

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770135

研究課題名(和文)脂質分布と膜物性の同時可視化で迫る糸状仮足形成における脂質ラフト動態と機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the dynamics and functions of lipid rafts in the filopodia formation by simultaneous visualization of lipid distribution and membrane-lipid phase

研究代表者

岸本 拓磨(Kishimoto, Takuma)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：70585158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜における現象を明らかにするため、脂質ラフトの動態や性質、細胞骨格との相関を明らかにする必要がある。本研究は、HeLa細胞の細胞伸展をモデルとして全反射顕微鏡を用いて細胞膜における脂質を正確に可視化する事により、脂質ラフトの動態を調査した。細胞伸展において細胞膜外層のラフト脂質は段々と分離し、別々のドメインを形成した。コレステロールドメインは糸状仮足先端に局在し、秩序液体層様の性質を示した。このドメイン形成は、ドメインの裏側でシグナル脂質PIP2、低分子量Gタンパク質Cdc42、その制御下のABCタンパク質ABCA1によるフィードバック制御機構を介して動的に制御される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Elucidating the machineries and dynamics of lipid rafts and the correlations with cytoskeleton on the plasma membrane is of crucial importance for determining mechanisms underlying cell events. In this study, we employed total internal reflection fluorescence microscopy to precisely visualize lipids of the plasma membrane and examined dynamics of lipids during HeLa cells spreading. We found that the distribution of these raft lipids segregated progressively and that lipids form separated domains in the outer leaflet of the plasma membrane during cell spreading. Cholesterol domains polarized at the tip of filopodia-like protrusion with liquid ordered phase. In addition, our results suggest the possibility that these domains are formed dynamically via feedback regulation mechanisms involving signal lipid PIP2 domains, small GTPase Cdc42, and ATP binding cassette transporter ABCA1 regulated by Cdc42.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、機能生物化学

キーワード：脂質ドメイン 細胞膜二重膜 膜物性 脂質分布 アクチン細胞骨格 糸状仮足 低分子量Gタンパク質 脂質輸送分子

1. 研究開始当初の背景

様々な細胞機能に関わる細胞の形態は、細胞膜と細胞骨格の相互作用で決定する。膜を変形させる側の細胞骨格の役割に比べると、変形作用を受ける側の細胞膜の役割は未知な点が多い。細胞膜の脂質ラフトは、コレステロールとスフィンゴ脂質が密に充填した機能性脂質ドメインと考えられている。脂質ラフトには、細胞骨格やシグナル分子が集積し細胞膜変形のプラットフォームになると推測される。そのため、ラフトの機能を解明する事が細胞膜現象の解明に重要となる。

現在、細胞膜を破壊または細胞を固定する事なく、生細胞で脂質ラフトを可視化し、関連する脂質や蛋白質の分布とその変化を明らかにする事が当該研究分野で求められている。現在までにラフトを構成する脂質(以下、ラフト脂質)は、主に細胞膜の二重膜では外層側に分布する事が明らかとなっている。細胞膜変形に関わる分子を直接制御するのが細胞膜内層側の脂質である事から、ラフトと内層脂質の相関を解明する事は重要となるが、いまだラフトの裏側の内層脂質は分からない。

脂質分布や動態に加え、最近、膜物性が注目される。脂質ラフトの形成や機能は、脂質1分子のみで決まるのではなく、特定の脂質からなる集合体としての膜物性も関与すると考えられる。ラフトを構成するスフィンゴ脂質とコレステロールを含むリポソームでは、これら脂質が密に充填され流動性が低い領域「秩序液体相」を形成する。そのため、秩序液体相は生体膜中にもあり、ラフト形成と関係すると予想される。コレステロールを添加したりリポソームが蛋白質の活性を変え報告があり(Papayannopoulos V. et al. *Mol Cell*. 2005)、膜物性がラフトやそこにある蛋白質の機能に密接に関わると考える。しかし、細胞内で膜物性を観察した例は少なく、脂質分布と膜物性との相関は明らかではない。その

ため、脂質ラフトの脂質分布に加え、分布と膜物性との関わりが機能にどう関わるか? という疑問の解決も、脂質ラフトの解明に大きく貢献する。

2. 研究の目的

上述のように細胞膜現象を明らかにするためには、その制御に関わる脂質ラフトの形成過程や機能を解明する事が重要となる。本研究では、脂質ラフトの解明には「脂質ラフトの外層と内層の脂質分布」と「脂質ラフトの物性」の二つの疑問を明らかにする必要がある、との考えのもと計画された。

本研究では、関連分子が局在する極性部位を特定する事により、細胞生物学的視点からのアプローチから脂質ラフトのメカニズムに迫る事を目的とした。そのために、極性部位(先端)を容易に特定できる糸状仮足形成をモデルに、膜構造を顕微鏡観察下で明確に確認できる系を採用した。生化学実験で糸状仮足の形成に関わるシグナル分子Cdc42やイノシトールリン脂質(内層脂質)がラフト脂質と一緒に単離されるため、脂質ラフトが糸状仮足と関係がある事が示唆される。本研究ではこれらの知見を発展させるため、生細胞内での脂質ラフトとその物性に焦点を当てた。予備実験から糸状仮足形成では時間経過とともにコレステロールドメインが先端に蓄積し、局在様式が他の脂質とは異なる事を明らかにした。そのため、糸状仮足形成をモデルとして脂質ラフトの形成過程とラフトの脂質の分布の違いも追跡できると考えた。本研究では以下の4点を調査し、得られた知見から脂質ラフトの形成メカニズム、さらには膜変形における機能を検討した。

