

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390027

研究課題名（和文） 細胞膜脂質ドメインの構成とダイナミクスの分子解析

研究課題名（英文） Molecular dissection of organization and dynamics of lipid domains in biomembranes

研究代表者

独立行政法人・理化学研究所・基幹研究所・小林脂質生物学研究室・主任研究員

小林 俊秀 (KOBAYASHI TOSHIHIDE)

研究者番号：60162004

研究成果の概要：細胞における脂質の機能の多くはまだ謎として残されている。われわれは脂質の機能を「脂質を見る」ことによって理解しようとしている。われわれのターゲットの一つは脂質ラフトに代表される細胞表面の脂質ドメインであり、もう一つのターゲットはエンドソームにおける脂質ドメインである。この2つの脂質ドメインはコレステロールを介して構造的にも機能的にも深く関連している。本課題においてわれわれはライセニンとデュラマイシンという2つの脂質を見るためのプローブについて解析を進めるとともに、エンドソームの脂質ドメインについてモデル膜および培養細胞を用いた詳細な研究を行った。さらにこれらの研究を通してコレステロールの細胞内のホメオスタシスについて新しい知見を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
20年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：脂質ドメイン、ラフト、脂質プローブ、コレステロール、エンドソーム、エンドサイトーシス、スフィンゴミエリン、脂質結合性毒素

## 1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでに、細胞における脂質の分布、動態を解析するためのさまざまなツールを開発してきた。しかし脂質の機能の全体像に迫るためにはさらに多くの脂質プローブの開発が必要であると考えられた。一方これまで得られたツールを利用して、細胞内のコレステロールに富んだ膜ドメインの動態やエンドソーム脂質の機能を始めて明らかにできる可能性が考えられた。従って本

研究ではプローブの開発とプローブの利用の両方を推し進めることを目指した。

## 2. 研究の目的

以下の2つを主要な目的とした。

- (1) 脂質プローブの開発とキャラクタリゼーション
- (2) 脂質プローブを利用した細胞内コレステロールホメオスタシスの解析

### 3. 研究の方法

(1) 脂質プローブのキャラクタリゼーションはモデル膜との相互作用を等温カロリメトリー、電子顕微鏡観察、X線回折等により測定するとともに、溶血活性の阻害等でスクリーニングを行った。

(2) 細胞内コレステロールのホメオスタシスの測定は培養繊維芽細胞、マクロファージ、メラノーマ細胞変異株等を用い、蛍光標識したコレステロールドメイン特異的化合物、PEG-Cholesterol やエンドソーム特異的脂質ビス(モノアシルグリセロ)リン酸に対するモノクローナル抗体等を用いて測定した。

### 4. 研究成果

(1) ホスファチジルエタノールアミンに特異的に結合するペプチド、デュラマイシンの解析

デュラマイシンはホスファチジルエタノールアミン(PE)を特異的に認識するシンナマイシン(Ro09-0198)に類似した19アミノ酸からなる環状ペプチドである。デュラマイシンの脂質特異性はわかっていない。本研究によりデュラマイシン、シンナマイシンともにエタノールアミンリン脂質(PEおよびエタノールアミンプラスマローゲン)を認識することが示された。モデル膜の研究からデュラマイシンおよびシンナマイシンのPEを含む膜への結合は膜の曲率に依存して起こることが示された。すなわち、どちらのペプチドもより小さな小胞に効率よく結合した。電子顕微鏡観察とX線小角散乱の実験により、これらのペプチドの多重層膜への結合は膜の管状構造を誘起することが示された。これらの結果はデュラマイシン、シンナマイシンは膜の曲率を変化させることによりPE膜に効率良く結合することを示している。

