

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390018

研究課題名（和文） 生体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 the organization and dynamics of lipid domains in biomembranes

研究代表者

小林 俊秀 (KOBAYASHI TOSHIHIDE)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・主任研究員

研究者番号：60162004

研究成果の概要（和文）：

1. 脂質ラフトの主要成分であるスフィンゴミエリンとコレステロールをサブミクロンスケールで観察する研究手法を確立した。
2. 脂質可視化を利用したスクリーニング系を確立し、スフィンゴミエリン合成の新規阻害剤の同定に成功した。
3. 情報伝達脂質であるセラミドやジアシルグリセロールの膜を横切るフリップフロップ運動をスフィンゴミエリンが制御するメカニズムを発見し、新しい細胞内情報伝達機構を提唱した。
4. エンドソーム特異的脂質の構造決定を行い、通常の脂質とは鏡像関係にある特異な脂質であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

1. We established a method to visualize major components of lipid rafts, sphingomyelin and cholesterol, in sub-micron scale.
2. New screening protocol using lipid imaging was employed to isolate a new inhibitor of sphingomyelin biosynthesis.
3. The role of sphingomyelin to regulate the transbilayer movement of lipid second messengers such as ceramide and diacylglycerol was elucidated.
4. The unusual stereoconfiguration of endosome-specific lipid was determined.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 6,800,000 | 2,040,000 | 8,840,000 |
| 2011年度 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |
| 2012年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,700,000 | 4,110,000 | 17,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脂質ドメイン、脂質プローブ、脂質ラフト、脂質の非対称性、スフィンゴミエリン、コレステロール

1. 研究開始当初の背景

生体膜の基本構造である脂質二重層構造

はたった1種類の脂質分子を用いただけで再現することができる。にもかかわらず自然

界には数千の脂質分子が存在している。異なった生物、異なった臓器は特徴的な脂質組成を示し、また異なった細胞は異なった脂質組成を持っている。脂質組成はオルガネラ間でも異なっており、小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジネットワーク、形質膜と細胞の外側に向かうにしたがってコレステロールとスフィンゴ脂質の含量が増加する。またミトコンドリアには特異的なリン脂質であるカルジオリピンが存在し、後期エンドソームにはビス(モノアシルグリセロ)リン酸が局在する。さらに生体膜の脂質二重層の内層と外層の間でも脂質組成は異なっている。形質膜あるいはオルガネラ特異的脂質は特徴的な脂質集合体を形成することによりその機能を発揮していると考えられるが、このような脂質ドメインのキャラクタリゼーションは進んでいなかった。本研究では「脂質を見る」ことによりスフィンゴミエリンに富んだ形質膜脂質ドメインの機能を知るとともに、エンドソーム特異的脂質ドメインのキャラクタリゼーションの第一歩として脂質の構造を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

- (1) 脂質ラフトの微細構造を可視化する技術を開発する。
- (2) 「脂質ラフトを見る」ことによりラフトの機能を明らかにする。
- (3) 「脂質ラフトを見る」ことを利用して新たな脂質代謝、輸送の阻害剤を取得する。
- (4) 後期エンドソームで特異的脂質ドメインを形成し、細胞内コレステロールのホメオスタシスを制御しているビス(モノアシル)グリセロリン酸の解析を進める。

3. 研究の方法

- (1) 脂質ラフトの構成成分であるスフィンゴミエリンおよびコレステロールに特異的に結合する無毒プローブを開発するとともに超高分解像顕微鏡、フリーズフラクチャー免疫電子顕微鏡、原子間力顕微鏡を併用し、ラフト脂質の可視化を目指す。
- (2) FRET 顕微鏡やビデオ顕微鏡を上記の方法と併用し、ラフトの機能を明らかにする。
- (3) ハイスループットでの顕微鏡スクリーニングを導入し、新規阻害剤の取得を目指す。
- (4) 有機合成と生化学を併用し、エンドソーム特異的脂質の構造を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 本研究ではスフィンゴミエリンのクラスターを認識するタンパク質、ライセニンを用いて細胞におけるスフィンゴミエリンドメインの構造、動態、機能の解析を行った。ライセニンと蛍光タンパクとの融合タンパク質を用い、細胞分裂時におけるスフィン

