

研究報告書

「人工細胞作出に向けた人工脂質二重膜と生体膜の違いの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 池ノ内 順一

1. 研究のねらい

細胞を構成する要素の解明が進んだ現在、細胞の特定の機能に焦点を当てて、その機能に必要な要素のみを抽出し、細胞の機能を持たせた生命を模した構造物を試験管内で構成することが現実的になった。試験管内で人工的に細胞の機能を再現するのに成功した例として、限られたセットのタンパク質、核酸を人工脂質二重膜に内包させることにより、遺伝子の転写や mRNA の翻訳などの生命過程が試験管内で再構成された例が既に報告されている。しかしながら、細胞膜を舞台とする生命現象(細胞間接着や、細胞外からの機械的なシグナル、化学的なシグナル、電気的なシグナルの受容)については、機能的や形態的に生きた細胞の機能や構造を忠実に反映させた再構成は依然、非常に難しい課題として残っている。

その理由として、私は少なくとも2つあると考えた。まず水に溶けない膜タンパク質や脂質の取り扱いが実験技術的に困難であること、更に、細胞膜自体が、多様な脂質と多様なタンパク質からなる超分子複合体を形成しており、細胞膜構造の構築原理が未解明であることが挙げられる。

生きた細胞の細胞膜と再構成に用いられる人工脂質二重膜の間には、いくつか重要な違いが存在する。1つには、生きた細胞の細胞膜を構成する細胞膜脂質は多様であり、膜タンパク質と特定の細胞膜脂質が協調して機能を発揮したり、膜構造の形態形成に関わる可能性がある。2つ目には、細胞膜は恒常的に細胞骨格に裏打ちされており、細胞骨格によって、膜タンパク質や細胞膜脂質の分布や動態が変化している可能性がある。

本研究では、生細胞を用いた解析と人工脂質二重膜を用いた解析を組み合わせることによって、上述した生細胞の細胞膜が持つ性質の生物学的な意義を明らかにし、生きた細胞膜の構築原理を解明することを目的とした。本研究提案の実用的な側面としては、精緻な細胞膜機能を持たせた人工組織材料の実用化や新たなドラッグデリバリーシステムの開発において重要な基盤技術の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、生きた細胞の生体膜と人工脂質二重膜の違いに着目して、1)膜タンパク質と脂質の協調による細胞膜構造の形成メカニズム、2)脂質の多様性の生理的意義、3)恒常的に細胞膜を裏打ちする細胞骨格が生成される仕組みや細胞骨格の機能の解明という3つの課題に取り組んだ。それぞれ、1)については微絨毛と呼ばれる細胞膜の突起構造、2)については細胞間接着装置のタイトジャンクション、3)については細胞膜の Blebbing に着目して解析を進めた。

微絨毛の解析においては、微絨毛にスフィンゴミエリンが高度に濃縮することを見出し

た。微絨毛でスフィンゴミエリンと協働する細胞膜タンパク質としてポドカリキシンを同定した。ポドカリキシンは、細胞質において EBP-50 を介して PI(4,5)P2 産生酵素の PIP5K β と複合体を形成することを見出した。以上より、細胞膜外層のスフィンゴミエリンが集積した領域で微絨毛形成に必要な PI(4,5)P2 が細胞膜内層で生成される仕組みを明らかにした(文献[1])。

タイトジャンクションの解析においては、タイトジャンクション領域の脂質組成の解析を行い、他の形質膜領域と比べて長鎖スフィンゴミエリンやプラズマローゲン型ホスファチジルエタノールアミンが多いことを見出した(投稿準備中)。現在、その生理的意義について解析中である。また本研究の過程で、CaMKII 阻害剤で細胞を処理すると、タイトジャンクションがラテラル膜まで拡大することを見出した。タイトジャンクションを構成する要素については既に多くの先行研究が為されているが、細胞内のタイトジャンクションの形成量を制御する仕組みについてはほとんど明らかになっていないため、この部分については論文に纏めた(文献[2])。

生きた細胞の細胞膜は常にアクチン細胞骨格に裏打ちされている。細胞膜を裏打ちしている細胞骨格が細胞膜から外れて、細胞膜のみが突出した構造を Bleb と呼ぶ。細胞の遊走など様々な現象で Bleb が形成されることが知られているが、その分子機構は良く解析されていない。細胞は如何に細胞骨格に裏打ちされていない細胞膜を感知するのか、あるいは細胞骨格が裏打ちすることで細胞膜に対してどのような質的な変化をもたらすのかについてはほとんど明らかになっていない。さきがけ研究において、私は Bleb の形成・退縮を理解する上で Key となる分子をいくつか同定することに成功した。現在、Bleb の膜動態を説明するモデルを検討している(投稿中)。

