

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25711012

研究課題名(和文) 微絨毛形成におけるスフィンゴミエリンの機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of roles of sphingomyelin in the formation of microvilli

研究代表者

池ノ内 順一 (Ikenouchi, Junichi)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10500051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：微絨毛は上皮細胞のアピカル膜に存在する動的な細胞膜の突起構造である。微絨毛は外界との物質やシグナルの交換の場として機能する細胞膜構造であるが、その形成がどのように制御されているかについては未解明である。先行研究ではアクチン細胞骨格の制御の観点から微絨毛の形成機構が解析されてきた。私たちは、微絨毛にスフィンゴミエリンが集積し、微絨毛形成に重要な役割を果たしていることを見出した。更にスフィンゴミエリンと相互作用する膜タンパク質を同定し、スフィンゴミエリンによるアクチン細胞骨格の制御機構についても明らかにした。並行して、微絨毛とは異なる形質膜の突起構造であるブレブの形成機構についても解析を行った。

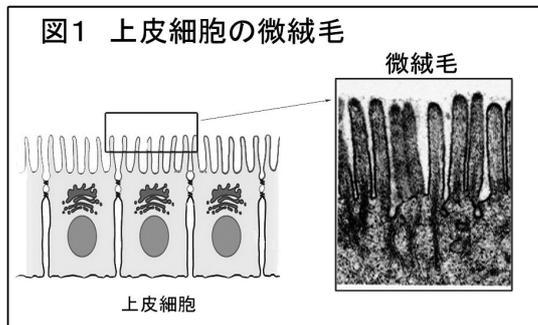
研究成果の概要(英文)：Microvilli are dynamic filamentous-actin-based protrusions of the plasma membrane that are found in the apical membrane of epithelial cells. However, it remains poorly understood how their formation is regulated. The importance of regulators of actin cytoskeleton in the formation of microvilli had been revealed in the previous studies; however, the contribution of membrane lipids in the formation of microvilli has been largely underestimated. In this research project, we found that sphingomyelin clustering underlies the formation of microvilli. Furthermore, we clarified how sphingomyelin cluster regulates actin cytoskeleton in the formation of microvilli. We also examined the molecular mechanisms of membrane bleb, which is another protrusion of plasma membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微絨毛 スフィンゴミエリン ブレブ アクチン細胞骨格 細胞膜突起構造

1. 研究開始当初の背景

微絨毛は上皮細胞のアピカル膜に形成される細胞膜構造である(図1)。微絨毛は、外界との物質交換の場として機能することが知られているが、近年、トランスポーターなどの機能性膜タンパク質が選択的に濃縮していることがわかり、シグナル情報伝達の重要な膜ドメインとして着目されている。微絨毛は、アクチン細胞骨格に裏打ちされた細胞膜の突出した構造であるが、その形成メカニズムについては不明な点が多い。微絨毛の形成に必要なタンパク質として、Ezrin/Radixin/Moesin や Epsin, Villin などのタンパク質が既に同定されているが、いずれもアクチン細胞骨格の制御因子であり、研究開始当初は、微絨毛の細胞膜脂質に関する先行研究は殆ど報告が無い状況であった。



2. 研究の目的

私は本研究提案の開始時に、微絨毛にスフィンゴミエリンという脂質分子が集積していることを見出し、スフィンゴミエリンの集積が微絨毛の形成にどのように寄与しているかを解明することを試みた。具体的には、微絨毛の形成にスフィンゴミエリンが必要であるか否かを検討し、必要であった場合はスフィンゴミエリンがどのような膜タンパク質と相互作用することで微絨毛の形成を制御しているかを解明することを目的とした。

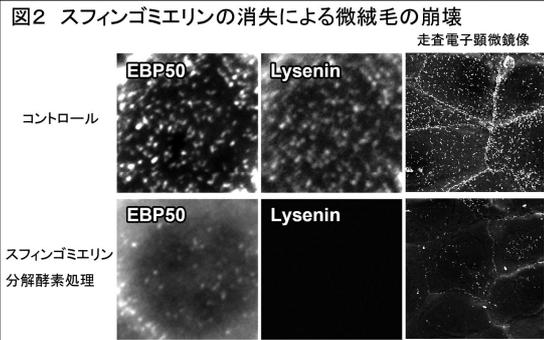
3. 研究の方法

私は、細胞膜脂質のシマミミズの体腔液中に含まれるスフィンゴミエリン結合タンパク質の Lysenin (ライセニン) をスフィンゴミエリンの可視化プローブとして用いて、蛍光抗体法ならびに免疫電顕法によって、微絨毛にスフィンゴミエリンが濃縮しているか否かを検討した。

