

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657143

研究課題名(和文) 脂質ラフトの裏側を見る

研究課題名(英文) Imaging the opposite side of lipid raft

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：形質膜上のスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ脂質ドメインである脂質ラフトは、様々な生理機能に重要な役割を果たしていると考えられるが、その微細構造は良くわかっていない。我々は脂質ラフトに結合する新奇プローブタンパク質を開発するとともに、脂質ラフトの分布、動態を測定することにより、脂質セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロールの膜を横切る運動がスフィンゴミエリンによって制御されていること、また腺維芽細胞ではスフィンゴミエリンに富んだ脂質ドメインが形質膜脂質二重層の内層にも外層にも存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lipid raft is a plasma membrane lipid domain enriched with sphingolipids and cholesterol. Although lipid rafts are involved in various physiological phenomena, the detailed structures of lipid rafts are not well elucidated. We have developed novel protein probes that specifically bind lipid rafts. Using these probes and advanced microscope techniques, we showed that the transbilayer movement of lipid second messenger, diacylglycerol, is regulated by sphingomyelin. Our results also indicate the existence of sphingomyelin-rich membrane domains in both outer and inner leaflet of the plasma membranes from cultured fibroblasts.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：脂質ドメイン 脂質ラフト 脂質の非対称性 脂質プローブ コレステロール スフィンゴミエリン  
脂質結合性毒素 セカンドメッセンジャー

### 1. 研究開始当初の背景

脂質ラフトはスフィンゴミエリンや糖脂質といったスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ細胞膜上の脂質ドメインである。われわれはこれまでにスフィンゴミエリンのクラスターを特異的に認識するタンパク質、ライセニン (Ishitsuka et al. Biophys J 86, 296 (2004)) やコレステロールを認識する新規プローブ PEG-Chol (Sato et al. J Biol Chem 279, 23790 (2004)) を用いて脂質ラフトの不均一性 (Kiyokawa et al. J Biol Chem 280, 24072 (2005)) や脂質のリサイクリングにおけるコレステロールの役割 (Takahashi et al., Mol Biol Cell 18, 2667 (2007)) を明らかにしてきた。脂質ラフトは脂質を中心にした構造体であることから脂質ラフトの本質を理解するにはラフト内の脂質の分布、動態を明らかにすることが必須であると考えられるが、技術的な難しさから脂質の微細構造に関する情報は極めて限られている。

### 2. 研究の目的

脂質ラフトモデルの問題点は スフィンゴ脂質は本当に外層だけに局在するのか？ コレステロールは脂質二重層にどのように分布しているのか？ 脂質ラフトの裏側にはどのような脂質が存在するのか？ 本当に脂質ラフトの裏側にシグナル分子が存在しているのか？ ラフトタンパク質はどのようなメカニズムでラフトに局在するのか？ といったものである。本研究では最近当研究室で開発された脂質ラフト特異的タンパク質を用い、超高解像光学顕微鏡と細胞膜の裏と表の脂質を見分ける電子顕微鏡技術を駆使して、ラフトの裏側を明らかにする。ラフトの裏側の構造が明らかになることでラフトシグナルの理解は格段に進むと考えられる。脂質ラフトは細菌やウイルス感染にも重要な役割を果たしていると言われていたが、本研究は新しい抗ウイルス剤や抗菌剤の開発する上でも重要な知見を提供すると考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究では 1) 脂質ラフトに結合する新しいプローブの開発とキャラクタリゼーション 2) 新奇プローブを用い、脂質ラフトを十 nm 程度の解像能で可視化する顕微鏡技術の導入と利用、を通して脂質ラフトの裏側を見る。これまでに脂質ラフトの構成成分であるスフィンゴ脂質、コレステロールをそれぞれ単独で認識するタンパク質 (ライセニン、コレラ毒素等) や低分子化合物 (アンホテリシン、フィリピン等) は存在するが、実際の脂質ラフトで重要な役割を果たしていると考えられる脂質複合体に特異的に結合するプローブは得られていない。本研究ではこのようなプローブを開発することで脂質ラフトを可視化する。また PALM 等の超高解像蛍光顕微鏡技術に加え、脂質二重層の内側と外

側を別々に標識する SDS-freeze fracture Replica Labeling (SDS-FRL) を併用し、脂質ラフトの超微細構造を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) これまで食用キノコ抽出液からスフィンゴ脂質結合タンパク質が報告されていることから、食用キノコとしてエリンギ、マイタケ、ブナシメジを選び、調製した抽出液から脂質結合タンパク質のスクリーニングを行った。スクリーニングは目的とする脂質を用いて人工膜を調製し、抽出液から膜に結合する水溶性のタンパク質を遠心分離によって沈降させ、質量分析によってアミノ酸の部分配列を決定した後、配列情報をもとに目的のタンパクをクローニングし、大腸菌に組み換えタンパクを発現させ、精製した組み換えタンパクの脂質結合活性を確認する、という方法によって行った。

