

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293015

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 organization and dynamics of membrane lipid domains

研究代表者

小林 俊秀 (KOBAYASHI, Toshihide)

国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・客員主管研究員

研究者番号：60162004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜に於いて脂質はランダムに配列しているのではなく、脂質二重層の内層と外層の脂質組成は異なり、内層のみ、外層のみをとっても特定の脂質がドメインを形成している。しかし生体膜における脂質の詳細な分布状態はほとんど明らかになっていない。私たちは特定の脂質、あるいは脂質複合体や脂質構造体に特異的に結合するプローブを開発するとともに、それらのプローブを用い、超高解像蛍光顕微鏡、免疫電子顕微鏡法等さまざまな顕微鏡手法を用いて、脂質ラフトをはじめとする脂質ドメインの超微細構造を解析し、また細胞分裂や細胞接着等や種々の病態における脂質ドメインの動態を併せて観測することにより脂質ドメインの機能の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：In the biomembranes, lipids are not randomly distributed. Rather, lipids are asymmetrically distributed between outer and inner membrane bilayer. Even in one layer, lipids form domains. However, the detailed distribution of lipids in biomembranes are not yet elucidated. We have developed various protein probes that bind specific lipids or lipid domains. Using these probes in combination with state-of-the-art microscopy techniques, we clarified the detailed distribution of lipid domains, including lipid rafts, in biomembranes. Application of our strategy to various pathophysiological events such as cell division, cell adhesion and genetic defects in cholesterol and sphingolipid metabolism provided us new aspects of lipid domains.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質ドメイン 脂質ラフト 脂質の可視化 脂質結合毒素 コレステロール スフィンゴ脂質 脂質の非対称性 スフィンゴミエリン

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は脂質とタンパク質の複合体であり、脂質の海の中にタンパク質が泳いでいる「流動モザイクモデル」が提出されたのは1972年のことである(Singer SJ and Nicolson GL, *Science* 175, 720 (1972))。このモデルでは細胞膜脂質の機能はタンパク質を浮かべる溶媒に過ぎなかったが、ここ20年間にわかれの細胞膜脂質に関する認識は大きく変化した。特に大きな影響を与えたのは「脂質ラフト」仮説の登場である(Simons K and van Meer G, *Biochemistry* 27, 6197 (1988))。脂質ラフト仮説は動物細胞の形質膜は他の膜に比べてコレステロールとスフィンゴ脂質に富んでいる、という生化学的な観察結果と、スフィンゴミエリン等のスフィンゴ脂質は飽和脂肪酸に富んでおり、コレステロール存在下で不飽和脂肪酸を含んでいるホスファチジルコリン等のグリセロリン脂質との相分離が促進される、という生物物理学の実験結果に基づいて提出されたものである。脂質ラフトモデルでは細胞膜上での微小な(直径10-200 nm程度と考えられている)スフィンゴ脂質に富んだドメインが集合、解離を繰り返すことにより、生体膜上に物性の違いが生じ、この物性の違いに基づいたタンパク質の脂質ドメインへの会合が膜を介したシグナル伝達やウイルスや細菌の感染、細胞内膜輸送等に重要な役割を果たしている、と考える。

これまでに脂質ラフトモデルを支持する非常に多くの結果が提出されているが、それらの結果について疑問を投げかける論文も提出されている(Munro S, *Cell* 115, 377 (2003))。ラフト研究の大きな問題のひとつはそのサイズが光学顕微鏡の検出限界以下である、という点にある。スフィンゴ脂質とコレステロールの混合物が Triton X-100 のような界面活性剤に不溶性であることから、脂質ラフトが細胞の機能に重要な役割を果たしている、という論文の中にはこの手法を用いているものも多い。しかし界面活性剤が脂質ラフトの再編成を誘起することが明らかになるに及び(Heerklotz H, *Biophys J* 83, 2693 (2002))、脂質ラフトを直接見ることの必要性が多くの研究者によって認識されるに至った。

これまで脂質ラフト構成タンパク質の細胞内での分布、動態については多くの報告があるのに対して、細胞における脂質ラフトそのもののキャラクタリゼーションは進んでいない。これは主としてラフトの脂質を認識する適当なプローブが限られていることに起因している。ラフト構成脂質を認識するプローブの開発に関しては我が国の研究者の貢献が大きい。東京都老人総合研究所の岩下が毒素から開発したBC $\alpha$ (Waheed et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4926 (2001))は生きた細胞でのコレステロールに富むドメインを標識するタンパク質として広く受け入れられている。また研究代表者は京都大学の梅田

