

令和元年6月11日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07957

研究課題名(和文) 超解像顕微鏡を用いた脂質ドメインのインフルエンザウイルスに対する機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of lipid domains in influenza virus infection with super-resolution microscopy

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂質プローブと超解像顕微鏡を用いて解析した結果、インフルエンザウイルスの細胞膜からの出芽は、スフィンゴミエリン/コレステロールの脂質ドメインの境界部分でおこることがわかった。脂質ラフトのフリップフロップに関わる因子を同定し、遺伝子破壊したところ、インフルエンザウイルスのプラーク形成率がコントロールに比べて増加していた。フリーズフラクチャー法による免疫電験で脂質の局在を解析した結果、細胞膜の脂質二重層の内層側で、PIP2の脂質ドメインが増加していることがわかった。このことから、細胞膜の内層側のPIP2の脂質ドメインの安定性は、インフルエンザウイルスの増殖・拡散に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、宿主側の細胞膜における脂質の非対称性は、インフルエンザウイルスの増殖・拡散に関わっていることが示唆された。同様の現象が、ほかのウイルスでも見られることが十分期待される。ウイルスは変異しやすく、構成タンパク質の分類上における種類の多さから、ウイルスそのものを標的とする薬剤の開発は難しい。本申請課題での結果を基に、宿主側の因子を標的とした薬剤で、脂質の非対称性を不安定にし、ウイルスの感染効率が低下するものがあれば、ウイルスの増殖・拡散に対する薬剤の開発を容易に行えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Analysis with a combination of lipid probes and super-resolution microscopy indicates that the influenza virus buds from the edges of the sphingomyelin(SM)/cholesterol(Chol) domains in MDCK cells. Several lines of evidence suggest that breakage of lipid asymmetry at the plasma membrane leads to the decrease of influenza virus proliferation. I screened for the factor involved in SM/Chol asymmetry at the plasma membrane. Immuno-electron microscopy with sodium dodecyl sulfate(SDS)-treated freeze-fracture replica labeling(SDS-FRL) indicates that the domains of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP2) increase in the inner leaflet of the plasma membrane. These results suggest that the stability of domains of PIP2 increases the influenza virus proliferation in mammalian cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インフルエンザウイルス フリップフロップ 脂質ラフト スフィンゴミエリン PIP2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質は細胞膜に多数の分子種が存在するが、脂質二重層の外層と内層では脂質の構成成分が大きく異なっている (Koval and Pagano, 1991)。さらに、それぞれの層で脂質の局在は一樣ではなく、様々な分布を示している。脂質ラフトは細胞膜上で 10~200 nm の脂質ドメインを形成しており、スフィンゴ脂質/コレステロールといった特定の脂質が含まれているとされている (Pike, 2006)。

脂質ラフトの研究は、非イオン性の界面活性剤を用いた間接的な生化学的手法により行われてきた。その理由の一つとして、脂質を生体膜上で機能を保持したままラベルしにくいこと、脂質ラフトの予想サイズが通常の光学顕微鏡の分解能 (200 nm 程度) 以下の大きさであること (Hell, 2009) により、脂質ラフトを可視化するという解析が困難であるからである。申請者らは、特定の脂質にのみ特異的に結合する分子をラベルすることにより、生理的な機能を失わずに生体膜上で脂質を観察することができる「脂質プローブ」を開発してきた。脂質プローブと、近年開発された「超解像顕微鏡システム」とを組み合わせることで、脂質ラフトの構成成分とされる脂質について解析を行ってきた (Mizuno *et al.*, 2011; Abe *et al.*, 2012; Abe and Kobayashi, 2013)。

スフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンは、哺乳動物細胞において主に細胞膜の外層に局在し、リン脂質のうち約 10% を占める主要な脂質である (Koval and Pagano, 1991)。申請者らは、スフィンゴミエリンと特異的に結合するシマミズ由来のタンパク質「Lysenin」(Yamaji *et al.*, 1998; Kiyokawa *et al.*, 2005) および、スフィンゴミエリン/コレステロール複合体と特異的に結合するマイタケ由来のタンパク質「P23」(未発表) を脂質プローブとして用い、超解像顕微鏡システムである PALM/dSTORM や SIM によって観察した。その結果、スフィンゴミエリンおよびスフィンゴミエリン/コレステロール複合体は細胞のアピカル側の細胞膜の外層上で、半径 200 nm 以下の脂質ドメインを形成していることがわかった (Mizuno *et al.*, 2011; Abe *et al.*, 2012; Abe and Kobayashi, 2013)。一方、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (以下、PIP₂) は細胞膜の内層に局在し、脂質ラフトに含まれていると予想されている (Brown and London, 1998; Hope and Pike, 1996)。PIP₂ にのみ特異的に結合するペプチドである PLC β 1 の PH ドメイン (Field *et al.*, 2005) を脂質プローブとして用い、超解像顕微鏡システムによって PIP₂ を観察した。その結果、スフィンゴミエリンおよびスフィンゴミエリン/コレステロール複合体の脂質ドメインのちょうど裏側に PIP₂ の脂質ドメインが形成されていることが明らかになった (Abe *et al.*, 2012; Abe and Kobayashi, 2013)。

