

研究課題別評価

1 研究課題名: スフィンゴ脂質の自己組織化と細胞機能

2 研究者氏名: 清川 悦子

3 研究の狙い:

細胞には数千種類の脂質が存在し、生体膜上で脂質は均一に分布していない。脂質分布の違いが、細胞膜に存在する蛋白質の分布をも決定し、延いては細胞の機能を決定しているといっている。脂質分布の違いとは、自己組織化の違い、即ち、分子間の相互作用の形式・強度の違いである。ナノメートル単位の観察が出来て、初めてこれら分子間の相互作用の性質を把握することが可能となるが、このような研究は現在始まったばかりである。脂質の組織化から細胞の機能を考えるために、1) 分子間の相互作用を詳細に検討することで得られる生体膜の詳細な理解と、2) 細胞 1 つ・個体 1 つを、1 システムとして認識しその制御機構を知ること、の 2 点をリンクさせることが必要だと考えている。

スフィンゴミエリンはモデル膜でも生体膜でも、自己集合して数十ナノメートル程度の微小領域を形成し、細胞機能を発揮させる信号伝達経路の起点になっていると考えられるが、その詳細は不明である。スフィンゴミエリンを標識出来る特異的プローブを開発し、生きた細胞における生体膜のダイナミクスの可視化を目指す。合わせて他の生体膜構成脂質特異的プローブも開発し比較検討し、相互作用の基本原理を探索する。最終的には、生きた細胞 1 つ・個体 1 つにおいて時間的・空間的観察をとおり、信号伝達に関わる脂質集合の動作機構の解明を目標とする。

4 研究成果:

(1) 脂質特異的蛍光蛋白(プローブ)の作成

- ① スフィンゴミエリンのプローブ: スフィンゴミエリン(SM)の無毒化プローブに関しては完成された。プローブは大腸菌に発現させ精製する方法を用いたが、可溶性が乏しいことが収率の問題になった。試験管内蛋白質翻訳システム・可溶化方法の改変などを行ったが、プローブとしての性質を保ちつつ効率よく可溶化することは出来なかった。大腸菌を大量培養することで、自らの実験に用いるプローブは得ている。
- ② ホスファチジルセリンに対するプローブ: ホスファチジルセリン(PS)に関しては、PS 受容体の細胞外領域の cDNA から SM 無毒化プローブと同様の方法を用いて、大腸菌での発現・生成を試みたが、可溶化効率は SM プローブより低く、ほとんど可溶化されなかった。SM 無毒化プローブと同様に可溶化の検討を行ったが、成果は得られず、プローブ作成は達成されていない。
- ③ イノシトールリン酸群に対するプローブ: イノシトールリン酸群に関しては、PIP2、PIP3 に結合する PH ドメインと GFP との融合プローブを京大森井博士・東大福井博士より、それぞれ供与頂いた。

(2) プローブの評価

SM 無毒化プローブ(161-297)について記す。

A) プローブの特性: 認識脂質の特異性

ライセニン(161-297)はミズ体腔液から回収される蛋白質で、スフィンゴミエリン(SM)を特異的に認識するが細胞死を誘導することが知られていた。ライセニンのアミノ酸 161 番から 297 番のみから成る変異体は、SM を認識するが毒性を示さない。

プローブの脂質特異性はそれまでプラスチックプレートに固定化した脂質を用いて確認していたが、これに加えてリポソームを用いてその結合特異性を観察した。プレートアッセイでは、スフィンシン1リン酸(S1P)・スフィンゴシルホスファチジルコリン(SPC)に弱い結合を示した。リポソーム結合試験では S1P には弱い結合性を示すが、SPC には結合しなかった。また、

