

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は極めて簡単な組成の脂質から成る人工膜によって再現できる。一方細胞は数千もの異なった脂質分子種を有している。特定なオルガネラに高濃度で偏在している脂質が存在していることは良く知られている。それらは例えば形質膜におけるスフィンゴミエリンやコレステロール、後期エンドソームにおけるリゾビスホスファチジン酸等である。これらの脂質はそれぞれの膜で特定の超分子構造を形成し、膜の構造や機能に重要な役割を果たしていると考えられている。なかでもスフィンゴ脂質とコレステロールのつくる膜ドメイン「脂質ラフト」は大きな注目を集めている。

当研究チームは細胞生物学および生物物理学的手法を用いて脂質ラフトを中心とした脂質超分子構造のアッセンブリーメカニズム、構成脂質の動態および機能を明らかにすることを目的としている。

1. スフィンゴミエリン特異的プローブ、ライセニンの解析（長谷川-山路，石井，牧野，小林）

ライセニンはシマミズから得られる 297 個のアミノ酸からなるタンパク性毒素で、スフィンゴミエリンを特異的に認識することが知られている。ライセニンは LRP-1 (lysenin-related protein 1, lysenin 2) および LRP-2 (lysenin-related protein 2, lysenin3) とともにタンパク質ファミリーを形成している。我々はライセニン、LRP-1 および LRP-2 をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として取得し、それぞれの基質特異性、細胞毒性を比較した。その結果 LRP-2 はライセニン同様スフィンゴミエリンに特異的に結合し、細胞毒性を示すが、LRP-1 はライセニン、LRP-2 に比べ 1/10 程度の活性しか示さなかった。ライセニンと LRP-2 の間では 30 個の芳香族アミノ酸が保存されている。この中のフェニルアラニン²¹⁰ だけが LRP-1 ではイソロイシンに置換されている。イソロイシン²¹⁰ をフェニルアラニンに変換することにより LRP-1 の活性は劇的に増大した。このことはライセニンの活性に芳香族アミノ酸が重要な役割を果たしていることを示唆している。芳香族アミノ酸の重要性はライセニンのトリプトファンをロイシンに変換した変異体を用いることによりさらに明らかになった。ライセニンは 6 個のトリプトファンを持つがそのうちの 5 個はライセニン、LRP-1、LRP-2 の間で保存されている。保存されている 5 個のトリプトファンすべてがスフィンゴミエリンの認識および溶血活性に必須であるのに対して、保存されていないトリプトファンをアラニンに置換しても活性は影響を受けなかった。我々の結果はライセニンによるスフィンゴミエリンの認識と細胞毒性に芳香族アミノ酸が重要な役割を果たしていることを示している。

2. スフィンゴミエリンドメインの構成とダイナミクス（清川，村手，庄籠，石井，牧野，岩本，岩渕^{*1}，Hullin-Matsuda^{*1}，瀬野尾，高橋^{*2}，小林）

細胞膜脂質の構成とダイナミクスについては分かっていないことが多い。スフィンゴミエリンはコレステロール、

スフィンゴ糖脂質とともに脂質ラフトの主要構成成分である。我々は培養上皮細胞の先端面（アピカル面）と側底面（バソラテラル面）ではスフィンゴミエリン特異的毒素、ライセニンに対する感受性が異なり、アピカル面では感受性が低下することを見いだした。アピカル面は糖脂質に富んでいる。ライセニンのスフィンゴミエリンへの結合に対する糖脂質の影響を見るため、糖脂質合成を欠損しているメラノーマ細胞変異株と親株でのライセニンへの感受性を比較した。その結果、変異株は親株に比べライセニンへの感受性が著しく高くなっていることが明らかになった。モデル膜の実験から、糖脂質はスフィンゴミエリンの局所濃度を低下させることによりライセニンのスフィンゴミエリンへのアフィニティを低下させることが示された。すなわちライセニンの毒性はスフィンゴミエリンの膜上での分布状態に依存し、スフィンゴミエリンがドメイン形成をしているときにのみこの毒素は膜に強く結合し、毒性を発揮することが明らかになった。このようなライセニンによる膜上のスフィンゴミエリンの分布状態の認識の分子的な基盤はライセニンが複数のスフィンゴミエリンと一定の化学量論的な結合をすることにある。この結果はスフィンゴミエリン数分子が形成するドメインが細胞膜に存在する、という脂質ラフトの考え方を支持している。ライセニンを用いることにより我々はさらにスフィンゴミエリンの膜上での分布は異なった細胞、異なった膜では異なっていることを示した。