が発見したスフィンゴミエリン特異的毒素、ライセニンを改良し、脂質ラフトの不均一性を示唆する結果を得た(Yamaji-Hasegawa et al. *J. Biol. Chem.* 278, 22762 (2003); Ishitsuka et al. *Biophys. J.* 86, 296 (2004); Kiyokawa et al. *Biochemistry.* 43, 9766 (2004); *J. Biol. Chem.* 280, 24072 (2005); Ishitsuka et al. *Biochemistry* 46, 1495-1502 (2007))。さらに研究代表者らが最近開発した低分子コレステロールプローブ(Sato et al. *J Biol Chem*, 279, 23790 (2004))は、生きた細胞でのコレステロールに富む膜ドメインの動態の解析を可能にした(Miyaji et al. *J. Exp. Med.* 202, 249(2005); Takahashi et al. *Mol. Biol. Cell.* 18, 2667(2007))。また研究代表者らは超高解像蛍光顕微鏡と脂質プローブを利用することにより、形質膜のスフィンゴミエリンに富んだ膜ドメインの裏側にはホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>)のクラスターが存在し、スフィンゴミエリンドメインはPIP<sub>2</sub>のクラスター化を制御することで細胞分裂をコントロールしていることを明らかにした(Abe et al. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1396 (2012))。

脂質ラフトは2006年に「微細で(10-200 nm)不均一なスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ膜ドメイン」と定義された(Pike LJ *J. Lipid Res.* 47, 1597 (2006))が、研究開始当初、多くのことが謎に包まれていた。

### 2. 研究の目的

研究開始当初、以下のような脂質ラフトの基本的な問題に対して回答が得られていなかった：

- 1) 細胞膜中にスフィンゴ脂質とコレステロールの複合体は存在するのか？存在するとしたらその複合体はどのような時間的、空間的分布を示すのか？
- 2) 何が脂質のクラスター化を引き起こすのか？
- 3) スフィンゴ脂質は形質膜脂質二重層の外層に局在しているが、スフィンゴ脂質の裏側の脂質組成についてはよくわかっていない。脂質ラフトの裏側はどうなっているのだろうか？

本研究申請ではこれらの問題に対して我々が独自に開発した脂質あるいは脂質複合体に特異的に結合するタンパク質を用い、最新の顕微鏡技術を駆使して取り組んで行くことを目指した。

### 3. 研究の方法

特定の脂質、あるいは脂質複合体や脂質構造体に特異的に結合するプローブを開発するとともに、それらのプローブを用い、超高解像蛍光顕微鏡、免疫電子顕微鏡法等さまざまな顕微鏡手法を用いて、脂質ラフトをはじめとする脂質ドメインの超微細構造を解析し、また細胞分裂、細胞接着や種々の病態における脂質ドメインの動態を併せて観測することにより脂質ドメインの機能を明らか

にする。

#### 4. 研究成果

1) 脂質ラフトの主要成分であるスフィンゴミエリンの膜中での分布状態の詳細を知る目的で、スフィンゴミエリンに特異的に結合する毒素であるライセニンとエキナトキシンの結合特性を解析した。われわれはこれまでにライセニンが 5-6 分子のスフィンゴミエリンのクラスターを認識することを示しているが、これに対してエキナトキシンは「分散した」スフィンゴミエリンに良く結合することが明らかになった。フリーズフラクチャー免疫電子顕微鏡法によりライセニンによって認識されるスフィンゴミエリンのクラスターは半径 24 nm 程度の脂質ドメインを形成するのに対して、エキナトキシンが結合する分散したスフィンゴミエリンはドメインを形成しないことが示された。エキナトキシンとライセニンを異なったスフィンゴミエリンの分布状態の指標として用いることにより、細胞表面におけるスフィンゴミエリンクラスターの形成にはコレステロールが必要である、またスフィンゴミエリンクラスターの形成は糖脂質によって阻害されることが明らかとなった。さらに上皮細胞の先端側と基底膜側ではスフィンゴミエリンの存在状態が異なること、細胞分裂の際には中心体にスフィンゴミエリンのクラスターが集積すること、またリソソームのスフィンゴミエリナーゼの欠損症であるニーマンピック A では、細胞表面のスフィンゴミエリンクラスターが欠損していることが明らかとなった。

2) 動物細胞の主要スフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンとコレステロールの複合体にと特異的に結合する毒性のないタンパク質(ナカノリ、(中乗り、mid raft rider))を食用キノコであるマイタケより見出した。スフィンゴミエリンとコレステロールは特異的な脂質ラフトドメインを形成することが良く知られており、ナカノリを用いて脂質ラフトの分布、動態を可視化することが可能となった。ナカノリは細胞表面に結合するが、スフィンゴミエリナーゼにより細胞表面のスフィンゴミエリンを除いたり、メチルベータシクロデキストリンによりコレステロールを除くと、結合は見られなくなった。また、ナカノリはスフィンゴミエリンクラスターに特異的に結合するタンパク質、ライセニンが標識するドメインの一部に結合した。ナカノリによって標識される形質膜外層の脂質ドメインは形質膜内層のホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>)ドメインと共局在した。ナカノリドメインはまた低分子量 G タンパク質である H-Ras と共局在したが、K-Ras および非活性 H-Ras とは共局在せず、低分子量 G タンパク質は分子種および活性に依存して脂質ラフトに局在することが示された。ナカノリを用いることにより、コレステロールを細胞内に蓄積する遺伝病であるニ