インフルエンザウイルスには脂質ラフトと似た組成の脂質が含まれている (Scheiffele *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000)。インフルエンザの構造タンパク質の中には脂質ラフトに親和性があるものが含まれている (Takeda *et al.*, 2003)。コレステロールを除去する試薬サイクロデキストリンで脂質ラフトを処理すると、インフルエンザの感染効率が低下する (Sun and Whittaker, 2003; Takeda *et al.*, 2003)。これらの結果から、インフルエンザウイルスが細胞に感染後、脂質ラフトに構造タンパク質が再集合し、出芽していると予想されている。申請者は、インフルエンザウイルスを細胞に感染後、細胞膜上で再集合した構造タンパク質を超解像顕微鏡システムで観察した結果、スフィンゴミエリン/コレステロール複合体の脂質ドメインの中心部分ではなく、ほかの脂質との境界部分に多く局在することを見いだした。インフルエンザウイルスの構造タンパク質のすべてが脂質ラフトに親和性が高い訳ではなく、M2 イオンチャンネルなどは親和性が低いことが示されている (Scheiffele *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000)。これらの結果を考え合わせると、スフィンゴミエリン/コレステロール/PIP₂ の脂質ドメインは、インフルエンザウイルスの構造タンパク質の再集合およびウイルスの粒子形成を直接的に制御している可能性が考えられる。また、インフルエンザウイルスが脂質ドメインの境界部分に局在する生理的意義として、脂質ラフトに高い親和性をもつ構造タンパク質と低い親和性をもつ構造タンパク質とを選別しながら粒子を形成する可能性が考えられる。本申請課題では、脂質プローブと超解像顕微鏡システムを用いながら、これらの仮説の検証を行う。

2. 研究の目的

スフィンゴ脂質/コレステロールは脂質ラフトを構成する脂質である。インフルエンザウイルスは細胞に感染後、脂質ラフトに構造タンパク質が再集合し、出芽することで細胞外へ放出されることが示唆されている。申請者は、スフィンゴミエリン/コレステロール複合体が半径 200 nm 以下の脂質ドメインを細胞膜の外層に形成していること、そのすぐ直下の内層にはホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP₂) の脂質ドメインが形成していることを明らかにした。また、インフルエンザウイルスが細胞内に感染した後、細胞膜からの出芽は、スフィンゴミエリン/コレステロールの脂質ドメインとほかの脂質との境界部分でおこることを見いだした。本申請課題では、タンパク質の再集合・ウイルスの出芽における脂質ドメインの役割について明らかにする。

3. 研究の方法

スフィンゴミエリン/コレステロール/PIP₂ のうち、(1) どの脂質が、(2) ウイルスタン

パク質の輸送過程のどの段階で機能しているのかを調べるために、スフィンゴミエリン/コレステロール/PIP₂のそれぞれの量を局所的に減少させた条件で、構造タンパク質の再集合能やウイルスの粒子形成能を調べる。インフルエンザウイルスの細胞膜上での局在を超解像顕微鏡システムで解析すること、インフルエンザウイルスの感染効率をブラクアッセイで調べることによって評価する。(3) どのような機構で機能しているかを調べるために、脂質ドメインの大きさや構造が変化している細胞株をスクリーニングによって単離し、インフルエンザウイルスへの影響を調べる。また、人工膜を作成し、インフルエンザのタンパク質のクラスター化やウイルスの粒子形成にどのような影響があるかを *in vitro* で調べる。前述の通り、スフィンゴミエリン/コレステロール/PIP₂が細胞膜上で表裏の位置に脂質ドメインを形成していることを見いだした。また、その中心部分ではなく、境界部分にインフルエンザウイルスが再集合することを見いだした。本研究では、脂質ドメインの量・大きさ・形などを変化させた条件で、構造タンパク質の再集合能やウイルスの粒子形成能を調べることにより、これらの脂質のうち(1) どの脂質が、(2) 構造タンパク質の輸送過程のどの段階で、(3) どのような機構で機能しているのかについて明らかにする。