我々はスフィンゴミエリンを認識し、毒性を持たないライセニン変異株の取得に成功した。得られた無毒ライセニンを利用し、スフィンゴミエリンに富んだ細胞膜のドメインは糖脂質 GM1 に富むドメインとは空間的に異なっていることが示された。JurkatT 細胞において T 細胞レセプターや GM1 の架橋は MAP キナーゼである ERK のリン酸化を引き起こす。無毒ライセニンによる架橋もまた ERK のリン酸化を誘起した。しかし、T 細胞レセプターや GM1 による刺激と異なり、ライセニンによるスフィンゴミエリンの架橋はタンパク質のチロシンリン酸化を伴わない。ライ

セニンとスフィンゴミエリナーゼ処理を併用することにより、スフィンゴミエリンの架橋によるシグナル伝達には三量体 G タンパク質が関与していることが示された。これらの結果はスフィンゴミエリンに富む膜ドメインは T 細胞レセプターや GM1 を含むドメインとは異なったシグナルカスケードに関与していることを示唆している。我々の結果は空間的にも機能的にも複数の脂質ラフトが存在することを示している。

*1 客員研究員, *2 研修生

Whereas the bilayer organization of biomembranes can be reconstituted in artificial liposomes with a simple lipid composition, biological membranes contain thousands of different lipid species, whose cellular distribution is stringently controlled. This complex distribution of lipids suggests that the targeting of lipids is highly regulated and that cells require a complex lipid supramolecular organization within their membranes. Of particular interest is the microdomains composed of sphingolipids and cholesterol. These domains, called "lipid rafts", are suggested to be involved in various biological events as diverse as signal transduction and membrane traffic. Our aim is to understand the organization, assembly and function of lipid rafts.

1. Characterization of sphingomyelin-specific toxin, lysenin

Lysenin is a sphingomyelin-specific toxin isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. Lysenin comprises a family of proteins together with lysenin-related protein 1 (LRP-1, lysenin 2) and LRP-2 (lysenin 3). We characterized LRP-1 and LRP-2 together with lysenin using maltose-binding protein-tagged recombinant proteins. LRP-2 specifically bound sphingomyelin and induced hemolysis like lysenin. In contrast, the binding and hemolytic activities of LRP-1 was ten times less than those of lysenin and LRP-2. Lysenin and LRP-2 share 30 common sites of aromatic amino acids. Among them, only one position, phenylalanine²¹⁰ is substituted for isoleucine in LRP-1. The activity of LRP-1 was dramatically increased by introducing a single amino acid substitution of isoleucine²¹⁰ to phenylalanine, suggesting the importance of aromatic amino acids in the biological activities of lysenin and LRPs. The importance of aromatic amino acids was further indicated by a systematic tryptophan to alanine mutation of lysenin. Lysenin contains 6 tryptophan residues of which 5 are conserved in LRP-1 and -2. We showed that the conserved tryptophans but not the non-conserved one were required both in the recognition of sphingomyelin and in the hemolytic activity of lysenin. Our results suggest the importance of aromatic amino acids of the toxin for the recognition of sphingomyelin and for the interaction with the membranes leading to hemolysis.

2. Organization and dynamics of sphingomyelin

Little is known about the heterogenous organization of lipids in biological membranes. Sphingomyelin is a major plasma membrane lipid that forms lipid domains together with cholesterol and glycolipids. Using the sphingomyelin-specific toxin, lysenin, we showed that in cultured epithelial cells the accessibility of the toxin to sphingomyelin is different between the apical and basolateral membranes. Apical membranes are highly enriched with glycolipids.

The inhibitory role of glycolipids in the binding of lysenin to sphingomyelin was confirmed by comparing the glycolipid-deficient mutant melanoma cell line with its parent cell. Model membrane experiments indicated that glycolipids altered the local density of sphingomyelin so that the affinity of the lipid for lysenin was decreased. Our results indicate that lysenin recognizes the heterogenous organization of sphingomyelin in biomembranes and that the organization of sphingomyelin differs between different cell types and between different membrane domains within the same cell. Isothermal titration calorimetry suggests that lysenin binding to sphingomyelin is presumably the result of a sphingomyelin-lysenin complex formation of specific stoichiometry, thus supporting the idea of the existence of small condensed lipid complexes consisting of just a few lipid molecules in living cells.

We have generated a truncated lysenin that recognizes a sphingomyelin-rich membrane but does not oligomerize and is thus non-toxic. Using this mutant lysenin, we have shown that plasma membrane sphingomyelin-rich domains are spatially distinct from ganglioside GM1-rich membrane domains. Like T-cell receptor (TCR) activation and the cross-linking of GM1, cross-linking of sphingomyelin induces calcium influx and ERK phosphorylation. However, unlike CD3 or GM1, cross-linking of sphingomyelin did not induce significant protein tyrosine phosphorylation. The combination of lysenin and sphingomyelinase treatment suggested the involvement of a G-protein coupled receptor in sphingomyelin-mediated signal transduction. These results thus suggest that the sphingomyelin-rich domain provides a functional signal cascade platform that is distinct from those provided by TCR or GM1. Our study therefore elucidates the spatial and functional heterogeneity of lipid rafts.