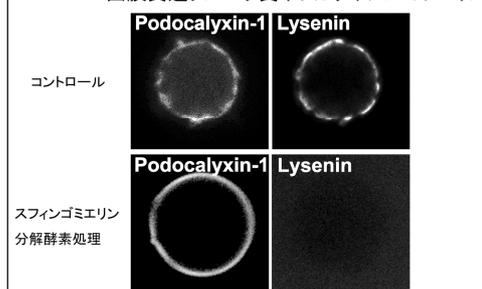
(2) 詳細

研究テーマ A「膜タンパク質と脂質の協調による微絨毛の形成メカニズム」

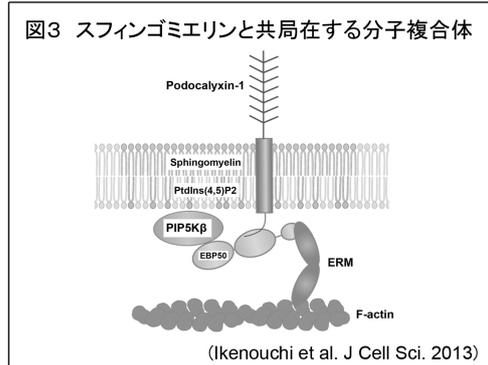
微絨毛は、上皮細胞のアピカル膜に存在する細胞膜構造で、細胞外との物質の交換にかかわる細胞膜の表面積を増加させる役割を担う。近年、微絨毛には TRP チャネルや ABC トランスポーターなどの機能性膜タンパク質が選択的に濃縮していることがわかり、シグナル情報伝達の重要な膜ドメインとして着目されている。微絨毛は、アクチン細胞骨格に裏打ちされた細胞膜の突出した構造であるが、その形成メカニズムについては不明な点が多い。微絨毛の形成に必要なタンパク質として、Ezrin/Radixin/Moesin や Epsin、Villin などのタンパク質が既に同定されているが、いずれもアクチン細胞骨格の制御因子であり、微絨毛の細胞膜脂質に関する先行研究は殆ど報告が無い。

私は本研究提案において、細胞膜脂質のシマミズの体腔液中に含まれるスフィンゴミエリン結合タンパク質の Lysenin(ライセニン)を用いて、微絨毛にスフィンゴミエリンが濃縮していることを見出した。さらに、アピカル膜のスフィンゴミエリンをスフィンゴミエリン分解酵素で処理す

図2 スフィンゴミエリン依存的に形成される一回膜貫通タンパク質ポドカリキシンのドメイン



ることにより消失させると、微絨毛が消失することを報告した (Ikenouchi et al. J Cell Sci. 2013) (図1)。微絨毛の形成に必須であるタンパク質としてポドカリキシンという 1 回膜貫通型のタンパク質が知られているが、形質膜からリポソームを形成すると、ポドカリキシンはスフィンゴミエリンと同じ膜ドメインに存在し、スフィンゴミエリンを消失させるとポドカリキシンのドメイン状の分布も解消されることから、スフィンゴミエリンとポドカリキシンは協調して膜ドメインを形成する性質を持つことを明らかにした(Ikenouchi et al. J Cell Sci. 2013) (図2)。さらにポドカリキシンの結合相手として、EBP-50 と PIP5Kbeta を同定し、微絨毛のアクチン細胞骨格の形成に必要な PIP2 を供給する分子機構としてスフィンゴミエリン/ポドカリキシン/EBP-50/PIP5Kbeta からなる分子複合体を同定した(図3)。また、強制的にこの分子複合体を FKBP システムなどに用いて多量体化すると、アクチンを含む突起構造が形成されることから、微絨毛の形成におけるスフィンゴミエリンの機能は、この分子複合体をクラスター化することであると予想される。



研究テーマB「タイトジャンクションに存在する多様な細胞膜脂質の機能解析」

タイトジャンクション(TJ)は上皮細胞のバリア機能を担う細胞膜構造である。バリア機能の破たんは慢性的な抗原や病原菌の体内への侵入を許し、アトピー性皮膚炎や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の原因となる。このため、TJ のもつバリア機能を人為的に制御する方法論を開発することは医学的に重要な課題である。また TJ は、体内の水やイオンが体外に漏出することを防ぐ上でも必須の構造であり、生体の恒常性維持に重要である。

