

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06677

研究課題名(和文)細胞膜内層のスフィンゴミエリンの解析-フリッパーゼの同定と生理的意義の解明-

研究課題名(英文) Identification of proteins involved in the transbilayer movement of sphingomyelin

研究代表者

阿部 充宏 (Abe, Mitsuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：90415068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝学的なスクリーニングにより、スフィンゴミエリン(SM)のflipに関わる候補遺伝子として、PMP2を同定した。PMP2遺伝子のノックアウト細胞では、蛍光ラベルしたNBD-SMのflipがcontrolに比べて起こりにくくなっていた。PMP2を過剰に発現させた細胞では、SMはcontrolに比べて細胞膜外層で減少し、内層で増加していた。NBD-SMを添加した人工膜に、リコンビナントのPMP2タンパク質を反応させたところ、NBD-SMが人工膜の片方の層からもう一方の層へflipされていた。以上の結果から、PMP2はSMを細胞膜外層から内層へflipさせる活性を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリセロ脂質に関しては、P4-ATPaseファミリーに属するflippaseによって、細胞膜における非対称性が生み出される。グリセロ脂質の非対称性は、アポトーシス、細胞膜の曲率変化、小胞輸送、細胞膜極性にとって重要な働きを担っていること報告されている。一方、SMを含めスフィンゴ脂質に関しては、非対称性を生み出す分子機構、およびその生理的意義はほとんどわかっていなかった。今回見出したPMP2によるSMのflipは、スフィンゴ脂質のflipの初めての例である。今後、SMの非対称性を変えた変異細胞を用いて、ウイルス感染や末梢神経疾患に対する薬剤の開発など、応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Sphingomyelin (SM) is a mammalian lipid mainly distributed in the outer leaflet of the plasma membrane (PM). We show that peripheral myelin protein 2 (PMP2) can localize at the PM and controls the transbilayer distribution of SM. Genetic screening with genome-wide small hairpin RNA libraries identifies PMP2 as a protein involved in the transbilayer movement of SM. A biochemical assay demonstrates that PMP2 is a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2)-binding protein. PMP2 induces the tubulation of model membranes in a PI(4,5)P2-dependent manner, accompanied by the modification of the transbilayer membrane distribution of lipids. In the PM of the PMP2-overexpressing cells, inner-leaflet SM is increased whereas outer-leaflet SM is reduced. PMP2 is a causative protein of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). A mutation in PMP2 associated with CMT increases its affinity for PI(4,5)P2 inducing membrane tubulation and the subsequent transbilayer movement of lipids.

研究分野：細胞生物学

キーワード：スフィンゴ脂質 脂質ラフト スフィンゴミエリン フリップ フリッパーゼ 細胞膜 PMP2 PI(4,5)P2

1. 研究開始当初の背景

細胞膜における脂質は、数百種類以上の分子種が存在するが、グリセロ脂質、スフィンゴ脂質、ステロールの3種類に大別される。哺乳動物細胞では、ホスファチジルコリン(PC)・ホスファチジルセリン(PS)・ホスファチジエタノールアミン(PE)がグリセロ脂質の、スフィンゴミエリン(SM)がスフィンゴ脂質の、コレステロールがステロールの主要な構成成分である。細胞膜における脂質二重層の外層と内層では構成成分が大きく異なっており、PCとSMは外層に、PSとPEは内層に非対称に局在することがわかっている。グリセロ脂質の非対称性はP4-ATPaseファミリーに属するフリッパーゼによって生み出されている。一方、スフィンゴ脂質であるSMに関しては、非対称性を生み出す分子機構、およびその生理的意義はほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