4. 研究成果

まず、スフィンゴミエリン/PIP₂の細胞内の量を変えることで、MDCK細胞に対するインフルエンザウイルスの感染効率が変化するかを調べた。細胞内のスフィンゴミエリナーゼを変化させるために、細胞内でスフィンゴミエリナーゼを過剰発現させた細胞株、およびスフィンゴミエリナーゼの遺伝子変異株を作製した。PIP₂を減少させるために、PLCやPLCD1のPHドメインを過剰発現した細胞を作製した。また、細胞膜上のスフィンゴミエリンの量を減少させるために、MDCK細胞膜の外からスフィンゴミエリナーゼを処理した。これらの細胞にインフルエンザウイルスを感染させた後、感染効率をブラクアッセイによって調べた。いずれの細胞でも感染効率に変化が見られなかったことから、脂質の量を変化するのは別の方法を考えた。着目したのは、細胞膜の脂質の非対称性である。スフィンゴミエリン/ホスファチジルコリンは細胞膜の外層に、ホスファチジルエタノールアミン/ホスファチジルセリン/PIP₂は細胞膜の内層に局在していることが知られている。インフルエンザウイルスの感染効率を低下させるサイクロデキストリン処理は、細胞膜における脂質の非対称性を失わせることが知られている。そこで、フリップフロップに関わる因子を遺伝子破壊することによって脂質の非対称性を変化させた時に、インフルエンザウイルスの感染効率をブラクアッセイによって調べた。その結果、インフルエンザの感染効率が変化することがわかった。この結果から、脂質の量よりは、脂質の非対称性がインフルエンザの感染に重要な機能を果たすことが示唆された。

脂質ラフトにおいてスフィンゴ脂質が細胞膜外層に、PIP₂が細胞膜内層に存在すると考えられるが、その非対称性を維持する機構はわかっていない。そこで、脂質の非対称性の維持とウイルスの感染に関する詳しいメカニズムの解明のために、脂質ラフトの主要な構成成分であるスフィンゴミエリンの非対称性に関わる因子のスクリーニングを行った。具体的には、shRNAライブラリーを発現させたHeLa細胞において、細胞質中においてスフィンゴミエリン分解酵素を発現したときに、細胞膜外層におけるスフィンゴミエリンの量が野生株と比べて変化する変異株を得ることを試みた。一次スクリーニングでいくつかの候補が得られた後、CRISPR/Cas9で遺伝子の変異株を作製し、表現型が再現される目的の候補を絞り込んだ。

リコンビナントタンパク質を作製し、人工膜を用いた*in vitro*の系での解析を行った。蛍光ラベルしたスフィンゴミエリンを人工膜中に取り込ませ、リコンビナントタンパク質を加えると、*in vitro*でスフィンゴミエリンのフリップフロップが促進されることがわかった。このリコンビナントタンパク質は、PIP₂に特異的に結合することが明らかになった。PIP₂が人工膜中に存在する場合、リコンビナントタンパク質のフリップフロップの活性がさらに促進することがわかった。人工膜の形状を計測した結果、リコンビナントタンパク質はPIP₂が存在する人工膜を変形する活性が認められた。変異を導入し、PIP₂と強く結合する変異型リコンビナントタンパク質は、フリップフロップの活性と人工膜の変形の活性が上昇していることがわかった。膜を変形させることが報告されている既知のタンパク質を用いて、人工膜のフリップフロップ活性を測定した結果、膜の変形とフリップフロップが同時に起きることがわかった。これらの結果を考え合わせると、本研究で同定されたタンパク質は、PIP₂と結合し、膜を変形させ、脂質ラフトのフリップフロップを促進していることが示唆された。

