

スフィンゴ脂質機能研究チーム

Sphingolipid Functions Laboratory

チームリーダー **小林 俊 秀**
KOBAYASHI, Toshihide

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違っており、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。形質膜の外層だけを見ても脂質は決して均一に分布しているのではなく、特定の脂質によるドメインが形成されていると考えられる。このような脂質の特徴的な分布はそれぞれの脂質の合成、分解、輸送、拡散の動的平衡の上に維持されている。なぜ自然界がこのような複雑な脂質組成、分布を選んだか、については明確な回答は得られていないが、最近注目されている1つの答えは脂質ラフトに代表される脂質超分子集積の再発見である。ここでは特定の脂質が集積すること自体が細胞の機能に直結する。言い換えれば膜の構築そのものが機能を持っている。当研究チームは脂質超分子構造のアセンブリのメカニズム、構成脂質の動態および機能を明らかにし、さらに超分子構造の再構成による新しい機能素子の開発を目的としている。

1. 脂質ラフトの構成とアセンブリ

脂質ラフトは Kai Simons らが提案したスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ脂質膜ドメインで、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質や膜を介する情報伝達に関与するタンパク質が集積した超分子構造を形成していると考えられている。脂質ラフトは情報伝達、細菌やウイルスの感染、細胞内小胞輸送等に重要な役割を果たしていることが示唆されている。ラフト形成はスフィンゴ脂質同士の会合がその引き金となっていると考えられる。実際モデル膜ではラフト様脂質ドメインの形成は容易に観察される。しかしながら細胞に実際にラフトが存在するか、という基本的な問題は未だに議論的である。これは第一にスフィンゴ脂質を追跡する良い方法がないことに起因している。

(1) スフィンゴミエリン特異的プローブの開発 (清川, 牧野, 山路-長谷川^{*1})

スフィンゴ脂質はスフィンゴミエリンと糖脂質を含むが最近の研究はスフィンゴミエリンがラフト形成に必須であることを示唆している。我々はシマミズ由来の毒素ライセニンに対する異なった3つの cDNA からリコンビナントタンパク質を調製し、ライセニン1およびライセニン3がスフィンゴミエリンを特異的に認識することを見いだした。またライセニンの単一アミノ酸置換変異体を用い、芳香族アミノ酸がライセニンによるスフィンゴミエリンの認識に関与していることを明らかにした。さらにライセニンを遺

伝子工学的に改変することにより、毒性の低いスフィンゴミエリン特異的プローブの開発に成功した。

(2) スフィンゴミエリンの細胞内および細胞表面での分布 (清川, 石井, 牧野)

ライセニンを用いた細胞表面および細胞内におけるスフィンゴミエリンの分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法により解析した。血管内皮細胞ではスフィンゴミエリンは細胞表面の特異的陥入構造であるカベオレに濃縮されていた。また肝細胞では多重膜エンドソームにスフィンゴミエリンは分布した。培養線維芽細胞ではスフィンゴミエリンは形質膜、セントリオール近傍のリサイクリングエンドソーム、エンドサイトーシスキャリアー小胞、およびトランスゴルジネットワークに分布した。興味深いことにスフィンゴミエリンはゴルジ体で合成されるにもかかわらず、ゴルジ体にはスフィンゴミエリンは検出されなかった。また我々は細胞接着に伴いスフィンゴミエリンの細胞表面での再分布が起こることを明らかにした。(クイーンズランド大学, Robert Parton 教授との共同研究)

(3) 脂質ラフトとリソソーム病 (清川, 石井, 牧野)

リソソーム病の一種であるスフィンゴリピドーシスはスフィンゴ脂質の加水分解酵素、あるいは加水分解酵素のアクチベータータンパク質の欠損により細胞内にスフィンゴ脂質が蓄積する。さまざまなタイプのスフィンゴリピドーシスが知られているが、多くは重篤な脳疾患である。我々はC型ニーマンピック病細胞を用い、これまでに脂質の蓄積が後期エンドソームで起こること、また後期エンドソームに存在する特殊な脂質、リゾビスホスファチジン酸によって形成される膜ドメインが脂質の蓄積に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

