

論文の内容の要旨

論文題目

Generation of non-toxic equinatoxin-II unveiled intracellular distribution and function of sphingomyelin in the cytosolic leaflet of biomembranes
(無毒化エキナトキシン-II を用いた細胞質側脂質層スフィンゴミエリンの存在証明と機能解析)

氏 名 仁木 隆裕

【序論】

我々の体を構成する細胞は、形質膜やオルガネラ膜といった多彩な膜構造を有する。これら生体膜は脂質の二重層から構築されるが、各々の膜は多様でかつ特徴的な脂質組成・分布を有することで、シグナル伝達の間やオルガネラ固有の機能等を提供していると考えられている。このことはすなわち、細胞現象をタンパク質のみの作動機序から理解するのではなく、タンパク質が機能する脂質膜環境をも包括した枠組みの中で理解する必要性を示している。そのためには、生体膜脂質の時空間的分布および制御基盤の理解は不可欠であり、脂質を可視化する技術が必要になる。

生体膜を作る多様な脂質の中でも、スフィンゴミエリン (SM) は約 1 割を占める主要なリン脂質であり、情報伝達の間や構築あるいは神経の髄鞘形成など生命活動に必須の役割を担うことが知られている。赤血球膜の研究から SM は一般的に形質膜の表層 (脂質二重層の外葉) に存在していると考えられており、細胞内、特に細胞質側の脂質層での SM は、技術的制約もあるためほとんど注目されていなかった。そこで、私は、博士後期課程において、SM に特異的に結合するタンパク質性毒素であるエキナトキシン-II (Eq2-II) を無毒化することで、生細胞の細胞質に発現できる SM プローブの作製を行い、生細胞内での SM の可視化、および細胞内、特に細胞質側の SM の機能の解明を目指した。

【方法と結果】

1. 無毒化 Eqt-II の創出と細胞質側 SM の局在解析

SM の検出には、シマミミズ由来毒素であるライセニンが広く利用されてきたが、ライセニンはクラスター化した SM(脂質ラフト内の SM など)を選択的に認識するプローブであり、分散して膜に存在する SM を検出できない短所がある。一方、Eq2-II は、分散した SM にも結合することができ、生体膜での会合状態の異なる SM を可視化できると考えられている。実際、固定細胞においてライセニンが標識できない SM も、Eq2-II により検出可能であった (R. Yachi et al., *Genes to Cells* 17(8): 720-7 (2012))。しかし、Eq2-II は、生体膜に結合すると速やかに pore を形成する毒素であり、生細胞に対して強烈的な毒性を示すというプローブとしての脆弱性があった。また、Eq2-II は全長で SM を認識すると考えられており、SM 結合ドメインのみを抽出するような無毒化手段を取れず、そのことが生細胞内の SM の解析を困難にしていた。

そこで、私は、Eq2-II の立体構造予測から毒性発揮に関与しうるアミノ酸残基をアラニンに置換するスクリーニングを行い、SM 結合特異性を維持しつつ、細胞毒性を軽減させる変異を探索した。その結果、二箇所のアミノ酸残基をアラニンに置換することで、Eq2-II の無毒化に成功した。この無毒化 Eqt-II (以下、SM プローブと表記)に蛍光タンパク質を付与したものを生細胞の細胞質に発現させることで、細胞質側を向く SM の動態を可視化することが可能となった。発現させた SM プローブは主に核近傍部に局在したが、バクテリア由来の SM 分解酵素を細胞質にマイクロインジェクションすると直ちに細胞質中に散在化したことから、このプローブは生細胞内の SM を認識していると考えられた。以上のことから、生体膜脂質層の細胞質側にも SM が存在することが強く示唆された。また、免疫染色法により詳細なオルガネラ局在を解析したところ、SM が一部の細胞内オルガネラ (リサイクリングエンドソーム、リソソーム、トランスゴルジ) に局在していることがわかった。

2. 細胞質に発現させた SM プローブを散在化させるタンパク質の同定

次に私は、上記 SM の細胞内局在を可能とするタンパク質の同定を目指し、細胞質に発現させた SM プローブの局在異常を指標に、脂質輸送、および SM 合成・代謝に関連するタンパク質群(85 種検討)の RNAi を行った。その結果、とあるコレステロールの細胞内輸送に必須なタンパク質の発現抑制により細胞質に

発現させた SM プローブのオルガネラ局在が失われることを見出した。このタンパク質の機能阻害剤処理によっても、SM プローブの散在化が見られた。また、発現抑制時に見られる細胞内コレステロールの局在異常を解消させても、SM プローブの散在化はほとんど回復しなかった。以上のことから、上記同定したタンパク質による細胞質 SM プローブの散在化は、コレステロールの異常が直接的な要因ではないことが示唆された。現在、コレステロール輸送以外の機能により細胞質側脂質層の SM 局在化に機能している可能性を考えている。

3. 細胞質側脂質層に存在する SM 近傍の候補タンパク質の同定

細胞質側に存在する SM の機能を知るためには、SM に結合するタンパク質や近傍に存在するタンパク質群の情報が重要である。そこで、私は、SM プローブとビオチン化酵素とを融合させたものを細胞質に発現させることで、細胞質側脂質層 SM のごく近傍に存在し SM と相互作用が予想されるタンパク質を網羅的にビオチン化した。その結果、LC-MS/MS 解析により約 500 種類のタンパク質を SM 近傍の候補分子として同定した。予想に即し、シグナル受容体や脂質修飾化タンパク質といった、脂質ラフトに存在するとされる膜タンパク質が多く含まれていた。一方、注目すべきことに、細胞内膜輸送を制御するタンパク質が数多く同定された。このことから、細胞質側脂質層に存在する SM は膜輸送の制御に関与している可能性が示唆された。

【まとめ】

本研究において私は、生細胞に応用可能な新規 SM プローブを作製することで、細胞質側脂質層に SM が存在すること、およびその詳細な細胞内分布を明らかにした。また、細胞質側 SM の局在に必要なタンパク質を同定し、SM 近傍に存在すると予想される候補タンパク質を網羅的に同定した。すなわち、これらのタンパク質の阻害・欠損を行うことで、細胞質側脂質層に存在する SM の機能、および SM が関わる現象を探索できるようになった。今後は、他に数多く同定された SM 近傍の候補タンパク質の解析などを通じ、SM の新たな機能、新たな内膜ドメインの存在を提唱するとともに、SM の局在変化が細胞内現象にどのように関わるか、などの点も解明していきたい。