

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18954

研究課題名(和文)ホスファチジルセリンの偏在性とその意義

研究課題名(英文) Investigation of intracellular distribution and physiological importance of phosphatidylserine

研究代表者

辻 琢磨 (Tsuji, Takuma)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40725628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホスファチジルセリン(PS)は、生体膜を構成するリン脂質の1つである。PSの偏在性は様々な生命現象と密接に関わっていると考えられるが、PSの局在に関する情報は不十分であり機能的意義の解明にも支障をきたしている。本研究では急速凍結・凍結切断レプリカ標識法を用いて、ありのままのPS局在を解明することを目的とした。出芽酵母においてPSは小胞体及び核膜では細胞質側・内腔側膜葉に等しく存在し、ゴルジ体では細胞質側に豊富に存在していた。また、MEF細胞の細胞膜細胞質側膜葉、小胞体・外核膜の内腔側膜葉にPSが豊富であった一方で、細胞膜の細胞表面側膜葉、小胞体・外核膜の細胞質側膜葉にもPSが存在していた。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylserine (PS) is one of phospholipids and is a component of the cell membrane. The physiological importance of PS is not well understood because of methodological difficulty to define PS distribution, although asymmetrical or heterogeneous distribution of PS would have essential function in the cell. In this study, we investigated PS distribution by utilizing quick-freeze and freeze-fracture replica labeling electron microscopy. As a result, we found that PS distributed evenly on the both leaflet of the ER and nuclear membrane and unevenly on the golgi membrane of budding yeast. Furthermore PS is labeled on the extracellular leaflet of plasma membrane and cytosolic leaflet of ER/outer nuclear membrane of MEF cell.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ホスファチジルセリン 急速凍結 凍結切断レプリカ 免疫電顕 細胞膜 オルガネラ膜 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルセリン (PS) は生体膜 (細胞膜とオルガネラ膜) を構成するリン脂質の一種である。細胞膜における PS の機能として最もよく知られているものは、アポトーシス細胞が発する eat me シグナルである。PS は通常、細胞膜の内葉 (細胞質側膜葉) に局在しているが、アポトーシスが起これると、この非対称性が崩れ、細胞表面 (細胞外側膜葉) に現れる。この露出した PS をマクロファージが認識し、アポトーシス細胞はすみやかに貪食される。一方細胞内では、PS 合成酵素が存在する小胞体や、PS の代謝を司るミトコンドリアよりも、初期エンドソームやリサイクリングエンドソームに PS が濃縮している。これらのオルガネラに PS が豊富に存在している理由や機構は解明されておらず、議論の的となっている。

このように PS の“偏り” (①オルガネラレベルでの偏り、②生体膜内葉・外葉における偏り、③膜平面上での偏り) は様々な生命現象と密接に関わっていると考えられている。にもかかわらず、PS の局在やその意義は、前述のアポトーシスにおける役割など、ごく一部しか明らかになっていない。これは、ナノレベルでの局在解析の難しさが障害となっているからである。脂質の局在解析に伴う最も大きな問題は脂質分子が通常の化学固定剤と反応せず、本来の分布を保ったまま可視化することができないことである。一方、蛍光物質を付与した脂質アナログを用いる実験系では、蛍光物質の結合が脂質分子の性質に重大な変化をもたらすことが知られている。さらに、GFP 融合脂質結合ドメインを可視化プローブとして発現させる方法では、生体膜の細胞質側片葉だけしか解析できない上、プローブの結合が脂質分子の分布に影響を及ぼすことが懸念される。

