

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590251

研究課題名(和文)細胞膜の内外層にある多種の脂質クラスターと膜タンパク質の相互関係の電子顕微鏡解析

研究課題名(英文)Electron microscopic analysis of lipid clusters and membrane proteins in plasma membrane.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜を構成する複数の脂質の分布を、特異的に結合するプローブを用いて検出した。人工膜を用いた実験により、用いたプローブはいずれも全体の1%あれば十分であり、また周囲の脂質環境に影響されことなく検出できることが確認された。これらのことから、細胞膜の内層と外層を分離して検出できる本実験方法において、内外層で見られた結果を比較できることが示された。これらのプローブを用いて、トロンビン刺激した血小板の細胞膜における脂質分布を調べたところ、膜上の特定の箇所では脂質分子の内外層における非対称性の破綻が生じ、そこから血液凝固作用に必要なマイクロパーティクルが形成されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined transbilayer and lateral lipid distribution in plasma membrane using recently developed peptide/proteins that selectively bind specific lipids or lipid clusters. The liposome experiments demonstrated that the lipids were effectively detected by the probes even when the membrane concentration was as low as 1 mol%, and the probes bound similarly to the model membranes that mimic outer or inner leaflet lipid environment. Next, we examined the distribution of sphingomyelin and phosphatidylserine in resting and thrombin-stimulated platelets as well as platelet microparticles that are highly procoagulant. Our results indicate that the scrambled membranes are selectively released in the form of microparticles in thrombin-activated platelets and suggest the idea that the exposure of phosphatidylserine in inner leaflet to the outer triggers the vesiculation of platelets.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：脂質ドメイン フリースフラクチャー 脂質結合タンパク質 血小板 マイクロパーティクル スフィンゴミエリン ホスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

私は、細胞膜の機能を解明するために、これまでに細胞膜を構成する多種の脂質の局在と分布状態を明らかにしてきた。その結果、内層と外層それぞれに異なる脂質が集積し、おのおの異なるドメインを作っていることが示された。

2. 研究の目的

以下の2つを目的とした。

- (1) 脂質の検出に用いたプローブの特異性と検出効率を明らかにする。
- (2) 細胞の種類や状態によって脂質の局在がどのように変化するかを明らかにする。

3. 研究の方法

1 については、さまざまな種類と濃度の脂質からなるモデル膜を作成し、SDS 処理凍結割断レプリカ電子顕微鏡法により解析した。

2 については、トロンピンで刺激した血小板と未刺激の血小板を材料にして、ホスファチジルセリンとスフィンゴミエリンの分布を SDS 処理凍結割断レプリカ電子顕微鏡法により解析した。

4. 研究成果

1 について。

本研究で用いたプローブである抗ホスファチジルコリン抗体、スフィンゴミエリンに結合するライセニン、ホスファチジルエタノールアミンに結合するデュラマイシン、抗ホスファチジルセリン抗体については、対象となる脂質が 1 mol% の濃度で検出できることが示された。また、抗ホスファチジルイノシトール - 4, 5 - 2 リン酸抗体については、対象となる脂質が 0.1 mol% 含まれていれば認識できることがわかった。さらに、これらのプローブの対象となる脂質への結合は周囲の脂質に影響されないことが示されたため、SDS 処理凍結割断レプリカ電子顕微鏡法によって細胞膜の内外層を分離した状態で、それぞれに含まれる脂質を比較検討できることが示された。

2 について。

未刺激の血小板の細胞膜においては、赤血球の細胞膜と同様にスフィンゴミエリンが外層に、ホスファチジルセリンが内層に限定して局在しており、内外層における脂質分布の非対称性はきわめて厳密に保持されていることが示された。トロンピン刺激後の血小板においても、上記の細胞膜内外層における脂質の非対称分布は維持されていたが、ごく一部の領域でホスファチジルセリンが外層で検出された。一方、血小板から産生されるマイクロパーティクルの膜においては、脂質分布の非対称性は破綻していた。これらのことから、マイクロパーティクルの産生に先立って、細胞膜の内外層間で脂質の移動を行うタンパク質が局所的に活性化されることに

より、脂質が内外層で反転する現象が起こるのではないかと考えられる。また、細胞膜における脂質の分布は、きわめて厳密なコントロール下にあ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 3件)

- (1) Bhat HB, Kishimoto T, Abe M, Makino A, Inaba T, Murate M, Dohmae N, Kurahashi A, Nishibori K, Fujimori F, Greimel P, Ishitsuka R, Kobayashi T. (2013) Binding of a pleurotolysin ortholog from *Pleurotus eryngii* to sphingomyelin and cholesterol-rich membrane domains. *J. Lipid Res.* 54, 2933-2943. (査読あり) DOI: 10.1194/jlr.D041731
- (2) Takahashi H, Hayakawa T, Murate M, Greimel P, Nagatsuka Y, Kobayashi T, Hirabayashi Y. (2012) Phosphatidylglucoside: Its structure, thermal behavior, and domain formation in plasma membranes. *Chem. Phys. Lipids* 165, 197-206. (査読あり) DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2011.12.010
- (3) Sarker SR, Arai S, Murate M, Takahashi H, Takata M, Kobayashi T, Takeoka S. (2012). Evaluation of the influence of ionization states and spacers in the thermotropic phase behaviour of amino acid-based cationic lipids and the transfection efficiency of their assemblies. *Int. J. Pharma.* 422, 364-373. (査読あり) DOI: 10.1016/j.ipharm.2011.10.044

[学会発表](計 17件)