SMは主にゴルジ体の内腔側で合成され、小胞輸送によって細胞膜外層に輸送される。一部のSMは細胞膜外層で合成される。いずれの場合にも、SMは合成直後には細胞膜外層に局在する。P4-ATPaseファミリーに属するフリッパーゼはSMを内層にフリップさせる活性はないため、SMは常に細胞膜外層に局在することが予想される。ところが、申請者らによるヒト線維芽細胞の観察では、細胞膜にあるSMの12%は細胞膜内層に局在し、特徴のある脂質ドメインを形成していた。これらを説明するために、合成された直後のSMは細胞膜外層に局在するが、未知の因子によって、少量のSMが細胞膜内層にフリップされ特徴のある脂質ドメインを形成する可能性が考えられた。本研究では、細胞膜内層にフリップさせる因子を同定し、その分子機構を明らかにするとともに、細胞膜内層にあるSMの生理的意義についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SMの細胞膜外層から細胞膜内層へのフリップに必要な因子の同定

SMのフリップに必要な因子を同定するために、ノックダウンのライブラリーを用いて、遺伝学的なスクリーニングを行った。野生型HeLa細胞の細胞質中にSM分解酵素を発現させた場合、細胞膜外層のSM量が低下する。この細胞にノックダウンのライブラリーを導入し、細胞膜外層のSM量が低下しないものを選別した。

(2) SMの細胞膜外層から細胞膜内層への移行の分子機構の解析

(1)で選別された因子に関して、ノックアウト細胞および精製タンパク質を用いて、生化学的解析を行った。細胞膜外層から内層への*in vivo*のフリップ活性を測定するために、ノックアウトされた細胞において、蛍光ラベルされたNBD-SMを細胞膜外層に加えてから一定時間後に、内層のみのNBD-SMを測定した。また、*in vitro*のフリップ活性を測定するために、大腸菌で発現させたりコンビナントタンパク質と、外層のみNBD-SMによってラベルされたリポソームを混ぜ合わせ、一定時間後に内層のみのNBD-SMを測定した。

(3) 細胞膜内層のSMの生理的な機能の解析

(1)で得られた細胞膜内層のSMが減少しているノックアウト細胞に対して、表現型を調べた。また過剰発現細胞についても、表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) SMのフリップに必要な因子の同定

スクリーニングの結果、約10個の原因遺伝子を特定した。このうち、最も強い表現型を示したPMP2タンパク質(peripheral myelin protein 2)について解析を進めた。

(2) SMのフリップの分子機構の解析

PMP2は末梢神経系の神経細胞のミエリン鞘に多く含まれるタンパク質である。このPMP2がSMを細胞膜外層から内層へflipさせるのかを確かめるための実験を行った。まず、ノックアウト細胞では、蛍光ラベルされたNBD-SMは細胞膜外層から内層へflipしにくくなっていることが分かった。さらにPMP2を過剰に発現させた細胞におけるSMをライセニンによって染色し、

全反射顕微鏡や超解像顕微鏡による観察した結果、SM は細胞膜外層で減少し、内層で増加していることが分かった。

細胞膜に存在する数種類の脂質と PMP2 リコンビナントタンパク質との結合能を調べたところ、PMP2 はホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 ($PI(4,5)P_2$) と特異的に結合することがわかった。PMP2 リコンビナントタンパク質存在下で、 $PI(4,5)P_2$ を含んだ人工膜の形状を調べた結果、PMP2 は球状の人工膜の一部からチューブ状の膜構造を形成させることがわかった。細胞膜外層に存在するスフィンゴミエリンのちょうど裏側の内層に $PI(4,5)P_2$ が分布することを考え合わせると、PMP2 は細胞膜内層の $PI(4,5)P_2$ に結合し、脂質二重層の形状を変化させることで、ちょうど表側にある細胞膜外層のスフィンゴミエリンの flip を促進していることが示唆された。