(2) コレステロールの細胞内ホメオスタシス

細胞内のコレステロールホメオスタシスは厳密にコントロールされており、コレステロール代謝に関係した遺伝子の転写にはステロール調節因子結合タンパク質(sterol regulatory element-binding protein (SREBP))が重要な役割を果たしている。糖脂質を欠損した動物細胞変異株の解析から、われわれは成熟型のSREBPが糖脂質の欠損により増加することを見出した。SREBPの標的遺伝子の転写およびコレステロールの生合成も変異株で上昇が見られた。これらの結果は糖脂質が細胞内のコレステロールを制御している可能性を示唆している。細胞はコレステロールを主として低密度リポタンパク質(LDL)のかたちで細胞外から取り込む。取り込まれたコレステロールは後期エンドソーム・リソソームを経て細胞膜へと輸送される。後期エンドソーム特異的脂質であるビス(モノアシルグリセロ)リ

ン酸(bis(monoacylglycerol) phosphate (BMP))はコレステロールのエンドソームからの輸送に重要な役割を果たしている。われわれはBMPがドコサヘキサエン酸(DHA)に極めて富んでいること、また細胞外から加えたDHAはBMPに蓄積し、BMPの分解を引き起こすことを見出した。われわれの結果はDHAがBMPを介して細胞内コレステロールのホメオスタシスに影響を与えることを示唆している。また、われわれは異なったコレステロール結合プローブを用いることにより、コレステロールは細胞表面で一様に分布しているのではなく細胞膜上にはコレステロールの濃度勾配が存在すること、また、このような濃度勾配が存在することがEGFレセプター等の細胞膜レセプターの活性化に関与していることを明らかにした。

チャイニーズハムスター輸卵管由来細胞(CHO細胞)は細胞密度の上昇とともに細胞のコレステロールが増加する。低密度培養と高密度培養の二つの細胞群を用いていくつかの脂質プローブのエンドサイトーシスを測定したところ、低密度培養ではコレステロール類似体やスフィンゴミエリン類似体のリサイクリングエンドソームへの輸送が観察された。一方、高密度培養ではリサイクリングエンドソームへの輸送は観察されなかった。蛍光標識ラクトシルセラミドのエンドサイトーシスは細胞密度の影響を受けないことから、限られた脂質のエンドサイトーシスが細胞密度によって影響を受けることが示唆された。高密度の細胞からコレステロールを除くと蛍光スフィンゴミエリンがリサイクリングエンドソームに輸送されることから、細胞密度に依存したエンドサイトーシスはコレステロールによって制御されていることが示唆された。細胞密度とコレステロールによって制御されているエンドサイトーシスの分子メカニズムを探るため、低分子量GTPase、rabタンパク質の細胞内分布を測定した。われわれの結果はrab11が細胞密度によって細胞内分布を変化させること、またこの変化はコレステロールによって影響を受けることを示している。さらにGTP型rab11は脂質プローブの輸送を初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへと変化させた。これらの結果はコレステロールがrab11を介して膜脂質のエンドサイトーシス経路をコントロールしていることを示唆している。