TJ の主たる細胞接着分子は 4 回膜貫通タンパク質のクローディンである。マウスのゲノム上に存在する 27 種類のクローディンは、特定の器官の上皮組織に発現し、そのノックアウトマウスは、脳血管関門(クローディン 5)、セルトリ細胞による精巣血管関門(クローディン 11)など各器官の恒常性維持に重要な上皮組織のバリア機能の破たんによる表現型を示す。また逆に L 線維芽細胞にクローディンを強制的に発現させると TJ を異所的に形成することから、クローディンが形質膜に存在することが TJ の形成に必要なかつ十分であると理解されている。生細胞には、数千種類という多様な脂質分子が存在することを考えて、私は、タイトジャンクションにおいて特に豊富に存在する脂質が存在するかどうかについて、本さきがけ研究で検証を行った。さきがけ研究に先立って、私は、細胞膜を単離して、質量分析によって、細胞膜の脂質組成を解析する方法論を確立した (Ikenouchi et al. J Biol Chem 2012)。この手法を用いて TJ の細胞膜領域を単離して脂質組成の解析を行った結果、興味深いことに特定の脂質分子種が

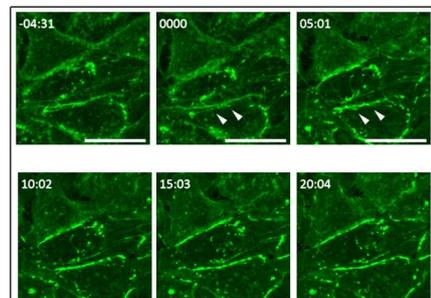


図4 培地中への脂質添加によるタイトジャンクションの形成回復過程

TJ の細胞膜に集積することを見出した。この脂質分子種の量を遺伝子操作により低減させた細胞では、TJ の形成が消失する(投稿準備中)。また逆に、培地中にこの脂質分子種を添加すると20分程度でTJ構造が回復する様子が観察された(図4)。このような知見は、TJの形成において細胞膜脂質が関与すること、および、その形成が脂質によって制御することが可能であることを示す知見である。

またさきがけ研究の過程で、タイトジャンクションの形成を促進する小分子化合物のスクリーニング法を開発した。約400種類の化合物スクリーニングの結果、予想外に CaMKII キナーゼの阻害剤で処理するとタイトジャンクションの形成が促進されることを見出した(図5)。この知見を踏まえて、増額措置を受けて、より大規模なスクリーニングを実施する準備を進めている(増額申請課題)。

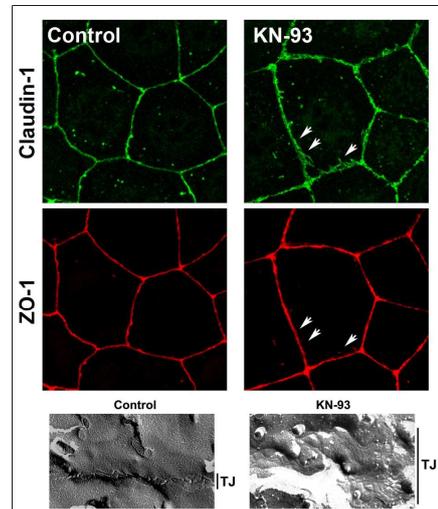


図5
CaMKIIの阻害によりTJがラテラル膜に拡大する
このときZO-1の局在は変化しない(矢印)

研究テーマC「細胞膜 Bleb における細胞骨格と細胞膜の相互作用」

生きた細胞の細胞膜は、人工脂質二重膜と異なり常にアクチン細胞骨格に裏打ちされている。生きた細胞において、細胞骨格に裏打ちされない細胞膜領域が一過性に形成されると、細胞膜が自由に拡張して突き出した構造をとる。これを Bleb と呼ぶ。Bleb は始原生殖細胞の遊走過程や細胞質分裂などの生理的な過程で見られる構造である。恒常的に細胞膜を裏打ちする細胞骨格が生成される仕組みや細胞骨格の機能を明らかにするために、細胞骨格が細胞膜から外れることによって形成される細胞膜 Bleb に着目して、Bleb の形成や退縮に関わる分子の機能解析を行った。その結果、いくつか非常に興味深い挙動を示す分子を同定し、細胞骨格と細胞膜の相互作用に関して、動的なネットワークの解明に取り組んだ(投稿中)。

3. 今後の展開

「細胞に膜タンパク質や細胞膜脂質が存在していること」と、「細胞膜構造が形成されること」の間には大きな理解のギャップが存在する。本研究の成果を踏まえて、今後さらに構造的なアプローチを研究に取り入れることで、細胞膜の構築原理の解明を目指したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

