

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0152

研究課題名(和文)細胞膜のIdentityの構成的理解

研究課題名(英文)Elucidation of identity of cell membranes by sythetic biological approaches

研究代表者

池ノ内 順一 (Ikenouchi, Junichi)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：10500051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜や細胞小器官など細胞膜のIdentityを規定する分子の候補として、様々な脂質や膜タンパク質などが想定されている。しかしながら、どのような脂質や膜タンパク質が揃えば、細胞膜にIdentityを付与する上で十分な仕組みなのか否か、については、細胞生物学のこれまでの解析手法で証明することができない。そこで、私は本研究課題で、細胞内にリポソームやタンパク質を導入する方法の確立を試みた。その結果、細胞とジャイアントリポソームをエレクトロポレーションにより融合することで、ジャイアントリポソームに内包したリポソームやタンパク質の複合体を細胞内に導入する技術を確立した。

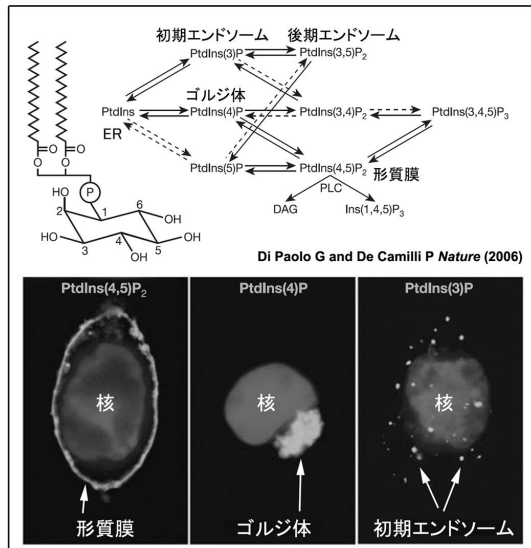
研究成果の概要(英文)：Various lipids and membrane are assumed as candidates for molecules that define the identity of cell membranes such as plasma membrane and organelles. However, it is difficult to determine the minimal combination of lipids and membrane proteins which define specific cell membrane by conventional cell biological approaches. Therefore, we tried to establish a method to introduce liposomes and proteins into cells in this research project. As a result, we established a method to introduce liposome and protein complex encapsulated in giant liposomes into cells by fusing cells with giant liposomes by electroporation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リポソーム エレクトロポレーション 細胞膜 膜タンパク質 細胞質 細胞質流動性 プレブ 細胞小器官

### 1. 研究開始当初の背景

細胞には、形質膜や小胞体、ゴルジ体、エンドソームなどの細胞小器官が存在し、それぞれの細胞膜画分に固有のタンパク質、Rab タンパク質ファミリーなどが存在する。これらの、それぞれの細胞膜画分に限局して存在するタンパク質は、細胞内小器官のマーカー（目印）として利用されている。しかしながら、形質膜や様々な細胞小器官は、細胞の内部でそれぞれが完全に隔絶されて存在するのではなく、常に小胞輸送を介してそれぞれの細胞膜画分同士が互いに連絡しており、脂質やタンパク質がお互いの細胞膜画分を行ったり来たりしている。そのため、それぞれの細胞膜の Identity がどのようなシステムで規定されているか明らかになっていない。近年、細胞膜の Identity を規定する分子の候補として、細胞の中でホスファチジルイノシトールの多様な脂質分子種が提唱された(Di Paolo G and De Camilli P. Nature. 2006) (下図)。



異なるホスファチジルイノシトール分子種が細胞内で異なる局在を示し、細胞膜に Identity を付与するという仮説は魅力的ではあるが、ホスファチジルイノシトールの分子種のみで細胞内の細胞膜の区画化が十分であるかどうかについて、現在の細胞生物学のアプローチでは検証が困難である。

そこで、本研究提案では、合成生物学的なアプローチによりこの問題について取り組むことにした。

### 2. 研究の目的

細胞膜を構成する脂質は数千種類存在する。形質膜や細胞小器官を構成する細胞膜脂質は、これらの多様な脂質の分子が均一に混和して形成されているのではなく、それぞれの細胞膜領域が固有の脂質組成を有すると考えられている。そこで、本研究提案では、脂

