

## 可視化することでわかってきた細胞膜のスフィンゴミエリンの動態と分布

阿部 充宏

## 1. はじめに

細胞膜は細胞を取り囲む一番外側の生体膜で、外層と内層からなる脂質二重層の構造を形成している。哺乳動物細胞の細胞膜には数千分子種の脂質が存在するが、その多くは、グリセロ脂質、スフィンゴ脂質、ステロールの3種類に大別される。このうちスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリン（以下、SM）は、リン脂質の5～15%を占める主要な脂質であり、細胞膜の外層に多く局在する。SMはコレステロールとともに、周囲に比べて流動性の低い脂質ドメイン「脂質ラフト」を形成し、シグナル伝達など多様な機能を持つことが示唆されている<sup>1)</sup>。脂質ラフトに関しては百人百様の捉え方があるが、2006年のKeystone Symposiumによると、「直径10～200nmのステロールとスフィンゴ脂質に富んだ膜ドメイン」と定義されている<sup>1)</sup>。これまで、脂質ラフトの構造や機能を明らかにするために、SMの動態や分布に関してさまざまな解析がなされてきた。このうち、SMの動態解析に関しては、SMを蛍光ラベルした「蛍光アナログ」を用い、蛍光相関分光法（FCS）や1分子観察で計測されることが多い。SMの分布解析に関しては、SMに特異的に結合する「脂質結合タンパク質」を用いて、SMの膜ドメインを顕微鏡や電子顕微鏡で観察する手法が有効である。本稿では、「蛍光アナログ」を用いたSMの動態解析、「脂質結合タンパク質」を用いたSMの分布解析、両者を用いることで同定されたSMのflipに関わる因子、の順に紹介する。

## 2. 「蛍光アナログ」によるSMの動態解析

脂質には、脂質二重層の片方の層内を横方向に移動する側方拡散と、片方の層からもう一方の層へ層間を移動するflip-flopと呼ばれる運動が存在する<sup>2)</sup>。これらの動態を

解析するために、脂質分子の一部に蛍光物質が化学修飾された「蛍光アナログ」が多用される。蛍光物質として用いられるのが、nitrobenzoxadiazole（NBD）、dipyrrromethene-boron difluoride（TopFluor）、BODIPY、anthracene、pyrene、diphenylhexatriene、ATTOといった化合物である。脂質の側方拡散に関しては、蛍光アナログを人工膜や細胞膜に添加し、蛍光アナログの動態をFCSによって計測する手法がとられる。一例としてあげると、CHO-K1細胞の細胞膜外層においてTopFluor-SMの動態を計測した結果、拡散係数が $0.5\mu\text{m}^2/\text{sec}$ 程度であった<sup>3)</sup>。TopFluor-SMのように、蛍光アナログは脂質の疎水性尾部が蛍光標識されることが多いが、この化学修飾により、天然型の脂質とは物性が異なる可能性が指摘されている。たとえば、尾部が蛍光標識されたSMは、天然型のSMとは異なり、人工膜では秩序液体相（ $L_o$ 相）だけでなく無秩序液体相（ $L_d$ 相）にも多く存在するようになる<sup>4)</sup>。この問題を克服するため、SMの親水性頭部に蛍光ラベルする方法がとられている。SMの頭部にリンカーを介してATTO594ラベルした594neg-SMは、天然型のSMと同様に $L_o$ 相に優先的に取り込まれる<sup>5)</sup>。594neg-SMの動態をFCSによって解析した結果、CHO-K1細胞の細胞膜上の拡散係数は $0.6\mu\text{m}^2/\text{sec}$ 程度であった。FCSの励起領域を狭めるために、stimulated emission depletion（STED）と組み合わせたSTED-FCSが試みられている<sup>6)</sup>。PtK2細胞の細胞膜上でのAtto647N-SMの動態を解析した結果、FCSでは拡散係数が $0.4\sim 0.5\mu\text{m}^2/\text{sec}$ 程度であったのに対し、STED-FCSでは $0.1\sim 0.2\mu\text{m}^2/\text{sec}$ 程度の遅いAtto647N-SM分子が観察された。この結果から、細胞膜のSM分子は、単純に自由拡散されるだけではなく、局所では何らかの因子によって一過的に捕捉されることが示唆された。この一過的な捕捉は、1分子観察による動態解析でも示唆されている<sup>5)</sup>。

