

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790115

研究課題名（和文） 新しい脂質ラフト特異的プローブの開発とその利用

研究課題名（英文） Development of new lipid raft probe

研究代表者

牧野 麻美 (MAKINO ASAMI)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・特別研究員

研究者番号：20373368

研究成果の概要（和文）：

脂質ラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ細胞膜脂質ドメインで、膜を介する情報伝達、細胞内膜輸送、ウイルスや細菌の感染など様々な生物現象に重要であると考えられている。しかし、脂質ラフトの実体についてはまだ分からないことが多い。私は食用キノコを材料にスフィンゴミエリンとコレステロールの複合体に特異的に結合するタンパク質のスクリーニングを行い、新規タンパク質を同定した。本研究ではこのタンパク質と他の脂質ラフト結合性のプローブを併用して脂質ラフトの構造と動態を明らかにするとともに、ウイルス感染における脂質ラフトの役割の解明を目標にしている。

研究成果の概要（英文）：

Lipid rafts are plasma membrane lipid domains enriched in sphingolipids and cholesterol. The size, composition and function of lipid rafts are matters of debate partially because of the lack of an appropriate probe to visualize them *in situ*. We identified a novel, non-toxic mushroom protein that specifically binds a complex of sphingomyelin (SM), a major sphingolipid in mammalian cells, and cholesterol. The purified protein, termed Nakanori, labeled cell surface domains in SM and cholesterol-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脂質ラフト、コレステロール、スフィンゴミエリン、インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

脂質ラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ細胞膜脂質ドメインで、膜を介する情報伝達、細胞内膜輸送、ウイルスやバ

クテリアの感染など様々な生物現象に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、脂質ラフトの実体についてはまだ分からないことが多い。脂質ラフトの本質に迫る上

で「脂質を見る」ことは非常に重要な意味を持っている。ラフトを見る道具として、これまでに糖脂質の一種であるガングリオシド GM1 に特異的に結合するコレラ毒素が広く利用されており、実際コレラ毒素の無毒のB サブユニットを蛍光標識したものは「脂質ラフトキット」として販売されている。このほかラフトに濃縮されているグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 結合タンパク質もラフトのマーカーとして利用されている。私はこれまでに脂質ラフトの主要構成成分であるスフィンゴミエリンに特異的に結合するタンパク質、ライセニンを用いて、細胞表面の脂質ラフトの不均一性を明らかにし (J Biol Chem **278**, 22762 (2003); Biophys J **86**, 296 (2004); Biochemistry **43**, 9766 (2004); J Biol Chem **280**, 24072 (2005))、またコレステロールに富んだドメインに強い親和性を持っているコレステロールのポリエチレングリコール誘導体 (PEG-Chol) を開発し、細胞内のコレステロールの動態の解析を行ってきた (J Biol Chem **279**, 23790 (2004))。

2. 研究の目的

脂質ラフトの本質はスフィンゴ脂質とコレステロールが作る複合体の特異的な物性にあると考えられる。したがってスフィンゴ脂質やコレステロールを別々に見たのでは厳密な意味では脂質ラフトを見たとは言えない。つまりスフィンゴ脂質とコレステロールが複合体を形成したときにのみ膜に結合できるようなプローブが最も望ましい脂質ラフトプローブであると言える。スフィンゴ脂質とコレステロールの複合体に結合するタンパク質はこれまでにイソギンチャクや食用キノコから単離されているが、毒性が高い、特異性が低い、等の理由からラフトプローブとしての利用には至っていない。私は食用キノコを材料にスフィンゴミエリンとコ