質組成を制御したリポソームを細胞内部に導入し、リポソームに集積するタンパク質を解析することによって、細胞膜脂質の組成によってタンパク質の局在化に影響を及ぼすかを明らかにする。すなわち、細胞膜脂質組成が細胞膜の Identity を規定するかどうかを明らかにすることを研究目的とした。

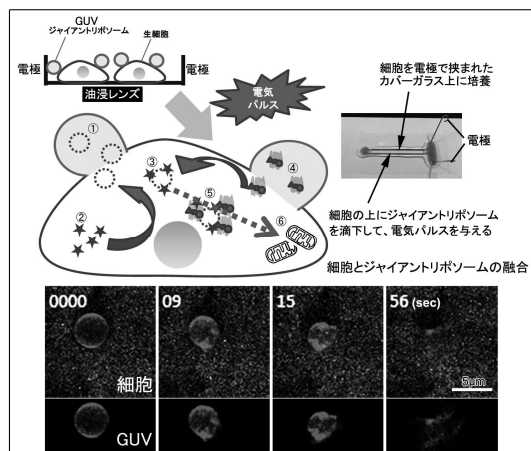
### 3. 研究の方法

多様な細胞膜脂質の中でも、ホスファチジルイノシトールの多様な脂質分子種はそれぞれ異なる細胞内局在を示すことが知られている。また、特定のホスファチジルイノシトール分子種に対しては、ある種のタンパク質の PH ドメインが相互作用することが知られており、細胞膜の Identity を規定する脂質として有力な候補となる。

そこで、本研究では、様々なホスファチジルイノシトールを含む蛍光脂質標識したリポソームを細胞内に上記の方法で導入し、それぞれの細胞膜に異なるタンパク質群を集積させることができるか否かを検証する。そのためには、まず細胞内部に、脂質組成を制御したリポソームを導入する方法論を開発する必要があった。細胞同士を接触させた状態で電気穿孔（エレクトロポレーション）を行うと、細胞同士が融合することが知られている。そこで、細胞とジャイアントリポソームの融合を行うことにより、細胞内にジャイアントリポソームに内包した物質を導入できないか検討した。

### 4. 研究成果

細胞内部にリポソームを導入する方法として、下図に示すような方法を確立した。カバーガラスに電極を固着させたものを自作し、市販の遺伝子導入用エレクトロポレーターを用いて細胞と蛍光脂質で標識したジャイアントリポソームの融合を行った。ジャイアントリポソームを細胞膜に付着させた状態で電気穿孔（エレクトロポレーション）を行うと、細胞膜に融合の様子が観察された。

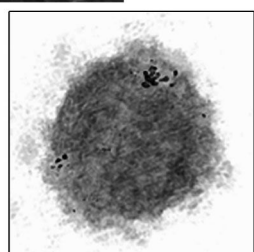
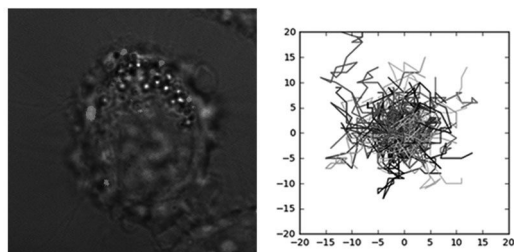


次に、蛍光脂質を含む小さなリポソーム（スモールベジクル）をジャイアントリポソームに内包させて、細胞融合することにより、細胞内部に小さなリポソームを導入する実験を行った。しかしながら、細胞内に導入した蛍光脂質を含むベジクルの蛍光をライブイメージング観察することができなかった。蛍光が観察されなかった原因として、リポソームのサイズが小さく蛍光色素標識脂質由来の蛍光が十分でなかったため観察できなかった可能性がある。このため、顕微鏡の高感度化もしくは、細胞内に導入するリポソームのサイズの検討が必要である。また、細胞内へより多くのリポソームを導入するために、ジャイアントリポソームと細胞の融合効率を高める工夫およびジャイアントリポソームに含まれている小さなリポソームの数を増やす必要がある。

そこで、次に、細胞とジャイアントリポソームの融合効率を上昇させるため、量子ドット（Q-dot）を内包させたジャイアントリポソームを作成し、細胞とジャイアントリポソームの融合効率を高めるため電圧等のエレクトロポレーションの条件検討を行った。導入したQ-dotは蛍光顕微鏡で観察可能であり、ジャイアントリポソームと細胞の融合条件の最適化を行った。