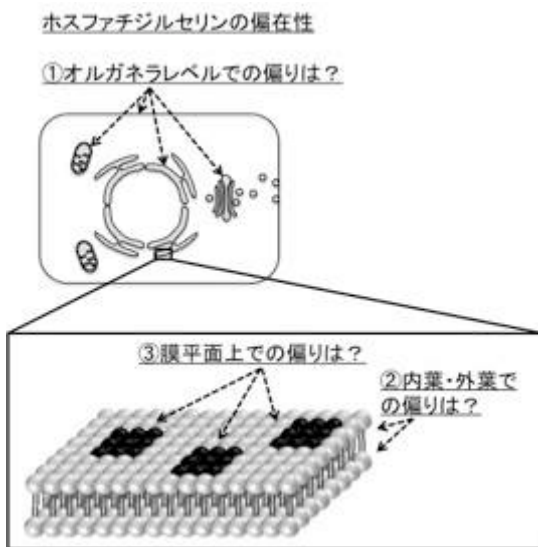


図 1. PS の偏在性

前述のように、PS の機能を明らかにするた

めには、PS が①どの生体膜の、②どちらの片葉に (もしくは両葉に)、③どのように分布しているか (クラスター形成の有無や量) という、ありのままの PS の局在を解き明かすことが必要不可欠である。この課題に対して我々は急速凍結・凍結切断レプリカ標識法が有効であると考えた。急速凍結法は瞬時 (数ミリ秒~数十ミリ秒) に細胞内すべての分子の動きを止めることができるため、脂質分子が本来の位置から逸脱することはない。また、凍結切断レプリカ標識法では、細胞を切断することにより露出した生体膜の内葉・外葉の脂質分子を白金と炭素の蒸着により保持し、これを抗体や脂質プローブを用いて標識し、透過型電子顕微鏡で解析する。本方法は細胞膜に限らず、①細胞内のすべての生体膜に適用可能であり、露出させた片葉を二次元の面として観察するため、②標的脂質がどちらの片葉に分布しているかはもちろん、③片葉上での二次元的な分布を解析することができる。本研究計画では、本方法を軸に、分子生物学的手法を取り入れながら、PS の局在を解析するとともに、PS の細胞内ダイナミクスや偏在化のメカニズム、そして PS の機能解明に迫る。



図 2. 急速凍結・凍結切断レプリカ標識法

2. 研究の目的

急速凍結・凍結切断レプリカ標識法を用いて出芽酵母、哺乳類細胞における PS の局在を明らかにする。単に各オルガネラにおける分布を調べるだけでなく、どちらの片葉に、どのように分布しているか (クラスター形成の有無、PS 分布密度) を、ナノスケールで明らかにする。また、PS を内葉に移動させる酵素 (フリッパーゼ) の欠損によって PS の分布にどのように変化が見られるかを調べる。

3. 研究の方法

(1) リボソームを用いた PS プローブの評価

PS に結合するプローブとして GST 融合 Mfge8-C2 ドメイン、AnexinV-C2 ドメイン、Evectin2-PH ドメイン x2 (evectin2-PH cDNA は田口友彦博士 (東京大学薬学研究科) より供与) を作製した。また、PS を含むリボソーム (PC/PS2%, 5%, 10%, 20%)、含まないリボソーム (PC, PC/PI20%, PC/PE20%) の凍結切断レプリカを作製し、上記プローブの最適な標識条件を探索、またその特異性を評価した。急速凍結・凍結切断レプリカ標識法は下記のように進めた。

- ①各脂質組成のリポソームを作製し、加圧凍結装置 (HPM010) を用いて急速凍結した。
- ②凍結サンプルをレプリカ作製装置 (BAF400) に移し、ナイフで切断後、白金と炭素を蒸着し脂質分子を物理的に固定した。
- ③サンプルを常温に戻しブロッキング後、GST 融合 PS 結合プローブ、ウサギ抗 GST 抗体、Protein A-gold conjugate (10 nm) により PS を標識し、透過型電子顕微鏡で観察した。
- ④得られた像から金コロイドの密度を算出した。

(2) 出芽酵母における PS 分布解析

- ①野生型出芽酵母、また対照として PS 合成酵素欠損出芽酵母 (cho1Δ) を YPD 培地中で培養した。
- ②対数増殖期の酵母を加圧凍結装置 (HPM010) を用いて急速凍結した。
- ③上記②と同様
- ④サンプルを常温に戻し、westase 処理により細胞壁を溶解し、2.5% SDS in 0.1M Tris-HCl (pH6.8) により余分な細胞質成分等を除去した。
- ⑤ブロッキング後、GST 融合 PS 結合プローブ、ウサギ抗 GST 抗体、Protein A-gold conjugate (10 nm) により PS を標識し、透過型電子顕微鏡で観察した。
- ⑥得られた像から各オルガネラ膜における金コロイドの密度を算出した。

(3) 哺乳類細胞における PS 分布解析

マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF 細胞) を培養し、上記 (2) と同様に各オルガネラでの PS 局在を解析した。