レステロールの複合体に特異的に結合するタンパク質のスクリーニングを行い、分子量2万の新規タンパク質の同定に成功した (特願 2010-112681)。下段左の図は種々の脂質をコレステロールと1:1に混合し、固相法でこのタンパク質の結合を見たものである。このタンパク質はスフィンゴミエリン (SM) とコレステロールの混合物のみに結合することがわかる。また右の図はスフィンゴミエリンとコレステロールを種々の割合で混合した脂質混合物へのこのタンパク質の結合を見たものである。このタンパク質はスフィンゴミエリンのみ (S/C=10/0) あるいはコレステロールのみ (S/C=0/10) には結合しないが両者を混合することによって結合が見られるようになる。上記の結果は新規タンパク質を用いることで脂質ラフトの解析が大きく進む可能性を示唆している。本研究では新規タンパク質と私達がこれまでキャラクタライズしてきた種々の脂質結合タンパク質を駆使し、脂質ラフトの構造と動態を明らかにし、さらに新規タンパク質のラフト依存性ウイルス感染への影響について解析する。

3. 研究の方法

① 脂質ラフトの構成成分は細胞膜上でどのように分布し、運動しているのか

本研究では脂質ラフトの主要構成成分、スフィンゴミエリン、コレステロールおよびスフィンゴミエリン・コレステロール複合体をそれぞれ異なったプローブで標識し、その分布と動態を解析する。そのためにスフィンゴミエリンに特異的に結合するタンパク質ライセニン、コレステロールに特異的に結合するタンパク質・トキシシ、および私達の開発した新規タンパク質を使用し、それぞれをgreen fluorescence protein (GFP) あるいはred fluorescence protein (RFP) で修飾する。ラ

イセニン、・トキシンはそれぞれ毒素であるため、無毒化した脂質結合フラグメントを使用する。本研究ではこれらの脂質プローブを用い、fluorescence correlation spectroscopy (FCS)や1分子解析によりそれぞれの脂質ドメインの動態を測定する。それぞれの脂質の詳細な分布については共焦点レーザー顕微鏡や全反射顕微鏡によるプローブの分布の解析を行うとともに、laurdan di-4-ANEPPDHQ (Proc Natl Acad Sci USA 100, 15554 (2003))等の膜環境依存性の色素を併用し、膜の物性と脂質の分布との相関を明らかにする。詳細な脂質ドメインの膜分布は電子顕微鏡を用いたrip-off法 (J Biol Chem 280, 24072 (2005))による免疫電顕を行う。

② 脂質ラフトの裏側を含めた脂質ラフトの全体像はどのようなになっているのか
本研究では2つの顕微鏡手法を導入し、脂質ラフトの全体像を明らかにする。ひとつはSDS-Freeze fracture Replica Labeling (SDS-FRL)法 (J Cell Sci 109, 2453 (1996))であり、もうひとつはPhotoActivation Localization Microscopy (PALM)である。SDS-FRL法はサンプルを急速凍結切断(フリーズフラクチャー)した後、SDS処理によって脂質をマトリクスに保持できることが特徴で、これによって脂質プローブによる脂質の標識が可能になる。脂質プローブをさらに金コロイドで標識することにより、電子顕微鏡による膜の表裏の脂質分布を調べることができる。PALMは1分子イメージングに基づく蛍光観察法で、SDS-FRLに比べ操作に要する時間は非常に短く、なおかつ数十ナノメートルの解像能で脂質ラフトの分布を調べることが可能である。本研究では脂質の分布に加え、脂質ラフトに集積しているといわれるシグナル分子や細胞骨格を同時に観察し、脂質ラフトの全体像に迫る。

③ ウイルス感染において脂質ラフトはどのような役割を果たしているのか

インフルエンザウイルス、エイズウイルス等いくつかのエンベロープウイルスは宿主の脂質ラフトで覆われた膜を持っている。本研究でインフルエンザウイルス感染に焦点を当て、脂質ラフトの機能を解析するとともに、脂質ラフトプローブのウイルス感染への影響を解析する。

4. 研究成果

初めにこのタンパク質の脂質への結合をいくつかの方法を用いて調べた。その結果、ELISA法、リポソーム結合法において、SM/Cholに特異的に結合することがわかった。このタンパク質を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡下で観察すると、細胞表面は一様に染まり、SMのプローブであるライセニンと共局在した。細胞内の染色では、後期エンドソームを染色し、これもライセニンと共局在した。