ーマンピック・タイプ C の細胞では細胞表面のスフィンゴミエリン・コレステロールドメインが他の脂質ドメインと大きく相分離していることが示された。また高濃度のナカノリで処理した上皮細胞ではラフトをターゲットとするインフルエンザウイルスの感染が抑えられ、ナカノリがウイルス感染の新しい治療法として利用できる可能性が示唆された。

3) ショウジョウバエ等の昆虫やトリパノソーマのような寄生虫における主要スフィンゴ脂質、エタノールアミンホスホセラミドに特異的に結合するタンパク質を発見し、このタンパク質を用いてトリパノソーマ感染によって引き起こされるアフリカ眠り病の簡易診断ができることを示した。

4) これまでに確立した脂質プローブと免疫電子顕微鏡法を組み合わせることによりナノメートルレベルでの脂質の非対称性を明らかにすることにも成功した。その結果赤血球では主要脂質は表側だけ、または裏側だけに局在すること、一方核を持った線維芽細胞や好中球では形質膜の内層に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。

5) ジアシルグリセロールの FR ET 検出プローブにオルガネラターゲットリングシグナルを結合させることで、膜の表側と裏側のジアシルグリセロールの動態を同時に検出することに成功した。

#### 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 16 件)

Sumi M, Makino A, Inaba T, Sako Y, Fujimori F, Greimel P, Kobayashi T. (2017) Photoswitchable phospholipid FRET acceptor: Detergent free intermembrane transfer assay of fluorescent lipid analogs. Sci Rep, 査読有, in press.

Makino A, Abe M, Ishitsuka R, Murate M, Kishimoto T, Sakai S, Hullin-Matsuda F, Shimada Y, Inaba T, Miyatake H, Tanaka H, Kurahashi A, Pack CG, Kasai RS, Kubo S, Schieber NL, Dohmae N, Tochio N, Hagiwara K, Sasaki Y, Aida Y, Fujimori F, Kigawa T, Nishibori K, Parton RG, Kusumi A, Sako Y, Anderluh G, Yamashita M, Kobayashi T, Greimel P, Kobayashi T. (2016) A novel sphingomyelin/cholesterol

domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C. *FASEB J*, 査読有, 31, 1301-1322.

doi: 10.1096/fj.201500075R

Shirota K, Yagi K, Inaba T, Li PC, Murata M, Sugita Y, Kobayashi T. (2016) Detection of sphingomyelin clusters by Raman spectroscopy. *Biophys J*, 査読有, 111, 999-1007

doi: 10.1016/j.bpj.2016.07.035

Makino A, Hullin-Matsuda F, Murate M, Abe M, Tomishige N, Fukuda M, Yamashita S, Fujimoto T, Vidal H, Lagarde M, Delton I, Kobayashi T. (2016) Acute accumulation of free cholesterol induces the degradation of perilipin 2 and Rab18-dependent fusion of ER and lipid droplets in cultured human hepatocytes. *Mol Biol Cell*, 査読有, 27, 3293-3304

doi:10.1091/mbc.E15-10-0730

Inaba T, Kishimoto T, Murate M, Tajima T, Sakai S, Abe M, Makino A, Tomishige N, Ishitsuka R, Ikeda Y, Takeoka S, Kobayashi T. (2016) Phospholipase C $\beta$ 1 induces membrane tubulation and is involved in caveolae formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 113, 7834-7839. doi: 10.1073/pnas.1603513113

Kishimoto T, Ishitsuka R, Kobayashi T. (2016) Detectors for evaluating the cellular landscape of sphingomyelin- and cholesterol-rich membrane domains. *Biochim. Biophys Acta*, 査読有, 1861, 812-829. doi:

10.1016/j.bbalip.2016.03.013

Yilmaz N, Kobayashi T. (2015) Visualization of lipid membrane reorganization induced by a pore-forming toxin using high-speed atomic force microscopy. *ACS Nano*, 査読

有, 9, 7960-7967. doi: 10.1021/acsnano.5b01041

Ueda Y, Ogiso H, Sato M, Umezawa Y, Okazaki T, Kobayashi T. (2015) Asymmetric diacylglycerol dynamics on the cytoplasmic and luminal sides of a single endomembrane in living cells. *Sci Rep*, 査読有, 5, 12960. doi: 10.1038/srep12960.