セラミドへはプレートアッセイでは結合しないが、リポソームでは結合を示した。このことは脂質が固相化された一重膜か、リポソームのような二重膜かに依存してプローブの認識が異なることを示している。これらの認識の相違を数値化するために、一重膜で固相化した場合に関しては表面プラズモンを利用した BIAcore で結合定数を求めようとしたが、一定の結果を得る条件を設定することが出来なかった。また、二重膜のリポソームとカロリメーターを用いた測定では、SM とプローブの結合が弱く結合定数を求めることが出来なかった。しかしながら、T 細胞などの生きた細胞で細胞表面のスフィンゴミエリンを除去すると、プローブは細胞を認識出来なくなる事から、細胞においてはセラミドではなくSMを認識することは確かであり、また一回結合したプローブは T 細胞においては解離する頻度は低く、生きた細胞における観察・脂質ドメイン操作には支障がないことは保証された。

B) プローブの特性: 細胞における分布

脂質ラフトの定義は不明確であり、各種形態の脂質ドメインに対して同じ用語が用いられている。そこで、人工膜では秩序液体相に分配される SM のプローブを用いて、今までで用いられてきた定義、およびそれに基づいたマーカーの挙動を比較することで、脂質ラフトの形態解明を試みた。糖脂質 GM1 を認識するプローブ・コレラ毒素 B サブユニット(CTxB)は脂質ラフトのマーカーとして、蛍光脂質・C6-NBD-SM [N-((6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino) sphingosylphospho -choline)]は細胞内 SM のトレーサーとして、それぞれ汎用されてきた。プローブを用いた内因性 SM の細胞内分布を理解するために、これら2つと比較する。

B1. 細胞表面における糖脂質 GM1 と SM ドメインの分布

蛍光蛋白質と融合させた無毒化 SM プローブにて、細胞表面に共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、T 細胞においては、目で見えるドメインは形成されていなかった。付着細胞においては、蛍光蛋白質がオリゴマー化する場合では、温度依存的に 1-2 マイクロメートル程度のプローブ凝集を見た。これらのプローブを用いて、細胞膜上の拡散速度を計算したところ、オリゴマー型 SM 無毒化プローブ(HV161)は、測定不能なほど遅く可動分画は 25.4 %、モノマー型 SM 無毒化プローブ(HVA161)は $0.142 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (可動分画: 74.7%)であった。蛍光標識した CTxB は、 $0.106 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (可動分画: 78.5 %)、C6-NBD-SM は、 $0.554 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (可動分画: 83.6 %)であった。脂質ラフトは生化学的に界面活性剤不溶な分画として回収されるが、オリゴマー・モノマー型 SM プローブ・CTxB は共に界面活性不溶、C6-NBD-SM は可溶性であった。内因性の SM は全て界面活性剤に不溶である。以上のことは、GM1 と SM が同じドメインに存在する可能性を示唆する。次に、異なる大きさの金粒子で標識した SM 無毒化プローブ、CTxB を用いて、細胞表面における分布を見ると、CTxB と SM は 50-200 nm 程度のクラスターを形成するが、共局在することはなかった。無毒化 SM プローブで標識すると加温に伴い、クラスターは大きくなる傾向が認められた。細胞の種類によっては、細胞内側にアクチンが集積している場所に集合している像も得られた。

B2. 細胞内における糖脂質 GM1 と SM ドメインの動態

上記プローブを 4°C で細胞表面を標識させた後、37°C に温めて細胞内への取り込みを見た。すると、CTxB、C6-NBD-SM は 30% 以上が細胞内に取り込まれるのに対し、無毒化 SM プローブの場合は、10% 以下であった。その細胞内分布変化を経時的に追うと、15 分ではベジクル状の構造物に共局在する。30 分程度経過すると、3者とも核の周辺に集積し始めるものの、CTxB、C6-NBD-SM はリボン状の形態をなし、無毒化 SM プローブとは解離する。マーカーによる染色では、CTxB、C6-NBD-SM の集積場所はゴルジ体で、無毒化 SM プローブはリサイクリング・エンドソームであった。以上より、細胞内において、SM は糖脂質 GM1 と異なるドメインを形成することが証明された。