A型ニーマンピック病は酸性スフィンゴミエリナーゼの欠損症で、細胞内にスフィンゴミエリンを蓄積する。種々のエンドソームマーカーを用い、スフィンゴミエリンは後期エンドソームに蓄積することを明らかにした。興味深いことにA型ニーマンピック病患者由来の線維芽細胞ではスフィンゴミエリン以外の脂質ラフトの構成脂質もまた後期エンドソームに蓄積していた。この結果はA型ニーマンピック病では脂質ラフトの後期エンドソームへの再分布が起こっていることを示唆している。このような脂質ラフトの再分布は他のスフィンゴリピドーシスでは見られず、ニーマンピック病に特徴的な現象であった。脂質ラフトの再分布が病態の発症にどのような役割を果たしているのか、現在検討している。(東京都臨床医学総合研究所, 桜庭均博士との共同研究)

(4) スフィンゴミエリンに依存したライセニンの構造変化 (山路-長谷川^{*1}, 佐藤^{*2}, 清川, 牧野; 神谷 (研究技

術開発室))

ライセニンとはスフィンゴミエリン依存的に細胞を傷害する。しかしその機構は良く分かっていない。我々はライセニンのスフィンゴミエリンへの結合に温度依存性はないが、細胞の傷害は温度に依存して起こることを見いだした。細胞の傷害に平行して、トリプトファンの蛍光で見たライセニンの立体構造の変化、ライセニンのオリゴマー化が観察された。またこのとき細胞に穴があくことが電子顕微鏡により観察された。これらの結果からライセニンはスフィンゴミエリン存在下で温度に依存して立体構造が変化し、オリゴマーを形成すること、またこのオリゴマーが作る穴により細胞傷害が引き起こされることが示唆された。ライセニンの特定の部位を認識するペプチド抗体を用い、このオリゴマーはタンパク質のアミノ末端を内側に、カルボキシ末端を外側にした構造をとっていることが示唆された。(山梨医科大学、馬場健博士との共同研究)

2. エンドサイトーシス経路における脂質ドメインの解析 (山路-長谷川^{*1}, 牧野)

後期エンドソームは特徴的な内膜構造を呈している。この内膜には特異的な脂質、リゾビスホスファチジン酸がドメインを形成していること、この脂質ドメインが後期エンドソームからの物質輸送に重要な役割を果たしていることを、我々はこれまで明らかにしてきた。血管内皮細胞では4回膜貫通型タンパク質であるCD63は、後期エンドソーム内膜と内皮細胞に特徴的な分泌顆粒に分布している。我々はCD63を後期エンドソームから分泌顆粒に輸送する経路が内皮細胞に存在していること、またこの経路はリゾビスホスファチジン酸ドメインによって制御されていることを明らかにした。(フランス国立応用科学研究所, Michel Lagarde 教授, Christian Laugier 教授, Jean-Francois Pageau 博士; ジュネーブ大学, Jean Gruenberg 教授; 帝京大学, 井上圭三 教授, 瀬高守夫教授, 唐澤健博士との共同研究)

^{*1} 基礎科学特別研究員, ^{*2} 客員研究員

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

- Nomura K., Imai H., Koumura T., Kobayashi T., and Nakagawa Y.: "Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis", *Biochem. J.* **351**, 183-193 (2000). *
- Kobayashi T., Startchev K., Whitney A. J., and Gruenberg J.: "Localization of lysobisphosphatidic acid-rich membrane domains in late endosomes", *Biol. Chem.* **382**, 483-485 (2001). *
- Kobayashi T. and Hirabayashi Y.: "Lipid membrane domains in cell surface and vacuolar systems", *Glycoconjugate J.* **17**, 163-171 (2000). *
- Chevallier J., Sakai N., Robert F., Kobayashi T., Gruenberg J., and Matile S.: "Rapid access to synthetic lysobisphosphatidic acids using P^{III} chemistry", *Org. Lett.* **2**, 1859-1861 (2000). *

Furuya S., Tabata T., Mitoma J., Yamada K., Yamazaki M., Makino A., Yamamoto T., Watanabe M., Kano M., and Hirabayashi Y.: "L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11528-11533 (2000). *

Kobayashi T., Yamaji-Hasegawa A., and Kiyokawa E.: "Lipid domains in the endocytic pathway", *Semin. Cell & Develop. Biol.* **12**, 173-182 (2001). *

(総説)

牧野麻美, 小林俊秀: "エンドサイトーシス経路における脂質ドメインと細胞内トラフィック", *細胞工学* **19**, 988-995 (2000).

