことがわかった。また、膵臓の外分泌細胞を形成し、その密着帯により、細胞膜は apical (管腔) 側と basolateral (側底) 側に分かれ、通常、タンパク質などの分子分布が異なり、それに伴って機能が異なることが分かっている。PI(4,5)P₂ の標識密度を測定した結果、apical 側と basolateral 側で標識密度の違いはなく、PI(4,5)P₂ の分布の違いは見出せなかった。

しかしながら、隣接した細胞間での物質的やり取りに重要な gap junction (GJ) 領域では、PI(4,5)P₂ の標識密度は周りの細胞膜領域より高いことがはじめて明らかとなった。これは GJ を形成する connexin の活性化の維持が、connexin 分子の細胞膜貫通

領域付近での PI(4,5)P₂ の結合に依存していることとよく一致する。

一方、細胞内オルガネラにおいては、PI(4,5)P₂ の標識はほとんど見当たらなかった。唯一、分泌顆粒の P 面 (細胞内側) に PI(4,5)P₂ の標識は確認できたものの、ネガティブコントロールである GST-PH_{K30N,K32N} でも標識が確認されたことより、分泌顆粒での PI(4,5)P₂ の標識は非特異的標識である可能性が考えられる。

以上の結果より、QF-FRL 法の応用により、生体内組織での脂質分布を検討できることが明らかとなった。その結果、ラット膵臓の外分泌細胞での PI(4,5)P₂ は細胞膜には局在するが、その分布は GJ で密度が高くなっていることがわかり、apical 側、basolateral 側では局在密度は異なることがわかった。また細胞内オルガネラでは、PI(4,5)P₂ の局在はほとんどないことが示唆された。

(4) 新たな QF-FRL 法の技術開発により、細胞内を観察する技術は哺乳類細胞だけではなく、酵母細胞でも応用できるようになった。また、新規のプローブ開発により、PI(4,5)P₂ のみでなく、他のイノシトール燐脂質、つまり PI(3)P についても、哺乳類細胞および酵母細胞内での微細分布を検討することが可能となった。

飢餓時での細胞内物質代謝に非常に重要な細胞内オルガネラの一つにオートファゴソームが存在する。通常の栄養状態では存在しないが、細胞が飢餓状態になると、自食作用のために細胞質内でオートファゴソームが形成され、細胞内での栄養成分の再構成がなされる。オートファゴソームは細胞質内の各種栄養素を取り囲み、リソソーム (哺乳類細胞) あるいは液胞 (酵母などの植物) へと輸送した後、細胞自身の栄養状態をコントロールすると考えられており、オートファゴソームの形成不全には様々な疾患に関係することがわかっている。様々な研究から、このオートファゴソームの形成に重要な分子機構が明らかにされつつあるが、その形成機構、とくに形成起源には不明な点が多く、現在その機構はよくわかっていないのが現状である。オートファゴソームの形成は phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) が重要であることが解明されており、その産物であるイノシトール燐脂質の PI(3)P がオートファゴソーム形成に直接関与することが示唆されている。そこで本研究では、オートファゴソームの形成機序解明に向け、PI(3)P の微細分布について検討した。

まず、GST-PX の PI(3)P への特異性を検討した。各種イノシトール燐脂質 (PI, PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(4,5)P₂, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(3,4,5)P₃, 5%) とホスファチジルコリン (PC, 95%) を含むリポソームを作製し、これらのリポソーム

を急速凍結し、凍結切断装置を用いることにより、リポソームのレプリカ膜を形成した。これらのリポソームから作製したレプリカを GST-PX で標識したところ、PI(3)P/PC から作製したレプリカのみには標識が無いことを確認できた。また、GST-PXR^{58A} の標識はたとえ PI(3)P/PC のリポソームのレプリカ膜でも標識は全くなかった。このことから GST-PX は PI(3)P を特異的に標識することが確認することができた。また、PC と PI(3)P を 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 5% 含むリポソームからレプリカ膜を作製し、GST-PX で標識したところ、PI(3)P の濃度に依存して標識密度が高くなることを確かめた。

出芽酵母を窒素・炭酸欠乏 S 培地で培養することにより、酵母細胞内に二重膜で形成されたオートファゴソームが見受けられた。GST-PX の標識は、二重膜の内膜、外膜の両方に観察されたが、どちらの脂質二重層も主に腔内に面する外葉 (E-face, EF) に存在し、内葉 (P-face, PF) には少しだけ観察された。これらの標識は GST-PXR^{58A} では見受けられず、また PI3K 欠損酵母では GST-PX の標識は観察出来なかった。以上のことから、酵母細胞では PI(3)P はオートファゴソームの内膜と外膜の内、主に外葉 (腔内側) に局在することがわかった。