ゴミエリンドメインの動態を観察したところ、ライセニンは分裂溝の細胞膜外層に濃縮されることが観察された。細胞膜からスフィンゴミエリンを除去すると細胞分裂が阻害されることからスフィンゴミエリンドメインが細胞分裂に於いて重要な役割を果たしていることが示唆された。

細胞質分裂では低分子量 G タンパク質である RhoA が分裂溝にリクルートされることがその後の分裂カスケードの引き金となるが、RhoA のリクルートのためにはホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP₂) が分裂溝に濃縮されることが重要であることが知られている。超解像顕微鏡 PALM (Photoactivated localization microscopy) を用いた解析からスフィンゴミエリンドメインの裏側には PIP₂ ドメインが存在することが明らかになった。PIP₂ ドメインはスフィンゴミエリンの除去や合成阻害により消失した。またスフィンゴミエリンの除去により RhoA の分裂溝へのリクルートも阻害された。これらの結果は PIP₂ の分裂溝への集積にスフィンゴミエリンドメインが重要な役割を果たしていることを示唆している。

- (2) 動物細胞形質膜脂質二重層の内層と外層では脂質組成は異なっており、内層には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等のアミノ基を持ったリン脂質やイノシトールリン脂質が分布しているのに対して、外層にはホスファチジルコリンやスフィンゴ脂質が多い。このような非対称分布の結果、内層と外層では脂質の構造や物性が異なるが、脂質の非対称性の生理的意味はあまりわかっていない。形質膜を形成するリン脂質や糖脂質は膜内を非常に速く拡散しているが、膜を横切る動き(フリップフロップ)は非常に遅く、このことが膜の非対称性を補償している。フリップフロップ速度は脂質の極性に大きな影響を受け、ジアシルグリセロール(DAG)やセラミド等の極性基の小さな脂質のフリップフロップ速度は、主としてモデル膜の実験から、非常に速いと考えられている。

DAG は細胞増殖、細胞分化などに関与する脂質セカンドメッセンジャーとして良く知られている。今回、我々はモデル膜と細胞膜での DAG のフリップフロップを測定し、スフィンゴミエリンに富んだ膜ではフリップフロップが遅くなることを見出した。また我々は形質膜外層に DAG のプールが存在することを示した。我々の結果はスフィンゴミエリンが DAG のフリップフロップを介して、DAG による細胞内シグナルを制御している可能性を示唆している。

- (3) コレステロールは生体膜の主要な脂質

で、シグナル伝達や膜輸送に関わる微小な脂質ドメインの形成に重要な役割を果たす。細胞におけるコレステロールの量と局在は厳密に調節されているが、そのメカニズムは完全には明らかでない。本研究ではコレステロール代謝や局在に関わる因子を明らかにするために、化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。初めに θ トキシンを用い、細胞膜コレステロールの可視化によるスクリーニング法を確立した。 θ トキシンは *Clostridium perfringens* 由来の pore-forming 毒素で、コレステロールに富んだ膜に結合するタンパク質である。細胞染色には、毒性のない θ トキシン C 末端ドメイン (ドメイン4) に EGFP を融合させたタンパク質 (EGFP-D4) を用いた。通常の細胞ではコレステロールは細胞膜に多く存在し、EGFP-D4 で染色されるが、コレステロール代謝や輸送、分布の異常によって細胞表面コレステロールが減少すると、EGFP-D4 は結合しなくなる。この系を用いて 1056 種の化合物をスクリーニングした結果、既知のコレステロール合成阻害剤など 8 化合物の他、27 種類の化合物が得られた。得られた化合物について、細胞内コレステロール分布への影響を調べたところ、17 種類の化合物がコレステロールを後期エンドソームに蓄積させることがわかった。また 2 種類の化合物が EGFP-D4 の細胞膜への結合を阻害し、5 種類の化合物にコレステロール合成を阻害する活性があることが明らかになった。このようにコレステロールプローブを用いたスクリーニングにより、新しいコレステロール合成阻害剤や、コレステロール局在を変化させる化合物を得ることができた。

(4) リモノイド (Limonoid) は、柑橘類やその他のミカン科やセンダン科の植物に多く含まれる一群のフィトケミカルで、果物の苦み成分であるとともに、抗マラリア作用、抗がん作用を持つことが報告されているが、メカニズムの詳細はわかっていない。