また細胞内部に導入したQ-dotにGFPタンパク質などが集積する様子を観察することができるようなライブイメージング系を立ち上げた。下図に示すように、細胞内に導入したQ-dotの蛍光を追跡することが可能になった。当初の研究計画には無かったが、上述の方法により細胞内部に導入したQ-dotのライブイメージング観察から、細胞質の流動性について興味深い知見が得られた。具体的には、細胞内部に導入したQ-dotの細胞内の軌跡をトラッキングすることにより、細胞質の領域やアクチン細胞骨格の有無によって、Q-dotの細胞質の運動性が変化することを見出した（下図）。

現在、このような細胞質の区画による細胞質流動性の違いに関して、研究を新たに発展させている。



今後は、細胞内部に特定の脂質で被覆したQ-dotなどを導入することにより、特定の脂質を含む細胞膜を細胞内に導入し、内在性のタンパク質がリクルートされる様子を観察したい。さらに細胞膜にタンパク質複合体を付着した状態で導入することにより、最終的に導入したリポソームを核として細胞内小器官の新規合成を誘導することを目指す。

## 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 6 件)

1. Kinoshita M, Ano H, Murata M, Shigetomi K, Ikenouchi J., Matsumori N.

Emphatic visualization of sphingomyelin-rich domains by inter-lipid FRET imaging using fluorescent sphingomyelins.

Sci Rep. 2017 Dec 1;7(1):16801. doi: 10.1038/s41598-017-16361-x. (査読有)

2. Shigetomi K, Ikenouchi J.

Regulation of the epithelial barrier by post-translational modifications of tight junction membrane proteins.

J Biochem. 2017 Nov 24. doi: 10.1093/jb/mvx077. (査読有)

3. Nishimura T, Ito S, Saito H, Hiver S, Shigetomi K, Ikenouchi J., Takeichi M.

DAAM1 stabilizes epithelial junctions by restraining WAVE complex-dependent lateral membrane motility.

J Cell Biol. 2016 Nov 21;215(4):559-573. (査読有)

4. Ikenouchi J.

How do cells sense actin cortex-free membrane?

Cell Cycle. 2016 Oct 17;15(20):2687-8. (査読有)

5. Ikenouchi J., Aoki K.

Membrane bleb : a seesaw game of two small GTPases.

Small GTPases. 2016 doi: 10.1080/21541248.2016.1199266. (Review) (査読有)

6. Aoki K, Maeda F, Nagasako T, Mochizuki Y, Uchida S, and Ikenouchi J.

A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing

Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Mar 29;113(13):E1863-71.

(査読有)

〔学会発表〕(計7件)

1.細胞環境から解き明かす AJ リモデリングの分子機構, ポスター, 樋本 拓也, 松沢健司, 望月 優輝, 池ノ内 順一, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017/12/9, 国内

2.タイトジャンクション形成における細胞膜脂質の関与, ポスター, 重富健太, 池ノ内 順一, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017/12/6, 国内

3. 上皮細胞の細胞膜構造形成における細胞膜脂質の役割, 口頭, 池ノ内 順一, 重富健太, 第 69 回日本細胞生物学会大会, 2017/06/13, 国内

4. Dynamic interplay between plasma membrane and actin cytoskeleton, ポスター, Aoki K, Ikenouchi J. ASCB 2016 annual meeting, San Francisco, 2016/12/5, 国外.

5. 上皮細胞の細胞膜構造形成における細胞膜脂質の役割, 口頭, 池ノ内 順一, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/27, 国内

6.タイトジャンクション形成における細胞膜脂質の関与, 口頭, 重富健太, 池ノ内 順一 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016/6/17, 国内

7. Local reassembly of the actin cortex in membrane blebbing, 口頭, 青木佳南, 前田史世, 長迫智也, 望月優輝, 内田誠一, 池ノ内 順一, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016/6/17, 国内

〔図書〕(計1件)

1. 池ノ内 順一, 細胞膜における脂質の動的な振る舞い, 「生物の科学 遺伝」2017, 71, 20-25

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:

権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
研究代表者の研究室ホームページ  
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~tais>  
ha

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
池ノ内 順一 (IKENOUCHI, Junichi)  
九州大学・理学研究院・教授  
研究者番号: 10500051

(2) 研究分担者 ( )  
研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )  
研究者番号:

(4) 研究協力者 ( )