(4) フリッパーゼ欠損細胞における PS の分布

出芽酵母の 5 つのフリッパーゼ欠損株を作製した。それぞれ単一なフリッパーゼの欠損だけでなく、複数のフリッパーゼ欠損細胞も同様に作製した。

4. 研究成果

(1) リポソームを用いた PS プローブの評価

各脂質組成のリポソームを用いて、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法に適した PS プローブの選定、標識条件の検討を行った。その結果、GST 融合 Evection2-PH ドメイン x2 が最も特異的に PS を標識することがわかった。また、標識条件として 3% BSA, 2% cold fish skin gelatin を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.0) によるブロッキング、150 ng/mL のプローブ液中で 4℃一晩反応させることで良好な結果が得られることがわかった。

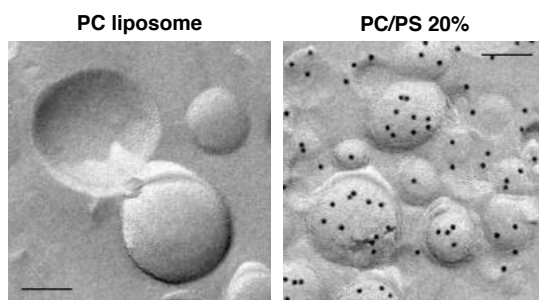
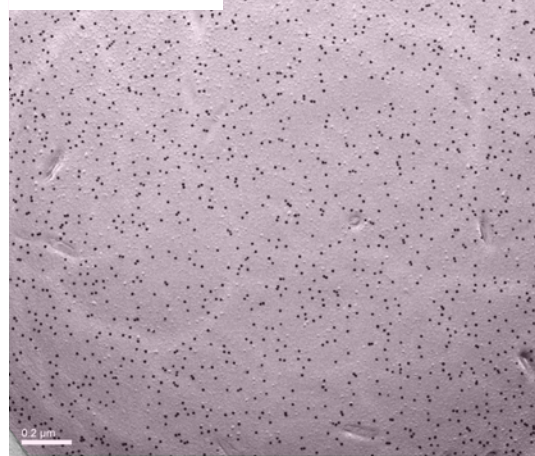


図3. PS を含まないリポソーム (左) と含むリポソーム (右) の PS 標識像。黒点は 10 nm の金コロイド。

(2) 出芽酵母における PS 分布解析

上記 (1) で得られた結果を元に出芽酵母各オルガネラ膜の細胞質側及び内腔側膜葉における PS 分布を解析した。その結果、PS は小胞体と核膜では細胞質側、内腔側膜葉にほぼ等しく存在し、ゴルジ体では細胞質側膜葉に豊富に存在することがわかった。また、液胞膜、細胞膜ではほぼすべての PS が細胞質側膜葉に存在していた。このことから、出芽酵母において PS は、合成場所である小胞体ではなく、ゴルジ体で非対称性を獲得し、細胞質側膜葉に非対称性分布することが初めて明らかになった。

細胞膜



細胞膜

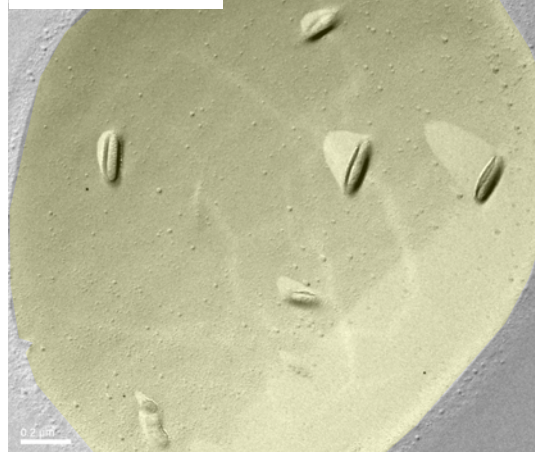


図4. 出芽酵母細胞膜の PS 標識像。ピンク色が細胞質側膜葉、黄色が細胞外側（細胞表面側）膜葉を示す。黒点は 10 nm の金コロイド、スケールバーは 200 nm である。金コロイドは細胞質側膜葉にのみみられる。