(3) 細胞膜内層の SM の生理的な機能の解析

HeLa 細胞・PMP2 ノックアウト細胞・PMP2 過剰発現細胞において、様々な表現型を比較したが、顕著な違いは観察されなかった。

PMP2 タンパク質の遺伝子は、末梢神経疾患であるシャルコー・マリー・トゥース病の原因遺伝子の一つである。シャルコー・マリー・トゥース病を引き起こす変異型 PMP2 を作製し、今回明らかにした PMP2 の特徴を解析した結果、通常の PMP2 に比べて、 $PI(4,5)P_2$ への結合能、リポソームの変形活性、SM のフリップ活性が増加していることが分かった。これらのことから、通常の培養細胞では表現型は見られないが、末梢神経など特殊な細胞では、細胞膜における SM の非対称性が重要な働きを担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 阿部 充宏	4. 巻 94
2. 論文標題 可視化することでわかってきた細胞膜のスフィンゴミエリンの動態と分布	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 735 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940735	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abe Mitsuhiro, Makino Asami, Murate Motohide, Hullin-Matsuda Francoise, Yanagawa Masataka, Sako Yasushi, Kobayashi Toshihide	4. 巻 37
2. 論文標題 PMP2/FABP8 induces PI(4,5)P2-dependent transbilayer reorganization of sphingomyelin in the plasma membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109935 ~ 109935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kuwashima Yutaro, Yanagawa Masataka, Abe Mitsuhiro, Hiroshima Michio, Ueda Masahiro, Arita Makoto, Sako Yasushi	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative Analysis of Single-Molecule Dynamics of TRPV1 and TRPV4 Channels in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8473 ~ 8473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akiyama Momoko, Ueki Ryosuke, Yanagawa Masataka, Abe Mitsuhiro, Hiroshima Michio, Sako Yasushi, Sando Shinsuke	4. 巻 60
2. 論文標題 DNA Based Synthetic Growth Factor Surrogates with Fine Tuned Agonism**	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 22745 ~ 22752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202105314	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 Ueda Yoshiyumi, Abe Mitsuhiro, Ishiwata Toshiyuki, Ozawa Takeaki	4. 巻 611
2. 論文標題 Sphingomyelin localization in the intestinal crypt surface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 14 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.03.128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Mitsuhiro, Kobayashi Toshihide	4. 巻 100077
2. 論文標題 Imaging cholesterol depletion at the plasma membrane by methyl-β-cyclodextrin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100077 ~ 100077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlir.2021.100077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Abe Mitsuhiro, Kobayashi Toshihide	4. 巻 1310
2. 論文標題 Imaging Sphingomyelin- and Cholesterol-Enriched Domains in the Plasma Membrane Using a Novel Probe and Super-Resolution Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 81 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-33-6064-8_4	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Sato M, Aoki-Saito H, Fukuda H, Ikeda H, Koga Y, Yatomi M, Tsurumaki H, Maeno T, Saito T, Nakakura T, Mori T, Yanagawa M, Abe M, Sako Y, Dobashi K, Ishizuka T, Yamada M, Shuto S, Hisada T.	4. 巻 Nov;33(11)
2. 論文標題 Resolvin E3 Attenuates Allergic Airway Inflammation via the interleukin-23-interleukin-17A Pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 12750-12759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900283R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanagawa Masataka, Hiroshima Michio, Togashi Yuichi, Abe Mitsuhiro, Yamashita Takahiro, Shichida Yoshinori, Murata Masayuki, Ueda Masahiro, Sako Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Single-molecule diffusion-based estimation of ligand effects on G protein-coupled receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaa01917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aao1917	査読の有無 無
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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 阿部充宏
2. 発表標題 細胞膜におけるスフィンゴミエリンの分布を規定している因子
3. 学会等名 第15回セラミド研究会学術集会・第16回スフィンゴセラピィ研究会 合同年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部充宏
2. 発表標題 細胞膜スフィンゴミエリンの脂質二重層内移動に関わる因子の同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部充宏
2. 発表標題 細胞膜スフィンゴミエリンの脂質二重層内移動に関わる因子の同定
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部充宏
2. 発表標題 細胞膜スフィンゴミエリンの脂質二重層内移動に関わる因子の同定と機能解析
3. 学会等名 スフィンゴセラピー研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理研プレスリリース https://www.riken.jp/press/2021/20211110_1/index.html プレスリリース（研究成果）2018 http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180919_1/
--

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

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