Bhat HB, Ishitsuka R, Inaba T, Murate M, Abe M, Makino A, Kohyama-Koganeya A, Kurahashi A, Kishimoto T, Tahara M, Yamano A, Nagamune K, Hirabayashi Y, Jyuni N, Umeda M, Fujimori F, Nishibori K, Yamaji-Hasegawa A, Greimel P, Kobayashi T. (2015) Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *FASEB J*, 査読有, 29, 3920-3934. doi: 10.1096/fj.15-272112

Murate M, Abe M, Kasahara K, Iwabuchi K, Umeda M, Kobayashi T. (2015) Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J Cell Sci*, 査読有, 128, 1627-1638. doi: 10.1242/jcs.163105

Makino A, Abe M, Murate M, Inaba T, Yilmaz N, Hullin-Matsuda F, Kishimoto T, Schieber NL, Taguchi T, Arai H, Anderluh G, Parton RG, Kobayashi T. (2015) Visualization of the heterogeneous distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity and sphingolipidosis. *FASEB J*, 査読有, 29, 477-493. doi: 10.1096/fj.13-247585

Hullin-Matsuda F, Taguchi T, Greimel P, Kobayashi T. (2014) Lipid compartmentalization in the endosome system. *Sem Cell Dev Biol*, 査読有, 31, 48-56. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.010.

Abe M, Kobayashi T. (2014) Imaging local

sphingomyelin-rich domains in the plasma membrane using specific probes and advanced microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1841, 720-726. doi: 10.1016/j.bbali.2013.07.003.

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*, 査読有, 54, 2933-2943. doi: 10.1016/j.bj.2013.07.052.

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*, 査読有, 105, 1397-1405. doi: 10.1016/j.bj.2013.07.052.

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*, 査読有, 27, 3284-3297. doi: 10.1096/fj.12-226548.

[学会発表] (計 11件)

Kobayashi T. "Cellular localization of sphingomyelin clusters" Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology. March 6-11 2016, Lucca, Italy.

Kobayashi T. "Imaging lipids and lipid domains" Sphingonet's International Colloquium. Jan 27-29 2016 Amsterdam, Netherland

Kobayashi T. "Imaging lipids and lipid domains" 11<sup>th</sup> GERLI Lipidomics Meeting. Oct 25-28, 2015, Strasbourg France

村手源英, 阿部充宏, 笠原浩二, 岩淵和

久, 梅田真郷, 小林俊秀. "細胞膜の脂質二重層を構成する各種の脂質が示す非対称分布とその破綻", 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (神戸市中央区), Dec (2015).

Yilmaz N, Kobayashi T. "Dynamics of Pore Forming Toxins during Their Assembling on Lipid Membranes", 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学角間キャンパス (金沢市角間町), Sep 13-15 (2015).

Kobayashi T, Abe M. "Imaging local sphingomyelin domains in the plasma membrane using lipid-specific probes and super-resolution microscopy" 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学角間キャンパス (金沢市角間町), Sep 13-15 (2015).

Kobayashi T, Abe M. "A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis" 第 67 回日本細胞生物学会年会、タワーホール船堀 (東京都江戸川区), June 30-July 2 (2015).

Kobayashi T, Makino A, Murate M, Inaba T, Hullin-Matsuda F, Abe M, Anderluh G. "Pore-forming toxins as tools to image lipids" Pore-Forming Toxins: a meeting in memory of Gianfranco Menestrina, PFT2014, Aug 28-30 2014, Treno, Italy

小林俊秀 「脂質のイメージング」第 1 回 JFAS 講演会、AKIBA HALL (東京都千代田区), 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」, いばらき量子ビーム研究センター (茨城県那珂郡東海村), 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、パシフィコ横浜(横浜市西区)、2013年9月11-13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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 俊秀 (KOBAYASHI, Toshihide)  
国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞  
情報研究室・客員主管研究員  
研究者番号：60162004

### (2)研究分担者

石塚 玲子 (ISHITSUKA Reiko)  
理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専  
任研究員(平成25-27年度)  
研究者番号：60342747

阿部 充宏 (ABE Mitsuhiro)  
国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞  
情報研究室・専任研究員

研究者番号：90415068

村手 源英 (MURATE Motohide)  
国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞  
情報研究室・研究員  
研究者番号：30311369

岸本 拓磨 (KISHIMOTO Takuma)  
理化学研究所・小林脂質生物学研究室・基  
礎科学特別研究員(平成25年度)  
研究者番号：70585158

(3)連携研究者

( )

(4)研究協力者

( )