次に、哺乳類培養細胞でのオートファゴソームにおける PI(3)P の微細分布について検討した。哺乳類細胞では、bafilomycin A1 存在下に Torin1 を処置することによりオートファゴソームの誘導が観察される。Torin1 はオートファゴソームを誘導することで有名な薬物であるが、bafilomycin A1 の作用機序はあまり良くわかっておらず、おそらくオートファゴソームがリソソームに融合することを抑制するものと考えられる。このように bafilomycin A1 の作用機序は完全にはわかっていないが、電子顕微鏡で観察する限り、Torin1 と bafilomycin A1 を同時に処置することにより、細胞内には二重膜で覆われたオートファゴソームが多数観察されるようになった。GST-PX と GFP-LC3 の二重標識を行った結果、オートファゴソームの内葉 (PF) のみ、つまり GFP-LC3 とのみ共局在し、外葉 (EF) には両標識は全く局在していなかった。このことから、哺乳類細胞では酵母細胞とは全く逆に、PI(3)P はオートファゴソームの二重膜の内、内膜と外膜の内葉 (細胞質側) にのみ局在するものと考えられる。

以上の結果から、酵母細胞と哺乳類細胞でのオートファゴソームでの PI(3)P の分布は全く逆になることがわかった。現在までの理解では、PI(3)P はオートファゴソームの細胞質側に局在し、オートファゴソームの形成に関係していると考えられてきた

が、酵母細胞のオートファゴソームでは、逆、つまり腔内側に存在することが判明した。このことから、酵母細胞では、オートファゴソーム形成の初期 (隔離膜) の段階では、PI(3)P は二重膜の両方、つまり細胞質側と腔内側の両方に局在し、形成の途中で細胞質側の PI(3)P が消失すると考えられる。では、なぜ細胞質側の PI(3)P が消失してしまうのか? PI(3)P は phosphatase により脱リン酸化され、PI に変換される。酵母細胞には myotubularin-related phosphatase (Ymr1P) と synaptojanin-like phosphatase (Sjl3p) が存在する。Ymr1P と Sjl3p の両方を欠損した酵母細胞 (ymr1 Δ sjl3 Δ 酵母) では、細胞質側の PI(3)P も局在し、腔側との比は約 1 となり、細胞質側と腔側の PI(3)P の存在は同等になった。このことより、酵母細胞でのオートファゴソームに PI(3)P が細胞質側に極端に少ないのは、オートファゴソーム形成後に細胞質側に局在する PI(3)P が phosphatase により脱リン酸化されるためと考えられる。このことは ymr1 Δ sjl3 Δ 酵母ではオートファゴソームが非常に少ないという報告とよく一致する。また、ymr1 Δ sjl3 Δ 酵母ではオートファゴソーム形成に深く関与する Atg8 へのホスファチジルエタノールアミンの結合は抑制されていないということから、PI(3)P の局在変化はオートファゴソームの形成に強く影響するものと考えられる。

以上のことより、酵母細胞と哺乳類細胞でのオートファゴソームにおける PI(3)P の局在が異なることから、オートファゴソームの形成機序が酵母細胞と哺乳類細胞では異なると思われる。オートファゴソームの形成機序はまだ不明な点が多く、今回判明した事実はその形成機序解明に向け非常に重要な報告であることが言える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① [Fujita, A., Inanobe, A., Hibino, H., Nielsen, S., Ottersen, O.P. and Kurachi, Y.](#) Clustering of Kir4.1 at specialized compartments of the lateral membrane in ependymal cells of rat brain. **Cell Tissue Res.** 59, 627-634, 2015. 【査読有】

② [Cheng, J., Fujita, A., Yamamoto, H., Tatematsu, T., Kakuta, S., Obara, K., Ohsumi, Y., Fujimoto, T.](#) Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. **Nat. Commun.** 5, Article number: 3207, 2014. 【査読有】

③ [Fujita, A., Fujimoto, T,](#)

Ozato-Sakurai, N., Suzuki, H. A method for efficient observation of intracellular membranes of monolayer culture cells by quick-freeze and freeze-fracture electron microscopy. **J. Electron Microsc.** 61, 441-446, 2012. 【査読有】

④ Ozato-Sakurai, N., Fujita, A., Fujimoto, T. The distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in acinar cells of rat pancreas revealed with the freeze-fracture replica labeling method. **PLoS One.** 6, e23567, Aug, 2011. 【査読有】

⑤ Kawai, Y., Hamazaki, Y., Fujita, H., Fujita, A., Sato, T., Furuse, M., Fujimoto, T., Jetten, A.M., Agata, Y., Minato, N. Claudin-4 induction by E-protein activity in later stages of CD4/8 double-positive thymocytes to increase positive selection efficiency. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 108, 4075-4080, Mar, 2011. 【査読有】

〔学会発表〕（計 2 件）

① 藤田秋一, 程晶磊, 藤本豊士: 免疫電顕法を用いたホスホイノシタイトの微細局在, 第 55 回日本平滑筋学会総会, シンポジウム, 大雪クリスタルホール (北海道旭川市), 2013 年 8 月 7 日 【招待講演】

② 藤田秋一: 細胞膜における脂質分子ナノスケールレベルでの局在解析, 第 5 回トランスポーター研究会九州部会, シンポジウム, ホテル JAL シティ宮崎 (宮崎県宮崎市), 2011 年 9 月 17 日 【招待講演】

〔図書〕（計 1 件）

① 藤田秋一, 脂質の構造と生体膜、「獣医生化学」、朝倉書店、2015. 印刷中

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-Mol/bunshibyoutai01/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 秋一 (FUJITA, Akikazu)
鹿児島大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：60282232

(2) 研究分担者
「なし」

(3) 連携研究者
「なし」