### 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 19件)

(1) Matsunaga S, Matsunaga T, Iwamoto K,

- Yamada T, Shibayama M, Kawai M, Kobayashi T. (2009) Visualization of Phospholipid Particle Fusion Induced by Duramycin. *Langmuir* in press.(査読有り)
- (2)Takahashi M, Kobayashi T. (2009) Cholesterol regulation of rab-mediated sphingolipid endocytosis. *Glycoconj. J.* in press.(査読有り)
- (3)Baba A, Akagi K, Takayanagi M, Flanagan JG, Kobayashi T, Hattori M. (2009) Fyn tyrosine kinase regulates the surface expression of GPI-linked ephrin via the modulation of sphingomyelin metabolism. *J. Biol. Chem.* 284, 9206-9214.(査読有り)
- (4)Bouvier J, Zemski Berry KA, Hullin-Matsuda F, Makino A, Michaud S, Geloën A, Murphy RC, Kobayashi T, Lagarde M, Delton-Vandenbroucke I. (2009) Selective decrease of bis(monoacylglycero)phosphate content in macrophages by high supplementation with docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 50, 243-255.(査読有り)
- (5)Ichikawa N, Iwabuchi K, Kurihara H, Ishii K, Kobayashi T, Sasaki T, Hattori N, Mizuno Y, Hozumi K, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E. (2009) Binding of laminin-1 to GM1 ganglioside in lipid rafts is critical for neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* 122, 289-299.(査読有り)
- (6)Ishitsuka R, Hirabayashi Y, Kobayashi T. (2009) Glycosphingolipid deficiency increases the sterol regulatory element-mediated gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 240-243.(査読有り)
- (7)Ide T, Kobayashi T, Hirano M. (2008) Lipid Bilayers at the Gel Interface for Single Ion Channel Recordings. *Anal. Chem.* 80, 7792-7795.(査読有り)
- (8)Shogomori H, Kobayashi T. (2008) Lysenin: a sphingomyelin specific pore-forming toxin. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 612-618.(査読有り)
- (9)Hullin-Matsuda F, Kawasaki K, Delton-Vandenbroucke I, Xu Y, Nishijima M, Lagarde M, Schlame M, Kobayashi T. (2007) De novo biosynthesis of the late endosome lipid, bis(monoacyl- glycero)phosphate. *J. Lipid Res.* 48, 1997-2008.(査読有り)
- (10)Iwamoto K, Hayakawa T, Murate M, Makino A, Ito K, Fujisawa T, Kobayashi T. (2007) Curvature-dependent recognition of ethanolamine phospholipids by duramycin and cinnamycin. *Biophys. J.* 93, 1608-1619.(査読有り)
- (11)Takahashi M, Murate M, Fukuda M, Sato SB, Ohta A, Kobayashi T. (2007) Cholesterol controls lipid endocytosis through Rab11. *Mol. Biol. Cell* 18, 2667-2677.(査読有り)
- (12)Takahashi H, Hayakawa T, Kawasaki Y, Ito K, Fujisawa T, Kodama M, Kobayashi T. (2007) Structural characterization of N-lignoceryl (C24:0) sphingomyelin bilayer membranes : A reevaluation. *J.Appl.Cryst.* 40, s312-s317.(査読有り)
- (13)Kurumada S, Onishi A, Imai H, Ishii K, Kobayashi T, Sato SB. (2007) Stage specific association of apolipoprotein A-I and E in developing mouse retina. *Invest. Ophth. Vis.Sci.* 48, 1815-1823.(査読有り)
- (14)Ishitsuka R, Kobayashi T. (2007) Cholesterol and lipid/protein ratio control the oligomerization of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. *Biochemistry* 46, 1495-1502. (査読有り)
- (15)Delton-Vandenbroucke I, Bouvier J, Makino A, Besson N, Pageaux J-F, Lagarde M, Kobayashi T. (2007) Anti-bis(monoacylglycero) phosphate antibody induces the accumulation of acetylated-low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured macrophages. *J. Lipid Res.* 48, 543-552.(査読有り)
- (16)Koseki M, Hirano KI, Masuda D, Ikegami C, Tanaka M, Ota A, Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Sato SB, Kobayashi T, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Matsuura F, Shimomura I, Yamashita S. (2007) Increased lipid rafts and accelerated lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha secretion in Abca1-deficient macrophages. *J. Lipid Res.* 48, 299-306.(査読有り)
- (17)Hayakawa T, Makino A, Murate M, Sugimoto I, Hashimoto Y, Takahashi H, Ito K, Fujisawa T, Matsuo H, Kobayashi T. (2007) pH-dependent formation of membranous cytoplasmic body-like structure of ganglioside GM1/bis(monoacylglycero)phosphate mixed membranes. *Biophys. J.* 92, L13-16.(査読有り)
- (18)Matsunaga S, Yokomori R, Ino D, Yamada T, Kawai M, Kobayashi T. (2007) EC-STM

observation on electrochemical response of fluidic phospholipid monolayer on Au(111) modified with 1-octanethiol. *Electrochem. Commun.* 9, 645-650. (査読有り)