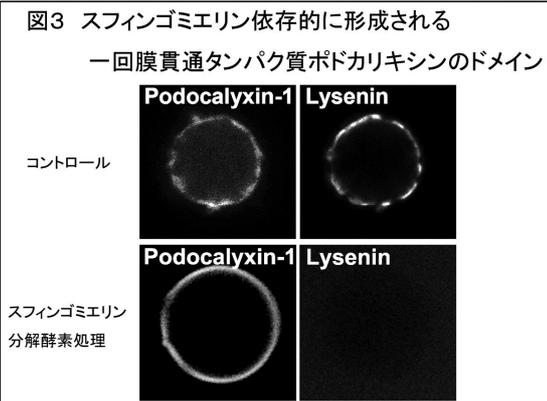
さらにスフィンゴミエリン分解酵素を用いて、アピカル膜のスフィンゴミエリンを消失させたときに微絨毛にどのような形態学的な変化が生じるかについて、解析を行った。

4. 研究成果

細胞膜脂質のシマミミズの体腔液中に含まれるスフィンゴミエリン結合タンパク質の Lysenin (ライセニン) を用いて、微絨毛にスフィンゴミエリンが濃縮していることを見出した。さらに、アピカル膜にスフィンゴミエリン分解酵素を作用させることでスフィンゴミエリンの量を減少させることにより、微絨毛が消失することを見出した(図2)。

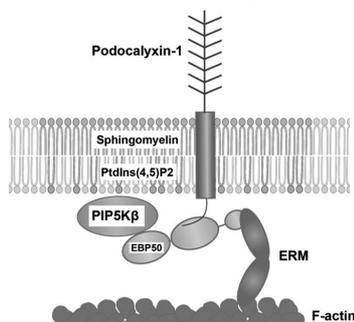


微絨毛の形成に必須であるタンパク質としてポドカリキシンという1回膜貫通型のタンパク質が知られているが、形質膜からリボソームを形成すると、ポドカリキシンはスフィンゴミエリンと同じ膜ドメインに存在し、スフィンゴミエリンを消失させるとポドカリキシンのドメイン状の分布も解消されることから、スフィンゴミエリンとポドカリキシンは協調して膜ドメインを形成する性質を持つことを明らかにした(図3)。



さらにポドカリキシンの結合相手として、EBP-50 と PIP5Kbeta を同定し、微絨毛のアクチン細胞骨格の形成に必要な PIP2 を供給する分子機構としてスフィンゴミエリン/ポドカリキシン/EBP-50/PIP5Kbeta からなる分子複合体を同定した(次項、図4)。以上の成果を、論文として報告した(Ikenouchi et al. *J Cell Sci.* 2013)。

図4 スフィンゴミエリンと共局在する分子複合体



(Ikenouchi et al. J Cell Sci. 2013)

微絨毛は、アクチン細胞骨格に裏打ちされた細胞膜の突起構造である。微絨毛とは異なり、アクチン細胞骨格に裏打ちされない細胞膜の突出構造としてブレブが挙げられる。微絨毛の形成メカニズムとブレブの形成メカニズムを比較することで細胞膜と細胞骨格の相互作用に関して普遍的な知見が得られるのではないかと考えて、研究期間の後半では細胞膜のブレブの形成メカニズムに焦点を当てて研究を行った。

ブレブとは細胞膜と細胞骨格の相互作用が一過性に破綻することによって形成される、風船状の細胞膜の突出構造である。ブレブ形成の分子メカニズムは殆ど明らかになっていなかったが、研究期間中に以下のことを明らかにすることができた。