- (1) 主要な細胞膜外層ラフト脂質の分布と膜物性の変化を追跡した。
- (2) 糸状仮足形成に関わる細胞骨格を制御する細胞膜内層脂質(イノシトールリン脂質

等)と外層ラフト脂質の分布との相関、それと膜物性との相関を調査した。

(3) 薬理学的手法や遺伝学的手法により関連脂質の部分分解または細胞内合成量を変化させ、他の脂質の分布や膜物性に対してどのような機能をもつかを調査した。

(4) 糸状仮足形成に関わるアクチン及び主要な関連蛋白質との動態の相関を調べ、脂質ラフトの脂質の分布と膜物性のアクチン細胞骨格制御における機能を調査した。

3. 研究の方法

本研究では、細胞膜の糸状仮足形成過程を通して、生細胞での脂質ラフトの分布とその物性の相関を調査し、脂質ラフトの細胞膜変形の制御機構の解明を行った。以下に示す蛍光化試薬を用いた細胞の顕微鏡観察で行い、外層及び内層の脂質とアクチン関連蛋白質の分布、そして膜の物性を調べた。(1) 外層の脂質分布は脂質結合ドメインを大腸菌発現系で作製し、蛍光色素ラベルや蛍光蛋白質融合体及び蛍光化脂質アナログで可視化して調べた。(2) 内層脂質とアクチン細胞骨格の可視化には、脂質結合性タンパク質(以下、脂質可視化プローブ)または蛋白質本体の蛍光蛋白質融合体を細胞内発現させて観察した。膜の物性の観察には、プローブ di-4-ANNEPDHQ は膜物性が秩序液体相では蛍光スペクトルが短波長側にシフトするため、秩序液体相と液晶相(流動性に富む相)それぞれに特徴的な波長を分光し顕微鏡画像を取得、得られた画像の蛍光強度について1画素ごとの相対比を求め画像化し、物性を相対的に評価した。糸状仮足の脂質分布が時間経過とともに変化する事が予想されたため、各観察時間の顕微鏡画像から蛍光強度の変化とその速度、領域の面積を数値化した定量的な解析を行い、時間経過とともに変化する脂質分布と物性を明らかにした。これらの顕微鏡画像取得には、物性-脂質分布の観察では

二波長励起-三波長分光観察(3色、物性+脂質可視化プローブ1種)で、脂質または蛋白質分布だけの場合は二波長分光観察(2色、脂質可視化プローブまたは蛋白質2種)システムを構築し用いた。細胞は、HeLa細胞をモデル細胞に用いて実験を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞膜外層を染色する脂質可視化プローブを用いた試験により、脂質ドメイン-ラフトに局在すると推定される脂質でもコレステロール(Perfingolysin 0 domain 4にて染色、以下、D4と表記、糸状仮足の先端、細胞膜底面)とスフィンゴミエリン(Lyseninにて染色、細胞膜底面)では異なる局在を示す事が明らかとなった(図1上図)。また、糸状仮足の先端にはコレステロール濃度が高いドメインが進展初期に特徴的に生じ(図1下図)、進展の進行とともに糸状仮足の全体に広がった。

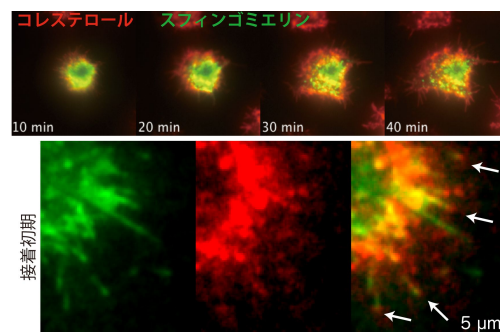


図1、細胞伸展時に見られる細胞膜外層脂質の分布の違い。上図、コレステロール(赤色)とスフィンゴミエリン(緑色)の伸展時における分布の系時変化。下図、細胞接着初期に観察される糸状仮足先端コレステロールドメイン(矢印)。

(2) コレステロール自体(PEG-コレステロールで可視化)は細胞膜外層上に均一に分布していたが、高濃度コレステロール領域を認識するD4で可視化されるドメインは先端部に

形成された。共焦点顕微鏡での解析では D4 で観察されたコレステロールドメインの膜物性は、生体内でより秩序液体相であった。全反射顕微鏡での観察においても、この結果と一致するように糸状仮足の先端に確認される D4 で染色される領域は膜物性がより秩序液体相であった。

(3)細胞膜内層のホスファチジルイノシトール(PIPs)二または三リン酸ドメイン(以下、PIP2 または PIP3、それぞれ PLC- β PH ドメイン、Btk-PH ドメインで可視化)も糸状仮足に分布しており、これらと外層のコレステロールドメインは一致した。

