

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770122

研究課題名(和文) 細胞膜上の脂質ドメインの形成に関与する因子の同定と解析

研究課題名(英文) Analysis of microdomain formation in cellular membranes

研究代表者

石塚 玲子 (ISHITSUKA REIKO)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：60342747

研究成果の概要：

細胞膜の主要な脂質であるスフィンゴミエリンは、脂質ドメイン(マイクロドメイン)を形成して存在する。マイクロドメインの形成に関わる因子を同定することを目的とし、スフィンゴミエリンドメインのプロープ・ライセニンを用いたスクリーニングを行った。マイクロドメイン形成が異常な細胞の候補として、複数のライセニン耐性細胞を取得し、それらの解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

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：スフィンゴミエリン、脂質ドメイン、ライセニン

1. 研究開始当初の背景

生体膜を構成する脂質は、主としてリン脂質、糖脂質、コレステロールからなる。これらの脂質分子は同一生体膜上で一様に混合しているのではなく、不均一に存在し、脂質ドメイン(マイクロドメイン)を形成している。特殊なマイクロドメインには様々な機能タンパク質が含まれ、ドメイン自身が膜輸送やシグナル伝達などの重要な機能の発現に関与していると考えられている。生体膜脂質

の一種であるスフィンゴミエリンは、そのようなマイクロドメインの主要な構成成分である。またスフィンゴミエリンはスフィンゴミエリナーゼにより加水分解され、分化やアポトーシスのシグナル伝達に関わる分子、セラミドに変換されるが、その反応もマイクロドメインでおきると考えられている。スフィンゴミエリンは細胞の増殖や生存に必須であり、その理由のひとつにマイクロドメイン形成の重要性があげられている。そこでどのようにスフィンゴミエリンの局在や分布状

態が制御されるか、どのようにマイクロドメインが形成されるかが、細胞の機能発現のために重要となる。

研究代表者は、これまでにスフィンゴリエリンの動態と機能を知るためのプローブ開発を目的とし、スフィンゴリエリンに結合するタンパク質・ライセニンの解析を行ってきた。ライセニンはミズ体液より単離された毒素で、細胞表面のスフィンゴリエリンに特異的に結合して細胞死を引き起こす。研究代表者は、ライセニンが「集合」した状態のスフィンゴリエリン、すなわち「スフィンゴリエリンのドメイン」に結合することを明らかにした。さらにライセニンをプローブとして用いて細胞膜上にスフィンゴリエリンのドメインが存在することを示し、さらにスフィンゴリエリンドメインの形成が糖脂質の存在によって制御されることを示した (Ishitsuka *et al. Biophys. J.* (2004) **86**, 298)。

これまで人工脂質膜を用いた物理化学的解析により、マイクロドメインは脂質分子間の相互作用が引き金となって形成されると考えられてきた。しかし実際の細胞におけるマイクロドメインの形成機構やその存在様式はほとんど明らかになっていない。例えば人工膜上のドメインの大きさはマイクロメートルのオーダーであるのに対し、細胞膜上のドメインは数十から数百ナノメートル程度の大きさで報告されている。細胞膜は (1) タンパク質が含まれる、(2) 脂質二重膜の内層・外層を構成する脂質分子種が異なる、(3) 多種多様な脂質分子が存在するというように、人工膜とは非常に異なっていることを考えると、細胞においては細胞膜上の他の脂質やタンパク質分子が、人工膜とは異なる機構で脂質ドメインの形成に関与する可能性が考えられる。例えば脂質ドメインに存在するタンパク質であるカベオリンの発現によって、細胞膜の物性が変化することが報告され、タンパク質がマイクロドメイン形成に関与する可能性も示唆されている。

2. 研究の目的

1. の背景を受け、本研究では細胞膜上のマイクロドメインの形成機構とその役割を明らかにするために、マイクロドメイン形成に関与する因子を同定し、その解析を行う。特にスフィンゴリエリンの局在や分布状態を制御する因子を明らかにすることを目指す。

上述のように研究代表者は細胞膜上のスフィンゴリエリンのドメイン形成が共存す

る脂質分子に影響されることを見出したが、ドメイン形成がさらに別の脂質分子やタンパク質分子によって制御される可能性を検証する。マイクロドメインを制御する責任因子を明らかにすることによって、マイクロドメイン形成を人工的に制御することも可能になり、マイクロドメインの機能解明に役立つと期待できる。

3. 研究の方法

細胞において、スフィンゴリエリンはゴルジ体で合成され、細胞膜に輸送される。本研究ではRNAi ライブラリーを用いて種々のタンパク質の発現を低下させた細胞群を調製し、細胞表面のスフィンゴリエリンに特異的に結合して細胞死を引き起こす毒素・ライセニンに対し、感受性を示さず耐性となる細胞をスクリーニングする。ライセニン耐性となる原因には、第一にスフィンゴリエリンの合成の欠損、第二に輸送経路に異常があることがあげられる。第三に、ライセニンはクラスター化したスフィンゴリエリン (スフィンゴリエリンドメイン) を認識するため、細胞表面にスフィンゴリエリンを発現していてもスフィンゴリエリンドメインが形成されない細胞もライセニン耐性となる。

スフィンゴリエリンの輸送が異常な細胞、およびスフィンゴリエリンドメインが形成されない細胞について、その原因分子を同定し、解析を行う。図1にスクリーニングの概要を示す。