蛍光アナログは、グリセロ脂質やスフィンゴ脂質のflip-flopの解析にも用いられている。細胞膜の外層と内層では、グリセロ脂質の構成成分が大きく異なる。ホスファチジルコリン（PC）は外層に多く存在するのに対し、ホスファチジルエタノールアミン（PE）／ホスファチジルセリン（PS）／ホスファチジルイノシトール（PI）は内層に多く存在する。人工膜においてBODIPYラベルしたPC（ $C_5$ -DMB-PC）を用いてflip-flopを測定した結果、鎖長の短い $C_5$ -DMB-PCでも半減時間が数時間と遅く、まれにし

理化学研究所開拓研究本部（〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1）

Visualization of sphingomyelin reveals the dynamics and distribution of the lipid in the plasma membrane

Mitsuhiro Abe (RIKEN Cluster for Pioneering Research, 2-1 Hiro-sawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940735

© 2022 公益社団法人日本生化学会

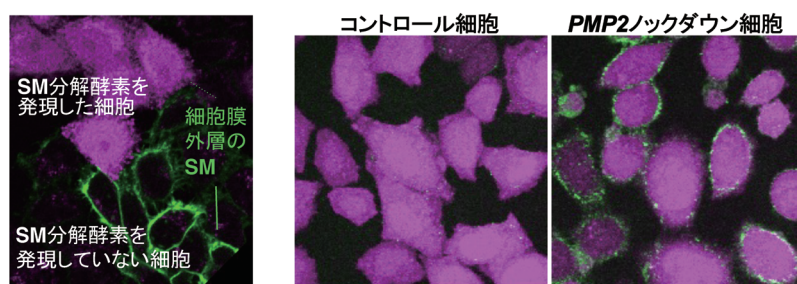


図1 脂質結合タンパク質「ライセニン」で染色される細胞膜外層のSM

左：細胞内にSM分解酵素を発現させた細胞では、GFP-ライセニンで染色される細胞膜外層のSMが減少する。  
右：PMP2遺伝子をノックダウンすると、SM分解酵素を発現させても細胞膜外層にSMが観察される。

か起こらない反応であることがわかった<sup>7)</sup>。グリセロ脂質はERの脂質二重層では対称的な分布をしていることから、細胞膜の脂質二重層で非対称な分布になるためには、脂質を積極的にflip-flopさせる因子が必要である。グリセロ脂質については、外層から内層へ脂質をflipさせるタンパク質flippaseの理解が進んでいる<sup>2)</sup>。代表的なflippaseとしてType IV P-type ATPase (P4-ATPase) があげられる<sup>2)</sup>。哺乳動物細胞では14種類のP4-ATPaseが存在するが、脂質に対する基質特異性がみられる。蛍光アナログを用いた解析から、P4-ATPaseであるATP11AとATP11CはNBD-PSとNBD-PEに対して、ATP8B1はNBD-PCに対してflip活性が示されている<sup>8)</sup>。ところが、これらのP4-ATPaseは、NBD-SMに対してはflip活性を示さない<sup>8)</sup>。このことから、P4-ATPaseにはグリセロ脂質とスフィンゴ脂質を区別する何らかの機構が存在すると予想される。出芽酵母のP4-ATPaseであるDnf1を用いた解析から、グルセロ脂質選択的なflipには、少なくともDnf1の1番目の膜貫通領域にあるアスパラギンが関与していることが示唆されている<sup>9)</sup>。

### 3. 「脂質結合タンパク質」によるSMの分布解析

SMの大部分は、ゴルジ体内腔でSM合成酵素SMS1とSMS2によって合成された後、細胞膜外層へ輸送される<sup>10)</sup>。SMの一部は、SMS2により細胞膜外層で合成される<sup>10)</sup>。いずれにしても生合成直後のSMは、細胞膜外層に存在する。人工膜におけるSMはflipしにくいことから<sup>2,7)</sup>、細胞中にSMをflipする因子が存在しないならば、細胞膜のSMのほとんどは外層側に分布していると予想される。実際のSMの分布を調べるため、SMに特異的に結合する「脂質結合タンパク質」を用いて、電子顕微鏡による観察が行われた<sup>11)</sup>。脂質結合タンパク質として、シマミミズ (*Eisenia foetida*) 由来の297アミノ酸残基からなる、「ライセニン」が用いられた。ライセニンは、人工膜沈降や表面プラズモン共鳴などの生化学的解析により、同じホスホコリンを持つPCには結合せず、SMに対して特異的に