われわれは Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用い、スフィンゴミエリン特異的毒素ライセニンに耐性を付与する低分子化合物をスクリーニングする過程で、ある種の抗がん性リモノイド化合物がスフィンゴミエリンの合成を阻害することを見出した。前駆体としてセリンを用いた場合にもジヒドロスフィンゴシンを用いた場合にもスフィンゴミエリン合成は阻害されることからセラミド合成以降の過程がリモノイド化合物によって阻害されていることが示唆された。

リモノイドによるスフィンゴミエリン合成の阻害は小胞体とゴルジ体を融合させる brefeldin A 処理により解消した。このことはリモノイドはスフィンゴミエリン合成酵素やセラミド合成酵素を阻害しているのでは

なく、セラミドの小胞体からゴルジ体への移行を阻害していることを示している。しかし蛍光標識したセラミド類似体のゴルジ体への蓄積は CERT 阻害剤である HPA-12 では抑えられたがリモノイドは影響を与えなかった。一方 *in vitro* での CERT によるセラミドの小胞体画分からの引き抜きはリモノイド化合物により HPA-12 と同程度に抑えられた。CERT によるセラミドの引き抜き阻害はリボソームを用いた実験でも再現することができた。

これらの結果は抗がん性リモノイドはスフィンゴ脂質代謝を変化させることによりその効果を発揮していることを示唆している。

(5) ビス (モノアシルグリセロ) リン酸 (BMP) (リゾビスホスファチジン酸 (LBPA)) は後期エンドソームの内膜に局在するリン脂質である。BMP/LBPA の立体構造、生合成および分解経路、機能についてはわかっていないことが多い。われわれは化学合成を用いたアプローチにより BMP/LBPA の 2 つのグリセロリン酸が sn-1-sn-1' の立体構造をとっていることを明らかにした。これまで報告されている真核生物およびバクテリアのリン脂質のグリセロリン酸の立体配置はすべて sn-3 であるのに対して、古細菌では sn-1 の立体配置であることは良く知られている。BMP/LBPA は真核生物およびバクテリアで唯一の sn-1 型のリン脂質であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 件)

① Ueda Y, Makino A, Murase-Tamada K, Sakai S, Inaba T, Hullin-Matsuda F, and T. Kobayashi. (2013) Sphingomyelin regulates the transbilayer movement of diacylglycerol in the plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *FASEB J* in press (査読有) .

② Kato U, Inadome H, Yamamoto M, Emoto K, Kobayashi T, and M. Umeda. (2013) Role for phospholipid flippase complex of ATP8A1 and CDC50A proteins in cell migration. *J Biol Chem* 288: 4922-4934 (査読有) .

③ Hullin-Matsuda F, Tomishige N, Sakai S, Ishitsuka R, Ishii K, Makino A, Greimel P, Abe M, Laviad EL, Lagarde M, Vidal H, Saito T, Osada H, Hanada K, Futerman AH, and T. Kobayashi. (2012) Limonoid compounds inhibit sphingomyelin biosynthesis by preventing CERT protein-dependent extraction of ceramides from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 287:

24397-24411 (査読有) .

④ Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kamijo K, Ohno-Iwashita Y, Hanada K, Mizuno H, Miyawaki A, and T. Kobayashi. (2012) A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of PIP2 to the cleavage furrow during cytokinesis. *Mol Cell Biol* 32: 1396-1407 (査読有) .

⑤ Wang T, Shogomori H, Hara M, Yamada T, and T. Kobayashi. (2012). Nano-mechanical recognition of sphingomyelin-rich membrane domains by atomic force microscopy. *Biochemistry*. 51: 74-82 (査読有) .

⑥ Ogushi F, Ishitsuka R, Kobayashi T, and Y. Sugita. (2012). Rapid flip-flop motions of diacylglycerol and ceramide in phospholipid bilayers. *Chem Phys Lett*. 522: 96-102 (査読有) .

⑦ Tan H-H, Makino A, Sudesh K, Greimel P, and T. Kobayashi. (2012). Spectroscopic evidence for the unusual stereochemical configuration of an endosome-specific lipid. *Angew Chem Int Ed*. 51: 533-535 (査読有) .