細胞膜の構造形成に関する研究(微絨毛・タイトジャンクション)について、脂質に着目して構造形成の原理の解明を着実にいった。特に、微絨毛に関してはデザイン通りに微絨毛様の形態を示す細胞膜構造形成を制御することが可能になった。またタイトジャンクションの研究では、予想外にタイトジャンクションの形成を増大させる化合物を見出した。この発見は、特許取得や企業との共同研究へと発展した。現在、増額措置を受けて、更に一層多くの化合物に対

してスクリーニングを展開している。Bleb に関する研究では、これまで分子生物学アプローチによる解析が為されてこなかった領域であるが、世界に先駆けて、Bleb の形成や退縮に関わるいくつかの重要な分子を同定することができた。Bleb の形成や退縮を分子のネットワークで説明できるモデルを現在投稿中である。このように、細胞膜構造の形成メカニズムの理解が進み、一部に関しては人為的な制御も可能になったという点を鑑みて、研究は順調に進捗したと考えている。

さがけ研究期間の2年目に、独立した研究・教育ポジションに異動することができた。現所属に異動後、さがけ最終年度の2015年には研究室の設備のセットアップが整い、学生の数も9名まで増加し、修士課程の学生を筆頭著者とする原著論文を研究室から報告することができた。また特許出願の内容を元に、企業との共同研究を2016年より開始するに至った。また本領域内の他のさがけ研究者との共同研究についても現在進行中であり、活発な交流を行った。

(2) 研究総括評価

細胞骨格タンパク質による細胞膜脂質の分布・動態の制御機構の解明において、微絨毛の構築に必要な脂質としてスフィンゴミエリンを同定し、スフィンゴミエリンと協働する膜タンパク複合体を同定し、タイトジャンクション領域の細胞膜脂質の解析を行い、特徴的な脂質組成であることを明らかにした。また、細胞膜Blebを安定に観察する細胞と方法論を確立し、Blebの伸展や退縮の際に興味深い挙動を示す分子を複数同定するなど、このさがけの期間中に多くの成果を出したことを高く評価します。

今後は、脂質と蛋白成分が膜の物性にどのように影響を与えているかを解明し、重要な構成因子の細胞内産生と膜領域への輸送機構を含めた膜の可塑的な構築の仕組みの解明を期待します。

平成26年度文部科学大臣表彰若手科学者賞、平成26年度 第7回 井上リサーチアワード、平成27年度 柿内三郎記念奨励研究賞を受賞し、今後、この分野の第一人者としての活躍が期待されています。また、最近、研究成果(特許出願)に基づき、企業との共同研究を開始して、新たな活動範囲を広げていることも特記します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ikenouchi J., Hirata M., Yonemura S., Umeda M., “Sphingomyelin Clustering is essential for the formation of microvilli.” *Journal of Cell Science* **2013**,126,3585–92.
2. Shiomi R., Shigetomi K., Inai T., Sakai M., Ikenouchi J., “CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier” *Scientific Reports* **2015**, 8, 13262
3. Arita Y, Nishimura S, Ishitsuka R, Kishimoto T, Ikenouchi J, Ishii K, Umeda M, Matsunaga S, Kobayashi T, Yoshida M. “Targeting cholesterol in a liquid-disordered environment by theonellamides modulates cell membrane order and cell shape.” *Chemistry and Biology* **2015** 22(5):604–10
4. Ohoka A, Kajita M, Ikenouchi J, Yako Y, Kitamoto S, Kon S, Ikegawa M, Shimada T, Ishikawa

S, Fujita Y. "EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells." *Journal of Cell Science* **2015** 128(4):781-9.

5. Oda Y, Otani T, Ikenouchi J, Furuse M. "Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42." *Journal of Cell Science* **2014** 127:4201-12.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 池ノ内 順一、塩見 僚

発明の名称: タイトジャンクション形成促進を評価するための細胞およびタイトジャンクション形成促進剤

出 願 人: 国立大学法人九州大学

出 願 日: 2015/4/13

出 願 番 号: PCT/JP2015/061374

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 主要な学会発表

2013 年 12 月 3 日 第36回日本分子生物学会年会 (神戸)「細胞骨格タンパク質による細胞膜脂質の分布・動態の制御機構の解明」

2013 年 6 月 21 日 第 65 回日本細胞生物学会大会(名古屋)、「Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli.」

2. 受賞

2014 年 4 月 15 日 平成26年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞

2014 年 12 月 10 日 平成26年度 第7回 井上リサーチアワード

2015 年 12 月 5 日 平成27年度 柿内三郎記念奨励研究賞