結合することが示されている<sup>12)</sup>。また、ウメボシイソギンチャク (*Actinia equina*) 由来のエキナトキシンIIという脂質結合タンパク質とは異なり、分散した状態のSMではなく、数分子が集めた状態のSMに優先的に結合する<sup>13)</sup>。ヒト線維芽細胞を凍結割断 (フリーズフラクチャー) し、ライセニンによって染色し、電子顕微鏡で細胞膜外層および内層のSMの分布を解析した<sup>11)</sup>。ライセニンに反応した金コロイドの数を計測した結果、細胞膜のSMのうち、88%が細胞膜外層に、12%が細胞膜内層に局在していた。金コロイドのクラスター解析を行った結果、SMは細胞膜外層では半径36nm程度の脂質ドメインを、内層では半径148nm程度の脂質ドメインを形成していることが明らかになった<sup>11)</sup>。

### 4. SMのflipに関わる因子の同定

筆者らは、細胞膜内層で観察されたSMの由来や役割を調べるため、培養細胞の細胞質中にSM分解酵素を発現させ、細胞質に接している細胞膜内層のSMのみを分解させようと試みた<sup>14)</sup>。ところが、GFPとライセニンとの融合タンパク質によってこの細胞を染色した結果、細胞膜外層のSMも減少していることがわかった (図1左)。この理由として、細胞膜外層のSMが未知の因子によって内層へ持続的にflipさせられ、内層で細胞質中のSM分解酵素によって分解されるため、次第に外層のSMも減少する可能性が考えられた。そこでSMのflipに関わる因子を同定するために、ノックダウンRNAのライブラリーを用いて、SM分解酵素を細胞質中で発現させても、細胞膜外層のSMが減少しない表現型を示す細胞を探索した。スクリーニングの結果、約10個の原因遺伝子を特定した。このうち、最も強い表現型を示したPMP2タンパク質 (peripheral myelin protein 2) について解析を進めた (図1右)。

PMP2は末梢神経系の神経細胞のミエリン鞘に多く含まれるタンパク質であるが、FABP8 (fatty acid-binding protein 8) とも呼ばれ、多くの細胞種でも発現している。

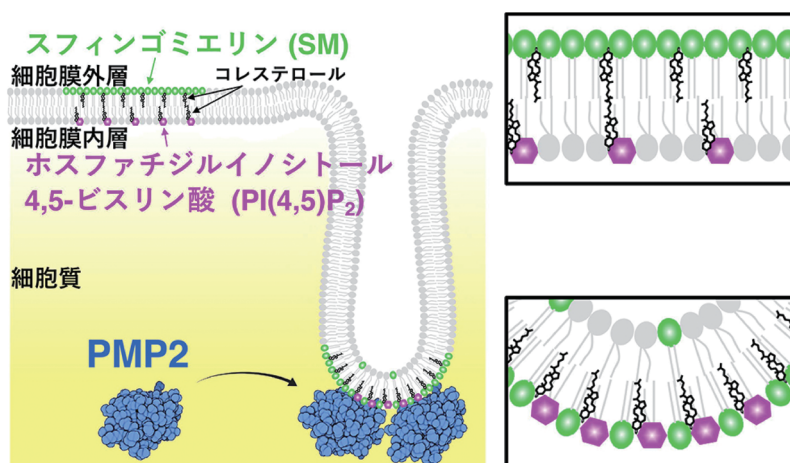


図2 PMP2により細胞膜外層から内層へflipするSM  
細胞膜外層のSMのちょうど裏側の内層にPI(4,5)P<sub>2</sub>の脂質ドメインが形成されている(右上)。PMP2は細胞膜内層のPI(4,5)P<sub>2</sub>に結合し、細胞膜をチューブ状に一部変形させ、その際に内層側の表面積を補うため外層側からSMがflipする(右下)。文献14を改変。