以上を表にまとめる。

プローブ名	界面活性剤 可溶性	可動分画 (%)	拡散係数 ($\mu\text{m}^2/\text{sec}$)	細胞内取込 (%)	細胞内運命
CTxB	不溶	78.5	0.106	30 %	ゴルジ体
HV161	不溶	25.4	—	10% 以下	リサイクリングエ ンドソーム
HVA161	不溶	74.7	0.142	10% 以下	リサイクリングエ ンドソーム
C6-NBD-SM	可溶	83.6	0.554	30%	ゴルジ体およびリ サイクリングエン ドソーム

また、生化学的にラフトを単離できるとされていた界面活性剤の感受性、形質膜における可溶性、拡散係数には、相関がない。また、これらのパラメーターは細胞表面の分布、およびそれを反映する細胞内への取り込みにも相関がないことが、明らかになった。

C) 糖脂質 GM1 と SM ドメインに関する細胞内信号伝達経路の差異

細胞外に存在する脂質ラフトのマーカー・GPI 型の蛋白質や糖脂質を抗体によって集合させると、細胞内の酵素が活性化され細胞活性化へ向かうカスケードのスイッチがオンになるという報告などから、脂質ラフトが細胞外から細胞内へ信号を伝達する際のプラットフォームとして機能していることが推定される。そこで、SM が細胞機能へどのように関与しているかを観察した。

GM1 は T 細胞受容体 (TCR) を含むドメインを形成することが知られている。無毒化 SM プローブ、および抗体を用いて、細胞形質膜にある SM を集合させたところ、T 細胞においては、細胞内カルシウム、および、リン酸化 ERK の上昇が観察された。これらのアウトプットは GM1 の場合と同じである。しかし、GM1 はチロシンキナーゼの活性化を誘導することによる変化であるのに対し、SM の集合においては、チロシンキナーゼの活性化は観察されない。更に細胞表面の SM を酵素処理によって除去した場合でも、GM1 の集合による ERK 活性化・細胞内カルシウム上昇が観察されることにより、GM1 が ERK 活性化・細胞内カルシウム上昇を起こす経路と SM のそれとは異なることが確認された。このことは、再び、GM1 と SM が形成するドメインの異なりを示している。

SM を細胞形質膜から除去した場合において、リゾホスファチジン酸 (LPA) の信号が伝達されないことを発見した。ただし、SM を集合させた場合の ERK 活性化・カルシウム上昇の程度は、LPA によるものより遥かに大きいため、LPA は SM が関与する経路の一つであり、それが全てではないことが予想される。SM に関わる信号伝達経路を探索するため、細胞形質膜から SM ドメインを除去した場合の変化の調査、および、SM 集合によって特異的にリン酸化される分子の単離・同定を、進めている。

T 細胞では ERK が活性化されたが、線維芽細胞では活性化は観察されない。このことは、細胞の種類によって異なる蛋白質が巻き込まれる (あるいは巻き込まれない) ことを示唆にしている。そこで、SM ドメインが線維芽細胞の信号伝達に及ぼす影響を検証するために、EGF 受容体と LPA の受容体である EDG と、SM ドメインによる ERK の活性化について観察した。蛍光蛋白質がオリゴマーでも、モノマーでも、ライセニン 161-297 で前処理した場合、細胞外増殖因子 (EGF) 刺激による細胞の活性化を誘導する酵素・ERK の活性化が、やや抑制された。また、EGF 受容体のチロシンリン酸化も抑制された。この現象を説明する仮説はいくつかあるが、一つには、SM プローブを処理することによって、EGF 受容体の流動性が抑制されて

いる可能性が挙げられる。7 回膜貫通型の LPA 受容体(EDG) の場合は、EGF の結果とは逆に、ERK の活性化が促進された。以上の結果より、細胞形質膜上に存在する刺激を伝達する受容体には、SM ドメインへの関与の様式が異なることを示している。