Staff

Head

Dr. Toshihide KOBAYASHI

Research Scientists

Dr. Akiko YAMAJI-HASEGAWA

Dr. Kunihiro IWAMOTO

Dr. Etsuko KIYOKAWA

Dr. Motohide MURATE

Dr. Hidehiko SHOGOMORI

Research Associate

Ms. Asami MAKINO

Technical Staffs

Ms. Kumiko ISHII

Ms. Yukiko SENOH

Visiting Members and Postdoctoral Fellows

Dr. Françoise HULLIN-MATSUDA (INSERM, France)

Dr. Kazuhisa IWABUCHI (Juntendo Univ. Sch. Med.)

Dr. Satoshi SATO (Dept. Biophys., Kyoto Univ.)

Collaborators (*Outside of RIKEN*)

Dr. Michel LAGARDE (Dept. Biochem., INSERM U585, INSA Lyon, France)

Dr. Jean-François PAGEAUX (Dept. Biochem., INSERM U585, INSA Lyon, France)

Dr. Isabelle VANDENBROUCKE (Dept. Biochem., INSERM U585, INSA Lyon, France)

Ms. Nelly BESSON (Dept. Biochem., INSERM U585, INSA Lyon, France)

Trainees

Ms. Miwa TAKAHASHI (Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Laulagnier K., Motta C., Hamdi S., Roy S., Fauvelle F., Pageaux F. J., Kobayashi T., Salles P. J., Perret B., Bonnerot C., and Record M.: "Mast cell-and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization", *Biochem. J.* **380**, 161–171 (2004). *

Kiyokawa E., Makino A., Ishii K., Otsuka N., Yamaji-Hasegawa A., and Kobayashi T.: "Recognition of sphingomyelin by lysenin and lysenin-related proteins", *Biochemistry* **43**, 9766–9773 (2004). *

Iwamoto K., Kobayashi S., Fukuda R., Umeda M., Kobayashi T., and Ohta A.: "Local exposure of phosphatidylethanolamine on the yeast plasma membrane is implicated in cell polarity", *Genes Cells* **9**, 891–903 (2004). *

Sato S., Ishii K., Makino A., Iwabuchi K., Yamaji-Hasegawa A., Senoh Y., Nagaoka I., Sakuraba H., and Kobayashi T.: "Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol", *J. Biol. Chem.* **279**, 23790–23796 (2004). *

Ishiwari K., Kotani M., Suzuki M., Pumbo E., Suzuki A., Kobayashi T., Ueno T., Fukushima T., Kanzaki T., Imada M., Itoh K., Akioka S., Tajima Y., and Sakuraba H.: "Clinical, biochemical, and cytochemical studies on a Japanese Salla disease case associated with a renal disorder", *J. Hum. Genet.* **49**, 656–663 (2004). *

Yamaji-Hasegawa A., Takahashi A., Tetsuka Y., Senoh Y., and Kobayashi T.: "Fungal metabolite sulfamisterin suppresses sphingolipid synthesis through inhibition of serine palmitoyltransferase", *Biochemistry* **44**, 268–277 (2005). *

Ichimaru N., Murai M., Abe M., Hamada T., Yamada Y., Makino S., Nishioka T., Makabe H., Makino A., Kobayashi T., and Miyoshi H.: "Synthesis and inhibi-

tion mechanism of Δ lac-acetogenins, a novel type of inhibitor of bovine heart mitochondrial complex I", *Biochemistry* **44**, 816–825 (2005). *

(総 説)

Ishitsuka R. and Kobayashi T.: "Lysenin: A New tool for investigating membrane lipid organization", *Anat. Sci. Int.* **79**, 184–190 (2004).

岩本邦彦, 福田良一, 太田明徳: "リン脂質を見る: 酵母におけるホスファチジルエタノールアミンの動態と細胞極性", *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 1367–1372 (2004).

岩渕和久, 石井久美子, 小林俊秀: "糖脂質を見る: 好中球のラクトシルセラミドを可視化する", *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 1373–1380 (2004).

石塚玲子, 小林俊秀: "脂質ラフトを見る", *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 1388–1394 (2004).

[単行本・Proc.]

(その他)

小林俊秀: "膜透過促進法", 化学と生物 実験ライン 52:「細胞生物学実験法」III 細胞解析法 (II), 大熊勝治 (編), 廣川書店, 東京, pp. 3–9 (2004).