- (1) Murate M. (2013年9月20日) Transbilayer lipid distribution on the plasma membrane monitored by SDS-freeze fracture replica method. Scientific Symposium on Applications of Advanced Microscopy Technique in Materials and Life Sciences, Ljubljana, Slovenia.
- (2) Greimel P, Murate M, Hullin-Matsuda F, Iwamoto K, Ito K, Takata M, Kobayashi M, Takahashi H, Kobayashi T. (2013年9月17-21日) Cardiolipin polymorphism: Molecular mechanism of inhibition. 54th International Conference on the Biosciences of Lipids, Bari, Italy.
- (3) Greimel P, Murate M, Hullin-Matsuda F, Iwamoto K, Ito K, Takata M, Kobayashi M, Takahashi H, Kobayashi T. (2013年9月17-21日) Cardiolipin polymorphism:

- Molecular mechanism of inhibition by 10-N-nonyl acridine orange. Cardiolipin as key lipid of mitochondria in health and disease. 54th International Conference on the Biosciences of Lipids,, Bari, Italy.
- (4) Makino A, Hullin-Matsuda F, Murate M, Abe M, Fukuda M, Yamashita S, Fujimoto T, Vidal H, Lagarde M, Delton-Vandenbroucke I, Kobayashi T. (2013年9月11-13日) Free cholesterol loading induces the degradation of perilipin 2 and rab18-dependent abnormal lipidation of apolipoprotein B in cultured hepatocytes. 第86回日本生化学会大会、横浜 .
- (5) 岸本拓磨、稲葉岳彦、田島拓也、阿部充宏、村手源英、牧野麻美、石塚玲子、池田康夫、武岡真司、小林俊秀 .(2013年5月24日) Membrane deformation by phospholipase C beta 1. 理研シンポジウム脂質・タンパク質相互作用：分子から細胞へ、和光 .
- (6) Tajima T, Inaba T, Kishimoto T, Abe M, Murate M, Makino A, Sakai S, Hullin-Matsuda F, Ishitsuka R, Ikeda Y, Takeoka S, Kobayashi T. (2013年3月15-17日) Transformation of phosphatidylethanolamine- and phosphatidylserine-containing membranes by phospholipase C beta 1. 14th International Membrane Research Forum, Kyoto.
- (7) Greimel P, Murate M, Takahashi H, Kobayashi T. (2013年3月15-17日) Revisiting the interaction of 10 N-nonyl acridine orange with cardiolipin. 14th International Membrane Research Forum, Kyoto.
- (8) Bhat HB, Kishimoto T, Abe M, Makino A, Inaba T, Murate M, Dohmae N, Kurahashi A, Nishibori K, Fujimori F, Ishitsuka R, Kobayashi T. (2013年3月15-17日) Binding of pleurotolysin ortholog from *Pleuroyus eryngii* to sphingomyelin and cholesterol-rich membrane domains. 14th International Membrane Research Forum, Kyoto.
- (9) Tajima T, Inaba T, Kishimoto T, Abe M, Murate M, Sakai S, Ishitsuka R, Ikeda Y, Takeoka S, Kobayashi T. (2012年11月29日) Phospholipase C-beta 1b changes the shape of phosphatidylethanolamine-containing membranes. RIKEN Nano Science Joint Laboratory Forum, Wako.
- (10) Tajima T, Inaba T, Kishimoto T, Abe M, Murate M, Sakai S, Ishitsuka R, Ikeda Y, Takeoka S, Kobayashi T. (2012年11月1-5日) Phospholipase C-beta 1b changes the shape of phosphatidylethanolamine-containing membranes. Lipid-Protein Interactions in Membranes: Implications for Health and Disease, Hyderabad, India.
- (11) Murate M, Abe M, Umeda M, Kobayashi T. (2012年9月5-8日) Revisiting plasma membrane lipid asymmetry. 53rd International Conference on the Bioscience of Lipids, Banff, Canada.
- (12) Greimel P, Murate M, Hullin-Matsuda F, Nabetani T, Iwamoto K, Ito K, Takata M, Kobayashi M, Takahashi H, Kobayashi T. (2012年9月5-8日) Molecular mechanism of the inhibition of cardiolipin polymorphism by 10-N-Nonyl Acridine Orange. 53rd International Conference on the Bioscience of Lipids, Banff, Canada.
- (13) Greimel P, Murate M, Hullin-Matsuda F, Nabetani T, Iwamoto K, Ito K, Takata M, Takahashi H, Kobayashi T. (2011年11月11-14日) Imaging lipids and lipid domains. International Symposium on Lipid Structures in and around Proteins, Osaka.
- (14) 高橋浩、早川智広、村手源英、Greimel P、長塚靖子、小林俊秀、平林義雄 .(2011年9月7-9日) 新規糖リン脂質ホスファチジルグルコシドの転移温度・エンタルピー値について .第63回コロイドおよび界面化学討論会、京都 .
- (15) 牧野麻美、Hullin-Matsuda F、村手源英、阿部充宏、Vandenbroucke I、Lagarde M、小林俊秀 .(2011年6月28日-7月1日) . Endoplasmic reticulum cholesterol controls both ApoB secretion and the formation of lipid droplets. 第30回内藤コンファレンス「生体膜ダイナミクスと脂質生物学 []: 脂質ドメイン、脂肪滴、疾患」、札幌 .
- (16) 小林俊秀、阿部充宏、石塚玲子、岸本拓磨、牧野麻美、Hullin-Matsuda F、村手源英 .(2011年6月28日-7月1日) .Imaging lipid domains.第30回内藤コンファレンス「生体膜ダイナミクスと脂質生物学 []: 脂質ドメイン、脂肪滴、疾患」、札幌 .

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

〔その他〕

ホームページ等

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

<http://www.asi.riken.jp/jp/laboratories/chieflabs/lipid/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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