まず、ブレブの形成の初期段階には低分子量 G タンパク質の Rnd3 が特異的に細胞膜に集積することを見出した。Rnd3 は p190RhoGAP-B を活性化して、RhoA の活性化を抑制する。やがて、ブレブの突出膜構造が拡大すると、Rnd3 の濃度が低下する。すると、RhoA が一部で活性化されて RhoA により ROCK が活性化された結果、ROCK が Rnd3 をリン酸化して形質膜から Rnd3 を排除する。すなわち、ひとたび RhoA が活性化すると Rnd3 による RhoA の阻害効果が失われるため、一気に RhoA の活性化が引き起こされる。RhoA の活性化は Eps8 や Ezrin といったアクチン細胞骨格の制御因子を活性化して、アクチン細胞骨格の再形成と細胞膜とアクチン細胞骨格の安定的な接着を回復させる。細胞膜とアクチン細胞骨格の安定的な接着の回復によりブレブの縮退が起こる。このようにブレブの継続的な形成と縮退を繰り返すメカニズムを明らかにすることができ、以上の成果を、論文として報告した (Aoki et al. PNAS 2016)。

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6件)

(1)

Aoki K, Maeda F, Nagasako T, Mochizuki Y, Uchida S, Ikenouchi J.

A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Mar 29;113(13):E1863-71.

doi:

10.1073/pnas.1600968113.

(2)

Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, Ikenouchi J.

CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier.

Sci Rep. 2015 Aug 18;5:13262.

doi: 10.1038/srep13262.

(3)

Arita Y, Nishimura S, Ishitsuka R, Kishimoto T, Ikenouchi J., Ishii K, Umeda M, Matsunaga S, Kobayashi T, Yoshida M.

Targeting cholesterol in a liquid-disordered environment by theonellamides modulates cell membrane order and cell shape.

Chem Biol. 2015 May 21;22(5):604-10.

doi: 10.1016/j.chembiol.2015.04.011.

(4)

Ohoka A, Kajita M, Ikenouchi J., Yako Y, Kitamoto S, Kon S, Ikegawa M, Shimada T, Ishikawa S, Fujita Y.

EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells.

J Cell Sci. 2015 Feb 15;128(4):781-9.

doi: 10.1242/jcs.163113.

(5)

Oda Y, Otani T, Ikenouchi J., Furuse M.

Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42.

J Cell Sci. 2014 Oct 1;127(Pt 19):4201-12.

doi: 10.1242/jcs.150607.

(6)

Ikenouchi J., Hirata M, Yonemura S, Umeda M.

Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli.

J Cell Sci. 2013 Aug 15;126(Pt 16):3585-92.

doi: 10.1242/jcs.122325.

[学会発表](計5件)

(1)

池ノ内 順一、塩見 僚、重富 健太

上皮間葉転換における細胞膜脂質の質的変化の意義について: BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会): 2015年12月3日: 神戸(口頭発表)

(2)

池ノ内 順一

上皮細胞のバリア機能の人為的制御に向けて、日本薬学会第135回年会：2015年3月27日：神戸（口頭発表）

(3)

池ノ内 順一

細胞膜脂質による微絨毛形成の制御機構：第87回日本生化学会大会：2014年10月17日：京都（口頭発表）

(4)

池ノ内 順一

Elucidation of the roles of membrane lipids in the progression of epithelial-mesenchymal transition, 日仏がんワークショップ：2013年11月21日：Toulouse, France（口頭発表）

(5)

池ノ内 順一, 米村重信, 梅田真郷

Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli.: 第65回日本細胞生物学会大会：2013年6月21日：名古屋（口頭発表）

〔図書〕(計2件)

池ノ内 順一

上皮細胞の極性形成とリン脂質：医学のあゆみ「生命を支える脂質」(医歯薬出版)
248巻13号：2014年 p1166-1170

池ノ内 順一

脂質の機能：生体膜の分子機構（化学同人）
p85-116（第4章執筆担当）

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：タイトジャンクション形成促進を評価するための細胞およびタイトジャンクション形成促進剤

発明者：池ノ内 順一、塩見僚

権利者：国立大学法人九州大学

種類：PCT 国際出願

番号：PCT/JP2015/061374

出願年月日：2015年4月13日

国内外の別：国際

〔その他〕

研究室のホームページ

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池ノ内 順一 (IKENOUCHI, Junichi)

九州大学大学院・理学研究院・准教授