高城景子, 岩本邦彦, 小林新吾, 福田良一, 太田明徳: "酵母遺伝子破壊株コレクションを用いた Ro09-0198 感受性株の網羅的探索", 脂質生化学研究 (Proceedings of the Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids) Vol. 46, 熊本, 2004–6, 日本脂質生化学会, 東京, pp. 136–139 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Besson N., Kobayashi T., Pageaux J. F., Lagarde M., and Vandenbroucke I.: "Implication de l'acide Lysobisphosphatidique dans l'homeostasie du cholesterol des macrophages humains THP-1", *Nouvelle Societe Francaise d'Atherosclerose 1er Congres Annuel*, Biarritz, France, June (2004).

Kobayashi T.: "A lipid-specific toxin reveals heterogeneity of sphingomyelin-containing membranes", 2004 Gordon Research Conf. on Glycolipid and Sphingolipid Biology, Hyogo, July (2004).

Shogomori H.: "Both acylation and other factors, possibly protein-protein interaction, target LAT (Linker for activation of T-Cell) to rafts", 2004 Gordon Research Conf. on Glycolipid and Sphingolipid Biology, Hyogo, July (2004).

Makino A.: "Glycolipid synthesis inhibitors alter intracellular cholesterol distribution and cholesterol metabolism in glycolipid-independent manner", 2004 Gordon Research Conf. on Glycolipid and Sphingolipid Biology, Hyogo, July (2004).

Kobayashi T., Ishii K., Ishitsuka R., Kiyokawa E., Makino A., Otsuka N., Senoh Y., Yamaji-Hasegawa A., and Sato S.: "Distribution and dynamics of lipids and lipid domains monitored by newly developed lipid specific probes", Sapporo Summer Conf. 2004, Sapporo Sphingolipid Symp., Sapporo, July (2004).

- Kobayashi T.: "Distribution and dynamics sphingomyelin monitored by a lipid specific probe", 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).
- Kobayashi T.: "Distribution and dynamics of lipids rafts monitored by newly developed lipid specific probes", 2nd Meet. on Lipidomics: From lipid analysis to imaging, (The Study and Research Group on Lipids and Lipoproteins (GERLI)), Paris, France, Sept. (2004).
- Besson N., Kobayashi T., Pageaux J. F., Lagarde M., and Vandenbroucke I.: "Implication de l'acide Lysobisphosphatidique dans l'homeostasie cellulaire du cholestetol des macrophage humains THP-1", 5eme Journee Scientifique IMBL, Lyon, France, Sept. (2004).
- Kobayashi T., Ishii K., Ishitsuka R., Kiyokawa E., Makino A., Sato S., and Yamaji-Hasegawa A.: "Distribution and dynamics of lipids monitored by lipid specific probes", ELSO 2004, Nice, France, Sept. (2004).
- Kobayashi T., Ishitsuka R., Ishii K., Makino A., and Shogomori H.: "Lipid nanodomains in biological membranes", 1st Korea-RIKEN Workshop on Nanoscience and Nanotechnology, Seoul, Korea, Oct. (2004).
- Shogomori H.: "Nanoscale analysis of sphingomyelin domains by atomic force microscopy", 8th Membrane Research Forum, (Japan Society for Cell Biology and others), Nagoya, Nov. (2004).
- Kobayashi T.: "Spatial and functional heterogeneity of lipid rafts monitored by lipid specific probes", 8th Membrane Research Forum, (Japan Society for Cell Biology and others), Nagoya, Nov. (2004).
- Shogomori H. and Kobayashi T.: "Size dependent recognition of sphingomyelin domains in model membranes", Biophysical Soc. 49th Ann. Meet., Long Beach, USA, Feb. (2005).
- (国内会議)
- 車田真吾, 佐藤智, 小林俊秀: "Stage-specific ceramide trafficking in developing retina", 第 57 回日本細胞生物学会, 豊中, 5 月 (2004).
- 高城景子, 岩本邦彦, 小林新吾, 福田良一, 太田明德: "酵母遺伝子破壊株コレクションを用いた Ro09-0198 感受性株の網羅的探索", 第 46 回日本脂質生化学会, 熊本, 6 月 (2004).
- Kurumada s., 小林俊秀, 佐藤智: "Stage specific cell association of lipids in developing retina", 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
- 小林俊秀: "脂質ラフトを見る", 第 1 回インビトロジェン・シンポジウム「バイオサイエンスの最先端」, 葉山, 10 月 (2004).
- 石塚玲子, 石井久美子, 清川悦子, 牧野麻美, 山路 長谷川 顕子, 小林俊秀: "脂質ラフトを見る", 第 26 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, (日本薬学会), 東京, 11 月 (2004).