清川悦子: "HIV1 アクセサリ分子 Nef と T 細胞活性化", *生化学* **72**, 1337-1340 (2000).

小林俊秀: "蛍光相関分光法および関連技術に関する国際カールツァイスワークショップ", *蛋白質 核酸 酵素* **45**, 1878-1880 (2000).

山路-長谷川顕子: "生命現象と向き合う", *蛋白質 核酸 酵素* **46**, 78-79 (2001).

(単行本)

梅田真郷, 山路-長谷川顕子: "膜脂質ダイナミクスと細胞機能", シリーズ・ニューバイオフィジックス II-4: 生体膜のダイナミクス, 八田一郎, 村田昌之(編), 共立出版, 東京, pp. 100-118 (2000).

(その他)

Ishii K., Makino A., Kiyokawa E., Yamaji-Hasegawa A., Umeda M., and Kobayashi T.: "Re-distribution of sphingomyelin by sphingomyelin-specific toxin", *Eur. J. Cell. Biol.* **79**, Suppl.52, p. 165 (2000).

Makino A., Kiyokawa E., Yamaji-Hasegawa A., Kohyama-Koganeya A., Kondo T., and Kobayashi T.: "Recognition of sphingomyelin by earthworm toxin", *Eur. J. Cell. Biol.* **79**, Suppl.52, p. 168 (2000).

Abrami L., Kobayashi T., and van der Goot F. G.: "Generation and characterization of mutant CHO cells deficient in GPI-anchor biosynthesis", *Eur. J. Cell. Biol.* **79**, Suppl.52, p. 171 (2000).

Kobayashi T., Makino A., Ishii K., Yamaji-Hasegawa A., and Kiyokawa E.: "Lysenin: Sphingomyelin specific probe", *Mol. Biol. Cell Suppl.* **11**, 314a (2000).

清川悦子: "エンドソームで一緒: 生細胞における EGF と Grb2 の相互作用", *蛋白質 核酸 酵素* **2**, 171-172 (2001).

小林俊秀: "脂質ラフトは存在するか?", *蛋白質 核酸 酵素* **45**, 1963-1965 (2000).

清川悦子: "コレステロールは身を守る?", *蛋白質 核酸 酵素* **45**, 2538-2539 (2000).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kobayashi T.: "Accumulation of sphingomyelin in lysobisphosphatidic acid domain in Niemann-Pick type A cells", *Gordon Research Conf. on Glycolipid and Sphingolipid Biology*, Barga, Italy, May (2000).

Abrami L., Kobayashi T., and van der Goot F. G.: "Gen-

eration and characterization of mutant CHO cells deficient in GPI-anchor biosynthesis", ELSO 2000, (European Life Scientist Organization), Geneva, Switzerland, Sept. (2000).

Yamaji-Hasegawa A., Ishii K., Makino A., Kiyokawa E., Umeda M., and Kobayashi T.: "Re-distribution of sphingomyelin by sphingomyelin-specific toxin", ELSO 2000, (European Life Scientist Organization), Geneva, Switzerland, Sept. (2000).

Kobayashi T., Makino A., Kiyokawa E., Yamaji-Hasegawa A., Kohyama-Koganeya A., and Kondo T.: "Recognition of sphingomyelin by earthworm toxin", ELSO 2000, (European Life Scientist Organization), Geneva, Switzerland, Sept. (2000).

Kiyokawa E., Yamaji-Hasegawa A., Makino A., Ishii K., Kondo T., and Kobayashi T.: "Lysenin: Sphingomyelin specific toxin", ANNO 2000: A Lipid Milestone, Utrecht, The Netherlands, Oct. (2000).

Kobayashi T., Makino A., Ishii K., Yamaji-Hasegawa A., and Kiyokawa E.: "Lysenin: Sphingomyelin specific probe", 40th American Soc. for Cell Biology Ann. Meet., San Francisco, USA, Dec. (2000).