PMP2がSMを細胞膜外層から内層へflipさせるのかを確かめるための実験を行った。①細胞内でPMP2遺伝子を欠損させたノックアウト細胞では、NBD-PCとNBD-PEのflipはコントロールと同様に観察されたものの、NBD-SMのflipはコントロールに比べて起こりにくくなっていた。②PMP2を過剰に発現させた細胞では、ライセニンで染色されるSMはコントロールに比べて細胞膜外層で減少し、内層で増加していた。③NBD-SMを添加した人工膜に、リコンビナントのPMP2タンパク質を反応させたところ、NBD-SMが人工膜の片方の層からもう一方の層へflipされていた。①～③の結果から、PMP2はSMを細胞膜外層から内層へflipさせる活性を持つことが示唆された。細胞膜に存在する数種類の脂質とPMP2の結合能を調べたところ、PMP2はホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸(PI(4,5)P<sub>2</sub>)と特異的に結合することがわかった。PMP2存在下で、PI(4,5)P<sub>2</sub>を含んだ人工膜の形状を調べた結果、PMP2は球状の人工膜の一部からチューブ状の膜構造を形成させることがわかった。筆者らは、過去の研究で、細胞では細胞膜外層に存在するSMのちょうど裏側の内層にPI(4,5)P<sub>2</sub>が存在することを示している<sup>12)</sup>。以上を考えると、PMP2は細胞膜内層のPI(4,5)P<sub>2</sub>に結合し、細胞膜をチューブ状に変形させるが、このとき増加する内層側の表面積を補うために外層側からSMがflipされると考えられる(図2)。

## 5. おわりに

本稿では、蛍光アナログを用いたSMの動態解析、脂質結合タンパク質を用いたSMの分布解析、両者を用いたflipに関わる因子の同定について紹介した。最後に、蛍光

アナログと脂質結合タンパク質とを比較したい。蛍光アナログは脂質結合タンパク質に比べ、直接的に動態を解析できる点以外にも、以下の点が優れている。まず、蛍光アナログの方が脂質結合タンパク質に比べて種類が多い。蛍光アナログの化学合成は比較的容易だが、特定の脂質に結合する脂質結合タンパク質は単離が困難である。実際にこのようなタンパク質の探索がさまざまな研究グループによって試みられたが、成功例は少ない。また、脂質の蛍光アナログの方が優れている点として、脂質結合タンパク質は膜の物性を変化させる場合があるが、蛍光アナログはそのような影響が少ない点があげられる<sup>15)</sup>。天然型の脂質と物性が近い蛍光アナログや同位体アナログを組み合わせながら、時間分解能が高い顕微鏡で解析することにより、脂質の動態に関して、高精度な結果が得られると期待される。

一方、脂質結合タンパク質は、蛍光アナログに比べて以下の4点が優れていると考えられる。まず1点目は、脂質結合タンパク質は水溶性であるため、生きた細胞を染色しやすい点があげられる。蛍光アナログは、脂肪酸の鎖長を短くして細胞にとり込みやすくする工夫もあるが、天然型の脂質とは物性が異なる可能性がつきまとう。2点目は、脂質結合タンパク質は細胞膜上で化学固定がしやすい点があげられる。空間分解能の高い解析をするためには、観察対象を化学固定する必要がある場合があるが、蛍光アナログは化学固定されにくい。3点目は、脂質結合タンパク質は観察対象の脂質のみを可視化できる点があげられる。蛍光アナログは、細胞内で代謝されてしまい、長時間観察では、他の物質に変化してしまう可能性がある。4点目は、集合状態の違いや、複合体を認識できる点があげられる。たとえば、分散したSM特異的に結合するエキナトキシンIIと集合したSM特異的に結合するライセニンを使い分



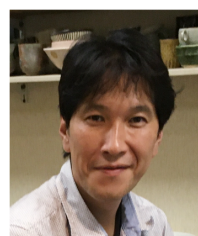
けることによって、SMの集合状態の違いを可視化することができる<sup>13)</sup>。また、SMとコレステロールとの複合体特異的に結合するナカノリ (nakanori) を用いることによって、複合体を可視化することができる<sup>16)</sup>。今後、脂質結合タンパク質を用い、空間分解能が高い Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) などの顕微鏡で可視化することで、オルガネラの脂質分布や脂質ドメインの微細構造が明らかになると期待される。