(19)Hullin-Matsuda F, Kobayashi T. (2007) Monitoring the distribution and dynamics of signaling microdomains in living cells with lipid-specific probes. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2492-2504.(査読有り)

〔学会発表〕(計 13件)  
国際学会(招待講演のみ)

(1)Kobayashi T., Abe M., Ishitsuka R., Shimada Y, Makino A, Murate M. (2009年5月) Imaging lipids. The Fourth iCeMS International Symposium: Integrated physical/chemical biology of the cell: from genes to membrane systems. Kyoto, Japan

(2)Kobayashi T. (2009年1月) Imaging lipids, Membranes biologiques & membranes biomimetiques, Lyon, France

(3)Abe M., Hullin-Matsuda F, Inadome H, Ishitsuka R., Iwamoto K, Makino A, Murase K, Murate M., Senoh Y, Ueda Y, Kobayashi T. (2008年9月) Imaging lipids and lipid domains. JSPS-SNSF International Seminar "Membranomics-Science and Engineering of Biomembranes and Its Mimics". Osaka, Japan.

(4)Kobayashi T. (2008年2月) Cholesterol gradient in cell membranes. The 11th International Membrane Research Forum. Kyoto, Japan.

(5)Kobayashi T. (2008年1月) Imaging lipids and lipid domains. 8th International Symposium on Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules. Hyderabad, India.

(6)Kobayashi T. (2007年11月) Lipid domains; Order or chaos? The 3rd Yamada Symposium on From Chaos to Cosmos: Integration in Biological Systems, Hayama, Japan.

(7)Kobayashi T. (2007年5月) Dissecting lipid nanodomains in biomembranes. 2007 Asian Research Network Symposium on Nanoscience and Nanotechnology. Daejeon, Korea.

国内学会(招待講演のみ)

(8)小林俊秀 (2008年11月)「脂質を見ることで見えてきたもの」19thフォーラム・イン・ドージン, 熊本

(9)小林俊秀 (2008年7月) コレステロールを見

る 第二回藤田神経学セミナー、豊明

(10)小林俊秀 (2008年6月) 脂質ラフトは存在するか 第二十二回順天堂大学環境医学研究所セミナー、浦安

(11)小林俊秀 (2008年3月) 脂質ラフトは存在するか? 日本薬学会第128年会、横浜

(12)小林俊秀 (2007年5月) 細胞密度とコレステロールに依存したスフィンゴ脂質のエンドサイトーシス 第2回スフィンゴセラピー研究会、米子

(13)小林俊秀 (2007年3月) 脂質特異的プローブを用いた細胞膜脂質の分布と動態の解析 第112回 日本解剖学会総会・全国学術集会、大阪

〔図書〕(計 1件)

(1)Ishitsuka R., Kobayashi T. (2008) The use of lipid-binding toxins to study distribution and dynamics of sphingolipids and cholesterol (review). in *Probes and Tags to Study Biomolecular Function* (Miller LW. ed.) Wiley-VCH, Weinheim. pp. 53-71.

〔その他〕

研究室ホームページ:

<http://www.riken.jp/lbl/mainpagelbl.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林俊秀 (KOBAYASHI TOSHIHIDE)

独立行政法人・理化学研究所・基幹研究所

小林脂質生物学研究室

主任研究員

研究者番号: 60162004

(2) 研究分担者

石塚玲子 (ISHITSUKA REIKO)

独立行政法人・理化学研究所・基幹研究所

小林脂質生物学研究室

研究員

研究者番号: 60342747

阿部充宏 (ABE MITSUHIRO)

独立行政法人・理化学研究所・基幹研究所

小林脂質生物学研究室

研究員

研究者番号: 90415068

村手源英 (MURATE MOTOHIDE)

独立行政法人・理化学研究所・基幹研究所

小林脂質生物学研究室

研究員

研究者番号: 30311369