⑧ Ishitsuka R, Saito T, Osada H, Ohno-Iwashita Y, and T. Kobayashi. (2011). Fluorescence image screening for chemical compounds modifying cholesterol metabolism and distribution. *J Lipid Res*. 52:2084-2094 (査読有) .

⑨ Mizuno H, Abe M, Dedecker P, Makino A, Rocha S, Ohno-Iwashita Y, Hofkens J, Kobayashi T, and A. Miyawaki. (2011). Fluorescent probes for superresolution imaging of lipid domains on the plasma membrane. *Chem Sci*. 2:1548-1553 (査読有) .

⑩ Nabetani T, Makino A, Hullin-Matsuda F, Hirakawa T, Takeoka S, Okino N, Ito M, Kobayashi T, and Y. Hirabayashi. (2011). Multiplex analysis of sphingolipids using amine-reactive tags (iTRAQ) *J Lipid Res*. 52:1294-1302 (査読有) .

⑪ Murate M, Hayakawa T, Ishii K, Inadome H, Greimel P, Watanabe Y, Nagatsuka Y, Ito K, Ito Y, Takahashi H, Hirabayashi Y, and T. Kobayashi. (2010). Phosphatidylglucoside forms specific lipid domains on the outer leaflet of the plasma membrane. *Biochemistry*. 49: 4732-4739 (査読有) .

⑫ Nishimura S, Arita Y, Honda M, Iwamoto K, Matsuyama A, Shirai A, Kawasaki H, Kakeya H,

Kobayashi T, Matsunaga S, and M. Yoshida. (2010). Marine antifungal theonellamides target 3 β -hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nat Chem Biol*. 6: 519-526 (査読有) .

[学会発表] (計 97 件)

① 阿部充宏, 牧野麻美, ウラン松田フランソワーズ, 小林俊秀「細胞質分裂におけるスフィンゴミエリンドメインの役割」第 85 回生化学会大会、福岡、2012 年 12 月 14-16 日 (招待講演)

② Abe, M., A. Makino, F. Hullin-Matsuda, and T. Kobayashi. “A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis”. Lipid-Protein Interactions in Membranes: Implications for Health and Disease, Hyderabad, India, November 1-5, 2012 (invited).

③ 小林俊秀「エンドソーム特異的脂質の構造、代謝、機能」第 54 回日本脂質生化学会、福岡、2012 年 6 月 7-8 日 (招待講演)

④ Kobayashi, T. “Session chair’s overview”. Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology, Lucca, Italy, April 22-27, 2012 (invited).

⑤ Kobayashi, T. “Imaging lipids and lipid domains. International ERATO Symposium on Lipid Structures in and around Proteins”, Osaka, Nov 11-14, 2011 (invited).

⑥ 小林俊秀「脂質のダイナミズムを見るー脂質・蛋白質相互作用の解析」第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011 年 9 月 14-17 日 (招待講演)

⑦ Kobayashi, T., Abe, M., Ishitsuka, R., Kishimoto, T., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., and M. Murate. “Imaging lipid domains”. 30th Naito conference, “Membrane Dynamics and Lipid Biology [II]”, Sapporo, Jun 28-Jul 1, 2011 (invited).

⑧ 小林俊秀, 阿部充宏, 岸本拓磨, 牧野麻美, Hullin-Matsuda Françoise, 石塚玲子, 村手源英「Visualization of lipids and lipid domains」第 53 回日本脂質生化学会、東京、2011 年 5 月 12-13 日 (招待講演)

⑨ 小林俊秀「脂質ラフトのイメージング」第 3 回セラミド研究会学術集会、東京、2010 年 11 月 11-12 日 (招待講演)

⑩ Kobayashi, T. “Tool box for imaging lipids and lipid domains (I) (II). ISN International School: Lipidomics in the nervous system cells”. Catania, Italy, May 17-21, 2010 (invited).

[その他]

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・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・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号: 60342747

阿部 充宏 (ABE MITSUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・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・小林脂質生物学研究室・研究員

研究者番号: 30311369

牧野 麻美 (MAKINO ASAMI)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・特別研究員

研究者番号: 20373368