## 文 献

- 1) Pike, L.J. (2009) The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.*, **50**(Suppl), S323–S328.
- 2) Holthuis, J.C. & Levine, T.P. (2005) Lipid traffic: Floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 209–220.
- 3) Gupta, A., Korte, T., Herrmann, A., & Wohland, T. (2020) Plasma membrane asymmetry of lipid organization: Fluorescence lifetime microscopy and correlation spectroscopy analysis. *J. Lipid Res.*, **61**, 252–266.
- 4) Sezgin, E., Levental, I., Grzybek, M., Schwarzmann, G., Mueller, V., Honigsmann, A., Belov, V.N., Eggeling, C., Coskun, U., Simons, K., et al. (2012) Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1818**, 1777–1784.
- 5) Kinoshita, M., Suzuki, K.G., Matsumori, N., Takada, M., Ano, H., Morigaki, K., Abe, M., Makino, A., Kobayashi, T., Hiro-sawa, K.M., et al. (2017) Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. *J. Cell Biol.*, **216**, 1183–1204.
- 6) Honigsmann, A., Mueller, V., Ta, H., Schoenle, A., Sezgin, E., Hell, S.W., & Eggeling, C. (2014) Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nat. Commun.*, **5**, 5412.
- 7) Bai, J. & Pagano, R.E. (1997) Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry*, **36**, 8840–8848.
- 8) Takatsu, H., Tanaka, G., Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S., Nakayama, K., & Shin, H.W. (2014) Phospholipid flippase activities and substrate specificities of human type IV P-type ATPases localized to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **289**, 33543–33556.
- 9) Roland, B.P. & Graham, T.R. (2016) Directed evolution of a sphingomyelin flippase reveals mechanism of substrate backbone discrimination by a P4-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E4460–E4466.
- 10) Taniguchi, M. & Okazaki, T. (2021) Role of ceramide/sphingomyelin (SM) balance regulated through “SM cycle” in cancer. *Cell. Signal.*, **87**, 110119.
- 11) Murate, M., Abe, M., Kasahara, K., Iwabuchi, K., Umeda, M., & Kobayashi, T. (2015) Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J. Cell Sci.*, **128**, 1627–1638.
- 12) Abe, M., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., Kamijo, K., Ohno-Iwashita, Y., Hanada, K., Mizuno, H., Miyawaki, A., & Kobayashi, T. (2012) A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 1396–1407.
- 13) Makino, A., Abe, M., Murate, M., Inaba, T., Yilmaz, N., Hullin-Matsuda, F., Kishimoto, T., Schieber, N.L., Taguchi, T., Arai, H., et al. (2015) Visualization of the heterogeneous membrane distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity, and sphingolipidosis. *FASEB J.*, **29**, 477–493.
- 14) Abe, M., Makino, A., Murate, M., Hullin-Matsuda, F., Yanagawa, M., Sako, Y., & Kobayashi, T. (2021) PMP2/FABP8 induces PI(4,5)P2-dependent transbilayer reorganization of sphingomyelin in the plasma membrane. *Cell Rep.*, **37**, 109935.
- 15) Hammond, A.T., Heberle, F.A., Baumgart, T., Holowka, D., Baird, B., & Feigenson, G.W. (2005) Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6320–6325.
- 16) Makino, A., Abe, M., Ishitsuka, R., Murate, M., Kishimoto, T., Sakai, S., Hullin-Matsuda, F., Shimada, Y., Inaba, T., Miyatake, H., et al. (2017) A novel sphingomyelin/cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C. *FASEB J.*, **31**, 1301–1322.

## 著者寸描

### ●阿部 充宏 (あべ みつひろ)



理化学研究所開拓研究本部専任研究員。博士 (理学)。

■略歴 1973年福島県に生る。97年東京大学理学部卒業。2002年同大学院理学系研究科修了。同年同大学院新領域創成科学研究科博士研究員。04年NIH客員研究員。05年理化学研究所研究員。13年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞膜上の脂質ドメインを、超解像顕微鏡や1分子イメージングで観察しています。可視化で得られた情報から、脂質ドメインの構造/機能を解明したいと考えています。

■ウェブサイト <http://www2.riken.jp/cell-info/>

■趣味 旅行 陶芸 ワイン。