D) 細胞骨格への関与

Jurkat 細胞において、重合したアクチンに結合する蛍光標識したファロイジンを用いて、SM ドメインを抗体により集合させるとアクチンが重合していることを観察した。これは、SM ドメインには、アクチン重合を誘導する分子が存在することを意味している。付着細胞においては、SM 集合によって細胞膜が劇的に変化し、波打っている像を呈した。この変化は細胞骨格を制御する低分子量 GTP 結合蛋白質である Rho の優勢劣性型で抑制されることから、膜の形態変化にはアクチンの関与が示唆された。定常状態において、ライセニン 161-297 の分布を免疫電子顕微鏡によって観察すると、その分布は細胞の構造によっても異なり不均一な分布を示していた。また、膜を挟んで SM ドメインとアクチンが共存していることから、SM ドメインとアクチン細胞骨格には二重膜を挟んで伝達される信号があると、考えられる。

5 自己評価:

当初の狙いは先に示すように、①分子間の相互作用を詳細に検討することで得られる生体膜の詳細な理解と、②細胞 1 つ・個体1つを、1システムとして認識しその制御機構を知ること、の 2 点であった。上記①に関しては、SM ドメインと親和性を示す分子を同定することが開始点となる。そこで、ドメインを単離しそのドメインに存在する脂質・蛋白質を網羅的に調査したが、関連する分子を同定することはできなかった。間接的な方法であるが、スフィンゴミエリンの除去、プローブ・抗体を組み合わせたドメインの集積により細胞機能のアウトプット(ERK リン酸化と細胞内カルシウム濃度の上昇)の変化を調査した結果、7 回膜貫通型のひとつである EDG が SM の作るドメインに含まれること、および TCR がそれに含まれないことを確認した。②に関しては、今後蛍光プローブと FRET などを用い、活性化前後の同種あるいは異種脂質(あるいは蛋白質)間の距離を調査する予定である。

また、従来の脂質ラフトのモデルは、図1に示すように糖脂質と SM が同じドメインを形成しているものであったが、ライセニンプローブを用いた本研究において、糖脂質と SM が位置的に異なるばかりか、機能的にも異なるドメインを形成することを確認した。新規モデルを図2に示す。

さらに、プローブを用いて、脂質ドメインを外的に操作する技術を確立した。今後、この技術を用いて、癌・感染症などの疾患における SM が関与する信号伝達分野を詳細に検討していきたい。

図1 従来のラフトモデル (Nature 1997, Science 2001, by Simons et al.)