Makino A.: "Analysis of cell surface lipid raft using sphingomyelin-specific probe", Joint Swiss-Japanese Scientific Seminar on Synthesis and Trafficking of Glycolipids and Glycolipid Anchored Proteins, Les Diablerets, Switzerland, Mar. (2001).

Kobayashi T., Makino A., Yamaji A., Ishii K., van der Goot F. G., Sakuraba H., Parton R.G, and Kiyokawa E.: "Lysenin: Sphingomyelin specific probe", Joint Swiss-Japanese Scientific Seminar on Synthesis and Trafficking of Glycolipids and Glycolipid Anchored Proteins, Les Diablerets, Switzerland, Mar. (2001).

Kiyokawa E.: "Recognition of sphingomyelin by earthworm toxin", Joint Swiss-Japanese Scientific Seminar on Synthesis and Trafficking of Glycolipids and Glycolipid Anchored Proteins, Les Diablerets, Switzerland, Mar. (2001).

(国内会議)

小林俊秀: "Domain-domain interaction in the endocytic pathway", 第73回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2000).

清川悦子: "Recognition of sphingomyelin by earthworm toxin", 第73回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2000).

石井久美子, 山路-長谷川顕子, 牧野麻美, 清川悦子, Parton R.G, 小林俊秀: "脂質ラフト特異的プローブの開発とバイオイメーキングへの応用", 第9回日本バイオイメーキング学会総会, 東京, 11月(2000).

小林俊秀: "Lipid domains in the endocytic pathway", 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2000).

清川悦子, 石井久美子, 牧野麻美, 山路-長谷川顕子, 小林俊秀: "スフィンゴミエリン特異的プローブを用いた細胞表面ラフトの解析", 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2000).

牧野麻美, 清川悦子, 石井久美子, 山路-長谷川顕子, 小林俊秀: "ライセニンによるスフィンゴミエリンの認識", 第

23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2000).

山路-長谷川顕子, 牧野麻美, 石井久美子, 清川悦子, 小林俊秀: "脂質特異的毒素: ライセニン", 理研シンポジウム「構造生物学 (IV): SPring-8 と構造生物学研究」, 和光, 1月(2001).

小林俊秀: "エンドサイトス経路における脂質ドメイン間の相互作用", 日本薬学会第121年会, 札幌, 3月(2001).

Research Subjects and Members of Sphingolipid Functions Laboratory

1. Organization and Assembly of Membrane Raft

2. Lipid Domains in the Endocytic System

Head

Dr. Toshihide KOBAYASHI

Research Scientists

Dr. Etsuko KIYOKAWA

Technical Staffs

Ms. Kumiko ISHII

Ms. Asami MAKINO

in collaboration with

Dr. Nobuo KAMIYA (Div. of Bio-Crystallography Technology)

Visiting Members and Postdoctoral Fellows

Dr. Akiko YAMAJI-HASEGAWA

Dr. Satoshi B. SATO (Fac. Sci., Kyoto Univ.)

Ms. Utako KATO (Grad. Sch. Human. Sci., Ochanomizu Univ.)

Mr. Kunihiko IWAMOTO (Fac. Agr., Univ. Tokyo)

Collaborators (Outside of RIKEN)

Prof. Michel LAGARDE (Dept. Biochem. INSA Lyon, France)

Prof. Christian LAUGIER (Dept. Biochem., INSA Lyon, France)

Dr. Jean-Francois PAGEAUX (Dept. Biochem., INSA Lyon, France)

Prof. Jean GRUENBERG

Prof. Yasuhito NAKAGAWA (Fac. Pharm. Sci., Kitasato Univ.)

Prof. Keizo INOUE (Fac. Pharm. Sci., Teikyo Univ.)

Prof. Morio SETAKA (Fac. Pharm. Sci., Teikyo Univ.)

Dr. Ken KARASAWA (Fac. Pharm. Sci., Teikyo Univ.)

Dr. Masato UMEDA (Dept. Mol. Biodyn., Tokyo Metrop. Inst. Med. Sci.)

Prof. Tetsuyuki KOBAYASHI (Dept. Biology, Ochanomizu Univ.)