(4)アクチン細胞骨格形成において中心的役割を担う N-WASP と一過性で共局在した。アクチン重合を制御し、糸状仮足の形成に重要な低分子量 GTPase CDC42 は糸状仮足の先端に濃度が高いが、仮足全体的に局在していた。変異の強制発現や薬剤処理により CDC42 の活性を変化させる事で、D4 で染色されるコレステロールドメインが劇的に減少した。一方、アクチン重合を阻害する処理をした場合、D4 で染色されるコレステロールドメインに変化は見られなかった。一方、コレステロールの量を変化させる処理を行うと、活性化型 Cdc42 の増減が確認された。

(5)コレステロールを細胞膜外層に輸送する活性を持つ ABCA1 が、糸状仮足の先端に局在した。CDC42 の変化によるコレステロールドメインの減少は ABCA1 の活性を上昇する処理によって回復した。

CDC42 や N-WASP は PIPs を含む膜成分と結合し、活性化する事が知られている。In vitro での試験では、リボソームにコレステロールを添加する事により膜物性が秩序液体相になる事で、この活性化がさらに上昇する可能性が示唆されている (Papayannopoulos V. et al. *Mol Cell*. 2005)。そのため、上述の本研究の結果と合わせると、1) 糸状仮足の先端にて CDC42 による制御を受け ABCA1 が活性化、コ

レステロールドメイン(細胞膜外層)を形成する。2) それにより膜物性が変化し、PIP2 及び PIP3(細胞膜内層)により CDC42 がポジティブフィードバックを受け、その下流因子 N-WASP(アクチン細胞骨格)が活性化され、アクチン細胞骨格を制御している可能性がある。と推測される。この事から、コレステロールドメインの細胞膜二重膜間における分布制御機構とアクチン細胞骨格による膜変形機構間にフィードバック制御機構が存在し、効率的に糸状仮足形成を促している可能性が示唆された。

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 2 件)

岸本拓磨、稲葉岳彦、酒井翔太、小林敏秀、
「脳の脂質と疾患」最新精神医学 17 巻 3
号、査読無、51, 767-775 (2012)

Balakrishna, Hema, Kishimoto, Takuma,
Abe, Mitsuhiro, Makino, Asami, Inaba,
Takehiko, Murate, Motohide, Dohmae,
Naoshi, Kurahashi, Atsushi, Nishibori,
Kozo, Fujimori, Fumihiro, Greimel, Peter,
Ishitsuka, Reiko, Kobayashi, Toshihide,
Binding of a pleurotolysin ortholog from
Pleurotus eryngii to sphingomyelin and
cholesterol-rich membrane domains. *J*
Lipid Res. 査読有、54, 2933-2943 (2013)
DOI: 10.1194/jlr.D041731

[学会発表](計 5 件)

Tajima Takuya, Inaba Takehiko,
Kishimoto Takuma, Abe Mitsuhiro, Murate
Motohide, Sakai Shota, Ishitsuka Reiko,
Takeoka Shinji, and Kobayashi Toshihide,
“Phospholipase C-beta 1b changes the
curvature of
phosphatidylethanolamine-containing

membranes.” Lipid-Protein interactions in Membranes: Implications for Health and Disease, Hyderabad, India, (2012年11月2日)

Balakrishna BH, Kishimoto Takuma, Abe Mitsuhiro, Makino Asami, Dohmae Naoshi, Kurahashi Atsushi, Nishibori Kozo, Fujimori Fumihiko, Ishitsuka Reiko, and Kobayashi Toshihide, “Binding of pleurotolysin A ortholog from *Pleurotus eryngii* to sphingomyelin and cholesterol-rich membrane domains” International Forum for Membrane Research, Kyoto, Japan, (2013年3月16日)

Tajima Takuya, Inaba Takehiko, Kishimoto Takuma, Abe Mitsuhiro, Murate Motohide, Makino Asami, Sakai Shota, Hullin-Matsuda Françoise, Ishitsuka Reiko, Ikeda Yasuo, Takeoka Shinji, and Kobayashi Toshihide, “Transformation of phosphatidyl-ethanolamine- and phosphatidylserine-containing membranes by phospholipase C beta 1” International Forum for Membrane Research, Kyoto, Japan, (2013年3月16日)

Kishimoto, Takuma, Inaba, Takehiko, Tajima, Takuya, Abe, Mitsuhiro, Murate, Motohide, Makino, Asami, Ishitsuka, Reiko, Ikeda, Yasuo, Takeoka, Shinji, Kobayashi, Toshihide, “Membrane deformation by phospholipase C beta 1”, Lipid-protein interaction: From molecules to cells, Wako, Japan (2013年5月9日)

岸本拓磨、小林俊秀、細胞膜ラフトにおけるコレステロールドメインの脂質分布とアクチン細胞骨格の相関、第36回分子生物学会、神戸、(2013年12月3日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 拓磨 (KISHIMOTO Takuma)
独立行政法人 理化学研究所 小林脂質生
物学研究室・基礎科学特別研究員
研究者番号：70585158