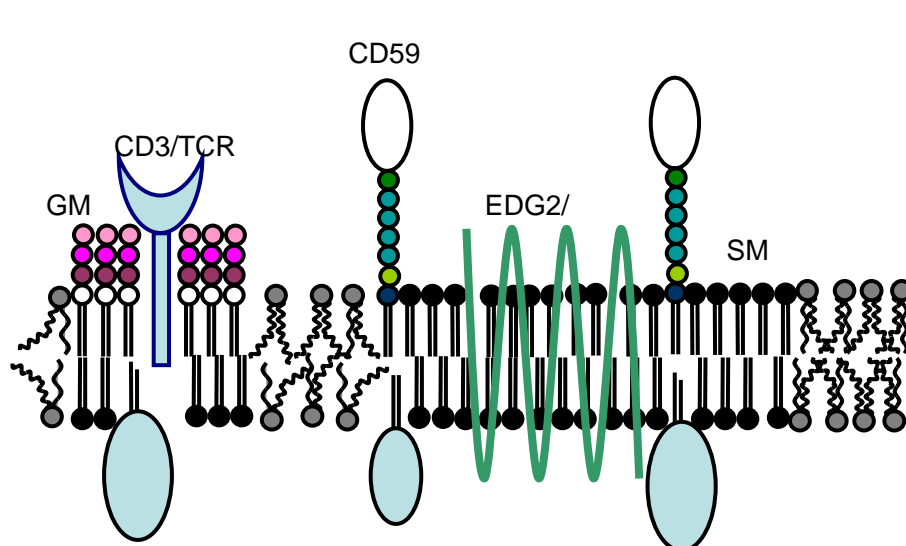
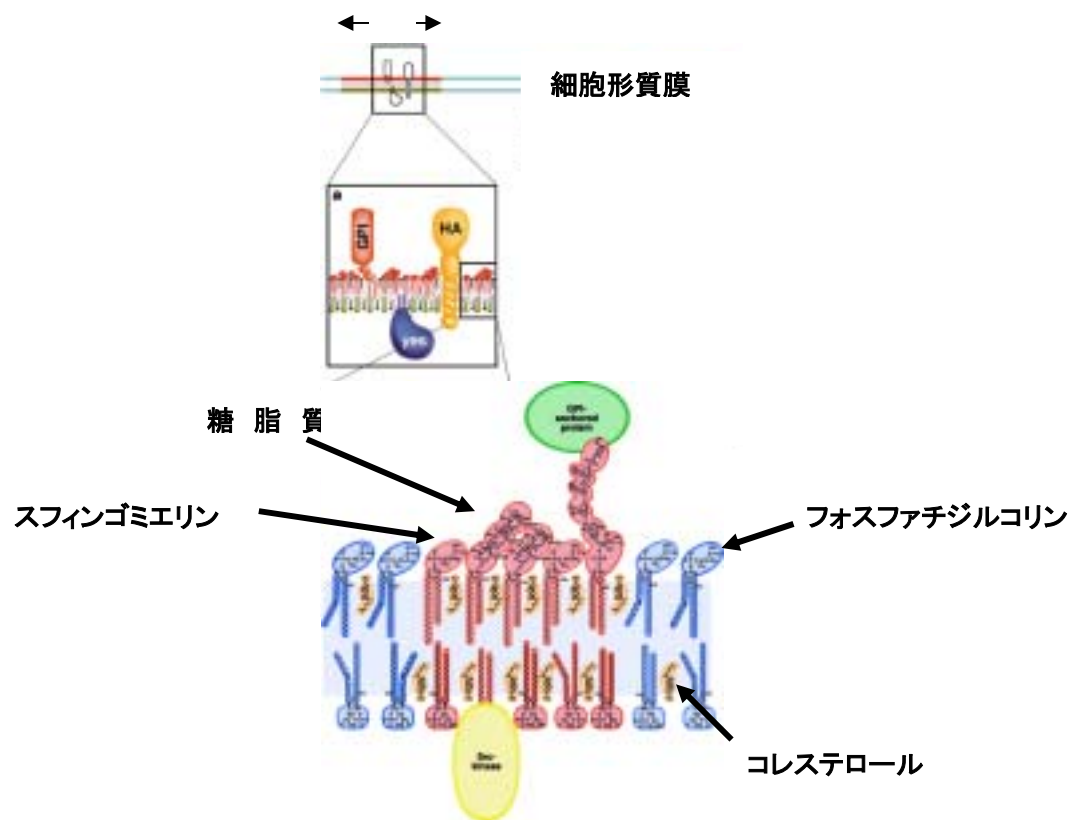


図
2 本研究によ
って提唱され
たラフトモデ
ル

6 研究総括の見解:

清川悦子研究員は、SMを認識するプローブを開発し、脂質ドメインの操作など実験系を工夫することで、SMドメインと相互作用する幾つかの蛋白質の同定に成功している。さらに、今後の研究展開が明確となっており、この研究の発展が期待される。

7 主な論文等:

Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., and Kobayashi, T

Surface distribution and internalization of endogenous sphingomyelin monitored by non-toxic lysenin. Manuscript in preparation.

Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., and Kobayashi, T

Physical and functional heterogeneity of lipid rafts monitored by sphingomyelin-specific probes. Submitted.

Kiyokawa, E., Makino, A., Ishii, K., Otsuka, N., Yamaji-Hasegawa A., and Kobayashi T. Recognition of sphingomyelin by lysenin and lysenin-related proteins, Biochemistry. In press.