CRISPR/Cas9による遺伝子変異株において脂質の解析を行った結果、スフィンゴミエリンの細胞膜二重層における非対称性が異常になっていることがわかった。また、細胞膜内層のPIP₂の局在も変化していることがわかった。それらの遺伝子をCRISPR/Cas9でノックアウトさせたMDCK細胞でインフルエンザウイルスのブラクアッセイを測定した結果、ブラクアッセイ数が2倍程度に高まっていることが分かった。したがって、細胞膜の内層側のPIP₂の脂質ドメインの安定性が、インフルエンザウイルスの増殖・拡散に関与していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. M. Yanagawa, M. Hiroshima, Y. Togashi, M. Abe, T. Yamashita, Y. Shichida, M. Murata, M. Ueda, and Y. Sako. Single-molecule diffusion-based estimation of ligand effects on G protein-coupled receptors. *Sci Signal*, 11(548), 2018 (査読有り)
2. Y. Nakamura, N. Umeki, M. Abe, and Y. Sako. Mutation-Specific Mechanisms of Hyperactivation of Noonan Syndrome SOS Molecules Detected with Single-molecule Imaging in Living Cells. *Sci Rep*, 7(1), 14153, 2017 (査読有り)
3. A. Makino, M. Abe, R. Ishitsuka, M. Murate, T. Kishimoto, S. Sakai, F. Hullin-Matsuda, Y. Shimada, T. Inaba, H. Miyatake, H. Tanaka, A. Kurahashi, C.G. Pack, R.S. Kasai, S. Kubo, N.L. Schieber, N. Dohmae, N. Tochio, K. Hagiwara, Y. Sasaki, Y. Aida, F. Fujimori, T. Kigawa, K. Nishibori, R.G. Parton, A. Kusumi, Y. Sako, G. Anderluh, M. Yamashita, T. Kobayashi, P. Greimel, and T. Kobayashi. A novel sphingomyelin/cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C. *FASEB J*, 31(4), 1301-1322, 2017 (査読有り)
4. M. Kinoshita, K.G. Suzuki, N. Matsumori, M. Takada, H. Ano, K. Morigaki, M. Abe, A. Makino, T. Kobayashi, K.M. Hirosawa, T.K. Fujiwara, A. Kusumi, and M. Murata. Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. *J Cell Biol*, 216(4), 1183-1204, 2017 (査読有り)
5. H. Watanabe, K. Okahara, Y. Naito-Matsui, M. Abe, S. Go, J. Inokuchi, T. Okazaki, T. Kobayashi, Y. Kozutsumi, S. Oka, and H. Takematsu. Psychosine-triggered endomitosis is modulated by membrane sphingolipids through regulation of phosphoinositide 4,5-bisphosphate production at the cleavage furrow. *Mol Biol Cell*, 27(13), 2037-2050, 2016 (査読有り)
6. A. Makino, F. Hullin-Matsuda, M. Murate, M. Abe, N. Tomishige, M. Fukuda, S. Yamashita, T. Fujimoto, H. Vidal, M. Lagarde, I. Delton, and T. Kobayashi. Acute accumulation of free cholesterol induces the degradation of perilipin 2 and Rab18-dependent fusion of ER and lipid droplets in cultured human hepatocytes. *Mol Biol Cell*, 27(21), 3293-3304, 2016 (査読有り)
7. T. Inaba, T. Kishimoto, M. Murate, T. Tajima, S. Sakai, M. Abe, A. Makino, N. Tomishige, R. Ishitsuka, Y. Ikeda, S. Takeoka, and T. Kobayashi. Phospholipase Cbeta1 induces membrane tubulation and is involved in caveolae formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(28), 7834-7839, 2016 (査読有り)
8. M. Murate, M. Abe, K. Kasahara, K. Iwabuchi, M. Umeda, and T. Kobayashi. Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J Cell Sci*, 128(8), 1627-1638, 2015 (査読有り)
9. A. Makino, M. Abe, M. Murate, T. Inaba, N. Yilmaz, F. Hullin-Matsuda, T. Kishimoto, N.L. Schieber, T. Taguchi, H. Arai, G. Anderluh, R.G. Parton, and T. Kobayashi. Visualization of the heterogeneous membrane distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity, and sphingolipidosis. *FASEB J*, 29(2), 477-493, 2015 (査読有り)
10. H.B. Bhat, R. Ishitsuka, T. Inaba, M. Murate, M. Abe, A. Makino, A. Kohyama-Koganeya, K. Nagao, A. Kurahashi, T. Kishimoto, M. Tahara, A. Yamano, K. Nagamune, Y. Hirabayashi, N. Juni, M. Umeda, F. Fujimori, K. Nishibori, A. Yamaji-Hasegawa, P. Greimel, and T. Kobayashi. Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *FASEB J*, 29(9), 3920-3934, 2015 (査読有り)
11. M. Abe, and T. Kobayashi. Imaging local sphingomyelin-rich domains in the plasma membrane using specific probes and advanced microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1841(5), 720-726, 2014 (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 阿部充宏 「脂質イメージングによる脂質ラフトの解析」 第 42 回レーザ顕微鏡研究会講演会 理化学研究所(埼玉県和光市) 2016 年 7 月
2. 村手源英, 阿部充宏, 笠原浩二, 岩渕和久, 梅田真郷, 小林俊秀 「細胞膜の脂質二重

層を構成する各種の脂質が示す非対称分布とその破綻」 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 神戸ポートアイランド（神戸市中央区） 2015 年 12
月

3. T. Kobayashi, and M. Abe 「Imaging local sphingomyelin domains in the plasma membrane
using lipid-specific probes and super-resolution microscopy」 第 53 回日本生物物理学会年会
金沢大学角間キャンパス（金沢市角間町） 2015 年 9 月

4. T. Kobayashi, and M. Abe 「A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis」 第 67 回日本
細胞生物学会年会 タワーホール船堀（東京都江戸川区） 2015 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

細胞膜の受容体1分子の動きから薬効を評価

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180919_1/

マイタケ由来タンパク質がインフルエンザウイルスの増殖を抑制

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160822_2/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。