1分子イメージングに基づく蛍光観察法PALM顕微鏡でラフトを観察すると、ラフトに存在するといわれているタンパク質(H-Ras)と共局在する一方、ラフト依存的でないK-Rasとは一致しなかった。以上の結果からこの新規タンパク質がラフトマーカーとして使用できることが示唆された。

次に、我々は細胞内にコレステロールが蓄積する病気、ニーマンピックC型病患者(NPC)の細胞を用いて、この細胞の脂質ラフトがどうなっているか調べた。この実験では膜環境依存性の色素laurdan di-4-ANEPPDHQ (Proc Natl Acad Sci USA 100, 15554 (2003))を用いて全反射顕微鏡下で実験を行った。その結果、正常細胞では細胞表面が一様に染まるのに対し、NPC細胞では細胞表面にドメインを形成していることが示唆された。電子顕微鏡による観察でも同様の結果が得られた。

最後に、近年インフルエンザウイルスの感染に脂質ラフトが重要な役割をしているという報告があることから、このタンパク質を用いて、ウイルスの感染阻害を試みた。その結果、タンパク質があると、インフルエンザウイルスが細胞からリリースされるのが阻害されることがわかった。まだどのような機構で阻害されるかは明らかになっていないが、今後の研究により、このタンパク質が抗インフルエンザ薬として使用できる可能性を示唆している。

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 3 件)

- ① Hullin-Matsuda F, Tomishige N, Sakai S, Ishitsuka R, Ishii K, Makino A, Greimel P, Abe M, Laviad EL, Lagarde M, Vidal H, Saito T, Osada H, Hanada K, Futerman AH, Kobayashi T. (2012) Limonoid compounds inhibit sphingomyelin biosynthesis by preventing CERT protein-dependent extraction of ceramides from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 287(29):24397-411 査読有
- ② Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kamiyo K, Ohno-Iwashita Y, Hanada K, Mizuno H, Miyawaki A, Kobayashi T. (2012) A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. *Mol Cell Biol*. 32(8):1396-407 査読有
- ③ Tan HH, Makino A, Sudesh K, Greimel P, Kobayashi T. (2012) Spectroscopic evidence for the unusual stereochemical configuration of an

endosome-specific lipid. *Angew Chem Int Ed Engl*. 51(2):533-5 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kamiyo K, Ohno-Iwashita Y, Hanada K, Mizuno H, Miyawaki A and Kobayashi T. A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. International Conference on Membrane Domains, Dijon, France, November 27-30, 2012.
- ② Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F, and Kobayashi T. A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. Lipid-Protein Interactions in Membranes: Implications for Health and Disease, Hyderabad, India, November 1-5, 2012.
- ③ Hullin-Matsuda F, Tomishige N, Sakai S, Ishitsuka R, Ishii K, Greimel P, Makino A, Abe M, Laviad E, Hanada K, Futerman A and Kobayashi T. Limonoid Compounds Inhibit Sphingomyelin Biosynthesis by Preventing CERT-dependent Extraction of Ceramides from the Endoplasmic Reticulum. EMBO workshop on Molecular Medicine of Sphingolipids, Ramot, Israel, Oct 16-21, 2012.
- ④ Tan H-H, Makino A, Sudesh K, Greimel P, and Kobayashi T. Spectroscopic Evidence for the unusual stereochemical configuration of an

endosome-specific lipid,
bis(monoacylglycero)phosphate. 53rd
International Conference on the
Bioscience of Lipids, Banff Alberta,
Canada, September 5-8, 2012.

- ⑤ Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F,
Kamijo K, Ohno-Iwashita Y, Hanada K,
Mizuno H, Miyawaki A and Kobayashi T.
A role for sphingomyelin-rich lipid
domains in the accumulation of
phosphatidylinositol-4,5-bisphospha
te to the cleavage furrow during
cytokinesis. Gordon Reseach
Conference on Glycolipid and
Sphingolipid Biology, Lucca, Italy,
April 22-27, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 麻美 (MAKINO ASAMI)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学
研究室・特別研究員

研究者番号：20373368

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし