

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20634

研究課題名（和文）形質膜におけるリン脂質の非対称性の形成と崩壊に関する解析

研究課題名（英文）Analysis of establishment and breakdown of phospholipid asymmetry in the plasma membrane

研究代表者

小野 由美子 (Ono, Yumiko)

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・特任助教

研究者番号：40968442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂質二重層は内層と外層で異なる脂質によって構成され、上皮細胞においては上皮細胞極性と呼ばれる、密着結合構造を境にして頂端側と基底側の形質膜では異なるタンパク質や脂質が非対称に分布していることが知られる。本研究課題では、非対称な形質膜成分の分布がどのように確立されているのか、またその破綻がどのような現象や関連疾患の引き金となるか、細胞内選別輸送の分子基盤解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は長らく信じられてきたlipid raftの概念を詳細に解析する。上皮細胞極性の形成・維持の根底にある分子メカニズムは、発生やがんに関連する。これらの経路を操作する治療戦略の開発には、分子基盤の解明が不可欠であり、本研究はその基礎となる知見をもたらす。

研究成果の概要（英文）：The lipid bilayer is composed of different lipids in the inner and outer layers. In epithelial cells, it is known that different proteins and lipids are asymmetrically distributed in the apical and basolateral plasma membrane bordering the tight junction structure, called the epithelial cell polarity.

In this research project, we have been investigating the molecular mechanisms underlying the asymmetric distribution of plasma membrane components.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞内輸送 選別輸送 lipid raft スフィンゴ脂質 細胞極性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

極性を有する細胞の形質膜では、タンパク質だけでなく脂質も偏って局在する。上皮細胞では、密着結合を境にして、形質膜が機能的に異なる頂端側と基底側に隔てられている。生化学的手法を用いた先行研究により、頂端側にはスフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質が、基底側にはホスファチジルコリンが多いことが報告されている (Meer and Simons, *EMBO J*, 1986)。こうした脂質やタンパク質の極性を持った分布を可能にする分子機構として、「頂端膜と基底膜の各々の積荷が選別された小胞が *trans*-Golgi ネットワークで形成され、形質膜へ輸送される」という仮説が 1980 年代に提唱された (Simons and Meer, *Biochemistry*, 1988)。しかしながら、*trans*-Golgi ネットワークで、スフィンゴ脂質や特定の膜タンパク質を、頂端側の輸送小胞に選別する分子メカニズムは今なお解明されていない。

2. 研究の目的

脂質二重層は内層と外層で異なる脂質組成をもつ。さらに、上皮細胞においては上皮細胞極性と呼ばれる、密着結合構造を境にして頂端側と基底側の形質膜では異なるタンパク質や脂質が偏在していることが知られる。つまり、上皮細胞の形質膜においては、(1)脂質二重層の内層と外層、(2)頂端側と基底側という 2 軸性の性質をもっている。これまでに生化学的手法を用いた解析によって、スフィンゴ脂質や特定のタンパク質を豊富に含む輸送小胞が頂端膜へ選択的に輸送されることが示されている。このことから、Golgi 体で頂端側の成分を豊富に含む小胞が形成され、頂端側の形質膜へ選択的に小胞輸送された結果、上皮細胞極性を形成していると解釈されている。しかしながら、Golgi 体から形質膜への輸送小胞における、脂質の網羅的な解析や詳細な局在解析はなされていない。

本研究課題では上皮細胞をモデルとし、非対称な形質膜成分の分布がどのように確立されているのか、またその破綻がどのような現象や関連疾患の引き金となるのか、細胞内選別輸送と上皮細胞極性形成の分子基盤解明を目的とする。

3. 研究の方法

私たちは、上皮細胞の形質膜におけるスフィンゴミエリンの特徴的な局在に着目し (Ikenouchi et al., *J Cell Sci*, 2013)、スフィンゴミエリンの形質膜への輸送の制御機構を明らかにする目的で、独自に考案したスフィンゴミエリンの可視化プローブ SS-GFP-Lys を作出した。このプローブを用いることで、上皮細胞におけるスフィンゴミエリンの形質膜への輸送経路をライブイメージングによって可視化することに成功した。さらに、SS-GFP-Lys を安定発現する上皮細胞を用い、薬剤スクリーニングを実施することで、可視化されたスフィンゴミエリンの輸送経路を制御する分子メカ

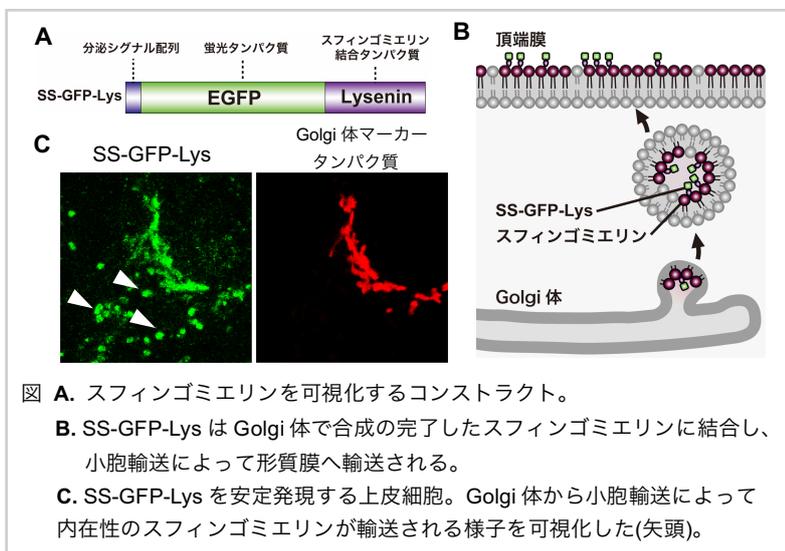


図 A. スフィンゴミエリンを可視化するコンストラクト。
B. SS-GFP-Lys は Golgi 体で合成の完了したスフィンゴミエリンに結合し、小胞輸送によって形質膜へ輸送される。
C. SS-GFP-Lys を安定発現する上皮細胞。Golgi 体から小胞輸送によって内在性のスフィンゴミエリンが輸送される様子を可視化した(矢頭)。

ニズムを報告した (Ono et al., *J Cell Biol*, 2022) (図)。

このように、脂質プローブと顕微鏡観察によって得られる細胞内局在に関する情報は、組織や細胞、オルガネラを破碎して解析する質量分析(LC/MS など)では得られない知見である。しかしながら、これまで報告のある高い特異性で利用可能な脂質プローブは限られているため、有用な脂質プローブの報告されていない脂質クラスに関しては、その局在や分子メカニズム、シグナル伝達経路といった情報は少ない。さらに、多くの脂質プローブは、認識の対象とする脂質の親水性頭部の構造を認識するため、脂肪酸鎖組成や不飽和度といったより詳細な情報を得ることは困難である。そこで、Golgi 体より出芽する輸送小胞を迅速に単離し、質量分析を行うことで選別輸送毎の脂質組成を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

まず、様々な脂質の可視化プローブを複数同時に安定発現する上皮細胞株を樹立した。ライブイメージング観察により、post *trans*-Golgi 小胞に特異的に局在する脂質プローブを見出した。さらに、これらの脂質局在に関連する代謝酵素などのタンパク質の細胞内局在を検討したところ、*trans*-Golgi 体及び *trans*-Golgi 体から出芽する小胞、アピカル膜に特異的に局在する酵素を複数同定した。post *trans*-Golgi 小胞においては、アピカル膜タンパク質と特定の脂質プローブの強い共局在が認められた。このことから、上皮細胞においてアピカル膜へ選択的に輸送される小胞は、*trans*-Golgi においてタンパク質だけでなく脂質に関しても選別・濃縮されている可能性が示唆され、従来の選別輸送のモデルを支持する結果が得られた。興味深いことに、アピカル膜タンパク質陽性の post *trans*-Golgi 小胞と共局在した脂質プローブや関連酵素の中には、lipid raft モデルにおけるスフィンゴ脂質の濃縮を促進すると考えられるものと、一見してそうでないものが含まれていた。今後、同定した脂質代謝酵素の遺伝子破壊細胞を作製すると共に、Golgi 体から出芽する輸送小胞を迅速に単離し、質量分析を行うことで細胞内選別輸送毎の詳細な脂質組成を明らかにしたい。これまでに頂端膜と基底側膜へ輸送される小胞を単離するためのタグを安定発現する細胞株を樹立している。脂質プローブに基づく細胞内局在解析と質量分析を組み合わせ、選別輸送における脂質の寄与を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Shigetomi Kenta, Ono Yumiko, Matsuzawa Kenji, Ikenouchi Junichi | 4. 巻 120 |
| 2. 論文標題 Cholesterol-rich domain formation mediated by ZO proteins is essential for tight junction formation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 e2217561120 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2217561120 | 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 Ono Yumiko, Matsuzawa Kenji, Ikenouchi Junichi | 4. 巻 221 |
| 2. 論文標題 mTORC2 suppresses cell death induced by hypo-osmotic stress by promoting sphingomyelin transport | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 e202106160 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202106160 | 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 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 小野由美子, 松沢健司, 池ノ内順一 |
| 2. 発表標題 mTORC2 suppresses cell death induced by hypo-osmotic stress by promoting sphingomyelin transport |
| 3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小野由美子, 松沢健司, 池ノ内順一 |
| 2. 発表標題 mTORC2 suppresses cell death induced by hypo-osmotic stress by promoting sphingomyelin transport |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|