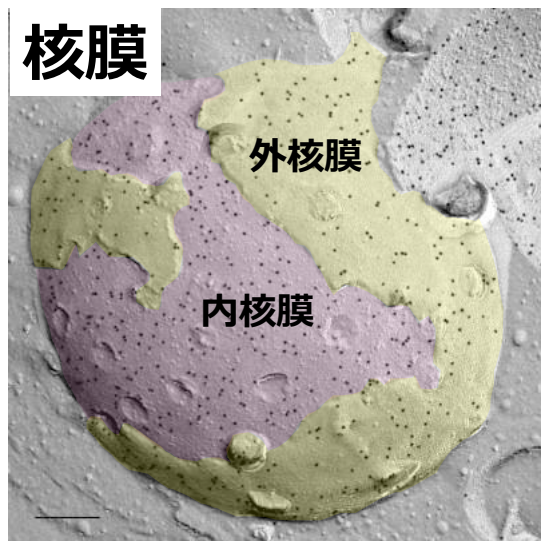
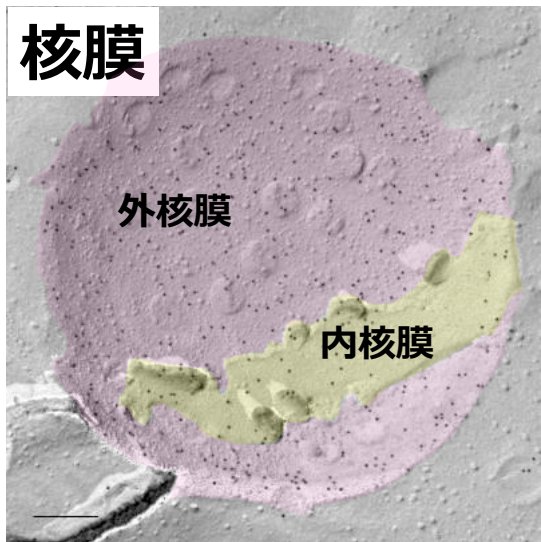


図5. 出芽酵母核膜の PS 標識像。ピンク色が細胞質側膜葉、黄色が内腔側膜葉を示す。黒点は 10 nm の金コロイド、スケールバーは 200 nm である。内核膜、外核膜ともに金コロイドは細胞質側膜葉、内腔側膜葉にほぼ等しく分布している。

(3) 哺乳類細胞における PS 分布解析

MEF 細胞における PS の分布を解析した。従来報告されていた通り MEF 細胞の細胞膜の細胞質側膜葉、小胞体／外核膜の内腔側膜葉に PS が豊富であった一方で、興味深いことにそれぞれに向き合う膜葉、すなわち細胞膜の細胞外側（表面側）膜葉、小胞体／外核膜の細胞質側膜葉にも PS が存在していることがわかった。

(4) フリッパーゼ欠損細胞における PS の

分布

PS を細胞質側膜葉に移行させる酵素（フリッパーゼ dnf1, dnf2, dnf3, drs2, neo1）を欠損させた出芽酵母株を作製した。それぞれ単一なフリッパーゼの欠損だけでなく、複数のフリッパーゼ欠損細胞も同様に作製した。フリッパーゼの一つ neo1 については欠損株が致死となるため、温度感受性変異株を用いて解析を行っている。今後これらの細胞における PS の分布を詳細に解析し、各フリッパーゼが PS 非対称性分布にどのように寄与しているのかを調べるとともに、PS の非対称性分布がもつ意味を追求する。

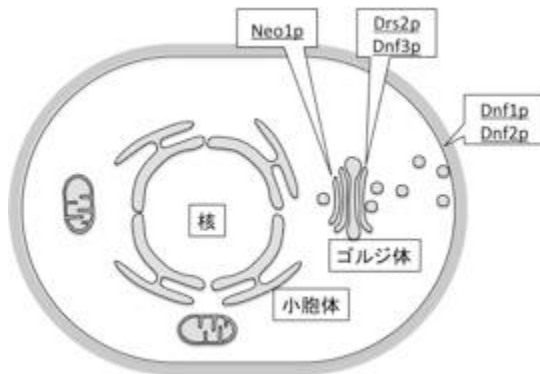


図6. 出芽酵母のフリッパーゼ。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 上川裕輝、辻琢磨、江畑葵、立松律弥子、程晶磊、藤田秋一、田口友彦、藤本豊士、電子顕微鏡によるホスファチジルセリンの局在解析、第 122 回日本解剖学会全国学術集会、2017 年 3 月 28-30 日、長崎県長崎市長崎大学坂本キャンパス

(2) 辻琢磨、江畑葵、上川裕輝、立松律弥子、程晶磊、藤田秋一、田口友彦、藤本豊士、出芽酵母におけるホスファチジルセリンの細胞内分布、第 68 回日本細胞生物学会、2016 年 6 月 15-17 日、京都府京都市京都テルサ

[その他]

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科・分子細胞学ホームページ

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻琢磨 (TSUJI TAKUMA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40725628