その結果、糖脂質であるガングリオシド GM1 および GM1 とコレステロールの複合体に結合するタンパク質が得られたが、これらのタンパク質に相当する組み換えタンパクには脂質結合の特異性を示さなかった。一方マイタケおよびエリンギからはスフィンゴミエリンとコレステロールの複合体に結合するタンパク質が得られた。マイタケ由来のタンパクは報告されているタンパクと一次構造の相同性のない新奇タンパク質で、組み換えタンパクを結晶解析した結果、このタンパク質の立体構造はスフィンゴミエリンと結合することが報告されているイソギンチャク毒素、スチコライシンに類似しているが、スチコライシンの毒性に関与する N 末近傍の構造だけが大きく異なっていることが明らかになった。またエリンギ由来のタンパク質はスフィンゴミエリンとの結合が報告されているヒラタケ由来のプロトトリシン A と非常に類似していた。どちらのタンパク質にも細胞毒性はなく、GFP を結合したキメラタンパク質もキノコ由来タンパクと同様の脂質結合性を示した。

(2) 腺維芽細胞と上皮細胞の比較から、脂質セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロールの形質膜での膜を横切る運動 (フリップフロップ) はスフィンゴミエリンによって制御されていることが明らかになった。この結果は形質膜外層にジアシルグリセロールのプールが存在すること、スフィンゴミエリンの分解に伴い脂質ラフトの裏側へのジアシルグリセロールの移行が起こり、ラフトでの情報伝達に関与していることを示唆している。

(3) SDS-フリーズフラクチャーレプリカ法 (SDS-FRL) は脂質二重層の外層と内層の脂質分布を解析できる数少ない方法の一つである。この方法では試料を液体窒素や液体エタンで急速凍結した後、脂質二重層を疎水性

部分で割断する。試料は脂質の炭化水素部分を介してグリッドのプラチナ・カーボンに物理的に固定される。SDS によって非特異的にグリッドに吸着した残渣を除くことにより脂質二重層の内層、あるいは外層を露出した試料の調製が可能である。われわれは SDS-FRL と種々の脂質特異的タンパク質あるいはペプチドを併用して形質膜の内層と外層での脂質分布を詳細に解析した。その結果、核を持たない赤血球や血小板ではスフィンゴミエリン、ホスファチジルコリンは形質膜の外層のみに存在し、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/ホスファチジルイノシトールは内層に局在するのに対して、腺維芽細胞や好中球では形質膜内層にもスフィンゴミエリンのドメインが存在することが明らかになった。また脂質ラフトのひとつであるカベオレの外層にはスフィンゴミエリンのクラスターが存在し、内層のカベオレ周辺部にはホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸が存在するが、ホスファチジルセリン/ホスファチジルイノシトールは存在しないことが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Nishimura S, Ishii K, Iwamoto K, Arita Y, Matsunaga S, Ohno-Iwashita Y, Sato SB, Kakeya H, Kobayashi T, Yoshida M. (2013) Visualization of sterol-rich membrane domains with fluorescently-labeled theonellamides. *PLoS ONE* 8, e83716. doi: 10.1371/journal.pone.0083716. (査読有)

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. doi: 10.1016/j.bj.2013.07.052. (査読有)

Yilmaz N, Yamada T, Greimel P, Uchihashi T, Ando T, Kobayashi T. (2013) Real time visualization of assembling of a sphingomyelin-specific toxin on planar lipid membranes. *Biophys J* 105, 1397-1405. doi: 10.1016/j.bj.2013.07.052. (査読有)

Ueda Y, Makino A, Murase-Tamada K, Sakai S, Inaba T, Hullin-Matsuda F, Kobayashi T. (2013) Sphingomyelin regulates the transbilayer movement of diacylglycerol in the plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *FASEB J* 27, 3284-3297. doi: 10.1096/fj.12-226548. (査読有)

Yachi R, Uchida Y, Balakrishna, BH, Anderluh G, Kobayashi T, Taguchi T, Arai H. (2012) Subcellular localization of sphingomyelin revealed by two toxin-based probes in

mammalian cells. *Genes Cells* 17, 720-727. doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01621. (査読有)

Abe M, Kobayashi T. (2014) Imaging local sphingomyelin-rich domains in the plasma membrane using specific probes and advanced microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1841, 720-726. doi: 10.1016/j.bbali.2013.07.003. (査読有)

Hullin-Matsuda F, Taguchi T, Greimel P, Kobayashi T. (2014) Lipid compartmentalization in the endosome system. *Sem Cell Dev Biol* in press. doi: 10.1016/j.semcd.2014.04.010. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

小林俊秀「脂質のイメージング」第 1 回 JFAS 講演会、秋葉原、2014 年 1 月 11 日

小林俊秀「膜を横切る脂質の運動、フリップフロップについて」Workshop: CROSSroads of Users and J-PARC 第 10 回「生体膜・コロイド研究の最前線」、茨城、2013 年 12 月 18 日-19 日

Makino A, Hullin-Matsuda F, Murate M, Abe M, Fukuda M, Yamashita S, Fujimoto T, Vidal H, Lagarde M, Delton-Vandenbroucke I, Kobayashi T. “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、2013 年 9 月 11-13 日

Kobayashi T. “Imaging lipids and lipid domains” 2<sup>nd</sup> Mini Symposium “Protein-lipid interactions”. Piran, Slovenia, Sep 6, 2013.

小林俊秀、阿部充宏、牧野麻美、ウラン松田フランソワーズ「細胞分裂時におけるホスファチジルイノシトール 4,5\_ニリン酸の分裂溝への局在に対するスフィンゴミエリンドメインの役割」第 90 回生理学会大会、東京、2013 年 3 月 27-29 日

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

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

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

<http://www.riken.jp/lbl/mainpage/lbl.htm>

l

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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：