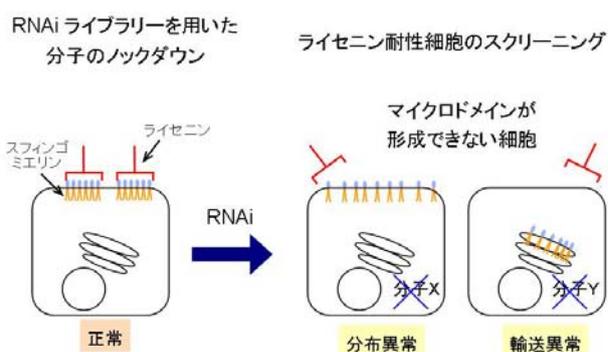


図1 ライセニンを用いたスクリーニング

(1) ライセニン耐性細胞のスクリーニング

RNAi (RNA interference) による遺伝子発現抑制を引き起こした細胞群から、ライセニン耐性細胞のスクリーニングを行なった。

①約 8,500 種のヒト遺伝子に対する siRNA

(short interfering RNA)ライブラリーを用いて、RNAi を誘導した細胞群を調製した。本研究では、持続的に遺伝子発現の抑制を引き起こすことのできるウイルスベクター（レンチウイルスベクター）を用いた。

②細胞をウイルスに感染させ、3 日あるいは 10 日間培養後、正常細胞がライセニンに感受性を示す条件下でライセニン処理を行った。その後、ライセニンに耐性を示す細胞を培養し、クローン化した。

③②のライセニンに耐性を示す細胞について、total RNA を抽出後、RT-PCR によりゲノムに組み込まれた siRNA 配列を増幅し、配列解析により原因遺伝子を同定した。

④同定した分子について、改めて RNAi による遺伝子発現抑制を行い、細胞がライセニン耐性を示すかどうかを調べた。

(2) ライセニン耐性細胞の特徴づけ

①スフィンゴミエリンプローブの結合性
(1)で得られたライセニン耐性細胞について、スフィンゴミエリンプローブ（蛍光標識した無毒化ライセニン）を用い、細胞表面のスフィンゴミエリンの局在を蛍光顕微鏡により調べた。

②スフィンゴミエリン合成活性の解析
スフィンゴミエリンが合成されない場合、細胞はライセニン耐性を示す。そこで得られたライセニン耐性細胞について、蛍光標識したスフィンゴミエリン前駆体を用い、スフィンゴミエリン合成および糖脂質の合成活性について調べた。

4. 研究成果

(1)ライセニン耐性細胞のスクリーニング
RNAi を誘導した細胞群について、ライセニン耐性細胞のスクリーニングを行った。培養条件やライセニンの濃度、ライセニン処理を行なう回数などを検討し、ライセニン耐性細胞を効率よく濃縮できる条件を決定した。このようにして得られた細胞株について、再度ライセニン感受性を指標としたスクリーニングを行い、数十種類のライセニン耐性細胞を取得した。ライセニン感受性試験の結果を図 2 に示す。

これらライセニン耐性を示す細胞株について、それぞれ total RNA を抽出し、RT-PCR によりゲノムに組み込まれた siRNA 配列を増幅し、配列解析を行なった。その結果、17

種類の RNAi ターゲット遺伝子が同定された。そのうち 3 種類のターゲット遺伝子は、複数の細胞株から同定された。

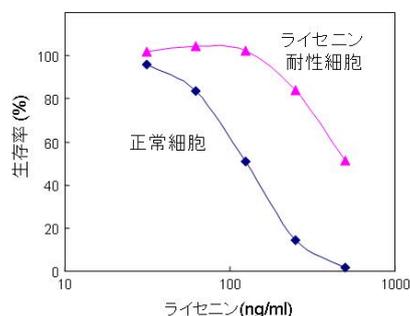


図 2 ライセニンに対する感受性試験

(2) ライセニン耐性細胞の特徴づけ

①スフィンゴミエリンプローブの結合性
スフィンゴミエリンプローブ（蛍光標識無毒化ライセニン）は、得られたライセニン耐性細胞に結合しなかった。そのため、細胞表面のスフィンゴミエリンの量が減少しているか、分布状態が変化している（マイクロドメインを形成していない）可能性が考えられた。

②スフィンゴミエリン合成活性の解析
蛍光脂質を用いてスフィンゴミエリンおよび糖脂質の合成活性を調べた。その結果、合成された糖脂質量は、耐性細胞とコントロール細胞とで差がなかった。この耐性細胞のスフィンゴミエリンの合成量はコントロールに比べて 20%程度減少していたが、この細胞はスフィンゴミエリン合成活性を持つことが明らかになった。よってスフィンゴミエリンの輸送あるいは分布状態が変化している可能性が考えられた。

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 1 件）

- ① Ishitsuka, R., Hirabayashi, Y. and Kobayashi T. (2009) Glycosphingolipid deficiency increases the sterol regulatory element-mediated gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378: 240-3 （査読あり）

[学会発表] (計2件)

①石塚玲子、スフィンゴミエリンドメイン形成に関わる因子のスクリーニング、理研シンポジウム「第4回ケミカルバイオロジーシンポジウム：化学－生物融合領域創製の奇跡」熱海、2008年2月

②Ishitsuka, R. Cholesterol controls the oligomerization of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting, Washington DC, USA, December 1-5, 2007.

[図書] (計1件)

①Ishitsuka R. and Kobayashi T. (2008) The use of lipid-binding toxins to study distribution and dynamics of sphingolipids and cholesterol. in: Probes and Tags to Study Biomolecular Function (Weinreich F. Ed.) pp. 53-71. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石塚 玲子 (ISHITSUKA REIKO)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：60342747