

小林脂質生物学研究室 Lipid Biology Laboratory

主任研究員 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ビス(モノアシルグリセロ)リン酸等である。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、オルガネラ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。本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超分子構造のアッセンブリーのメカニズム、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. コレステロールによる脂質輸送の制御 (村手*¹、村瀬*²、石塚、阿部、小林)

CHO 細胞は細胞密度の上昇とともに細胞のコレステロールが増加する。低密度培養と高密度培養の二つの細胞群を用いていくつかの脂質プローブのエンドサイトーシスを測定したところ、低密度培養ではコレステロール類似体やスフィンゴミエリン類似体のリサイクリングエンドソームへの輸送が観察された。一方、高密度培養ではリサイクリングエンドソームへの輸送は観察されなかった。蛍光標識ラクトシルセラミドのエンドサイトーシスは細胞密度の影響を受けないことから、限られた脂質のエンドサイトーシスが細胞密度によって影響を受けることが示唆された。高密度の細胞からコレステロールを除くと蛍光スフィンゴミエリンがリサイクリングエンドソームに輸送されることから、細胞密度に依存したエンドサイトーシスはコレステロールによって制御されていることが示唆された。細胞密度とコレステロールによって制御されているエンドサイトーシスの分子メカニズムを探るため、低分子量 GTPase、rab タンパク質の細胞内分布を測定した。われわれの結果は rab11 が細胞密度によって細胞内分布を変化させること、またこの変化はコレステロールによって影響を受けることを示している。さらに GTP 型 rab11 は脂質プローブの輸送を初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへと変化させた。これらの結果はコレステロールが rab11 を介して膜脂質のエンドサイトーシス経路をコントロールしていることを示唆している。

2. 曲率に依存したホスファチジルエタノールアミンの認識 (岩本*²、村手*¹、牧野、高橋、小林)

デュラマイシンはホスファチジルエタノールアミンを特異的に認識するシンナマイシン (Ro09-0198) に類似した 19 アミノ酸からなる環状ペプチドである。デュラマイシンの脂質特異性はわかっていない。本研究によりデュラマイシン、シンナマイシンともにエタノールアミンリン脂質(ホスファチジルエタノールアミンおよびエタノールアミンプラスマローゲン)を認識することが示された。モデル膜の研究からデュラマイシンおよびシンナマイシンのホスファチジルエタノールアミンを含む膜への結合は膜の曲率に依存して起こることが示された。すなわち、どちらのペプチドもより小さな小胞に効率よく結合した。電子顕微鏡観察と X 線小角散乱の実験により、これらのペプチドの多重層膜への結合は膜の管状構造を誘起することが示された。これらの結果はデュラマイシン、シンナマイシンは膜の曲率を変化させることによりホスファチジルエタノールアミン膜に効率良く結合することを示している。

3. エンドソーム特異的脂質の生合成 (Hullin-松田、稲留*²、瀬野尾、小林)

ビス(モノアシルグリセロ)リン酸(bis(monoacylglycerol)phosphate, BMP)は後期エンドソームに濃縮され、オルガネラからの脂質やタンパク質の輸送に重要な役割を果たしていると考えられている。BMP の生合成についてはわからないことが多い。われわれはホスファチジルグリセロール合成の初発反応を触媒するホスファチジルグリセロリン酸合成酵素(phosphatidylglycerophosphate(PGP) synthase)を欠損した CHO 細胞、およびカルジオリピンのリモデリングに関与する酵素、タファジンを欠損したパース病患者由来のリンパ芽球を用い、ホスファチジルグリセロールあるいはカルジオリピンが BMP 合成の前駆体となっているかどうかを検討した。PGP 合成酵素欠損株では PG および BMP の合成が低下した。さらに PGP 合成酵素を過剰発現させることにより変異株で BMP 合成の増加が認められた。一方、パース病細胞では BMP の生合成や脂肪酸組成は影響を受けなかった。われわれの結果はカルジオリピンではなくホスファチジルグリセロールが BMP 合成の de novo の前駆体であることを示唆している。De novo 合成の低下にもかかわらず CHO 変異株では BMP 量は一定に保たれていた。このことは BMP 合成には de novo 合成以外の経路があることを示唆している。

4. 走査型トンネル顕微鏡による脂質膜の観察 (小林)

走査型トンネル顕微鏡を用い、チオール修飾した金表面に形成させた脂質膜を観察した。Au(111)面上に形成した 1-オクタチオール上に 1,2-ジヘキサノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンを中性 0.05 M NH₄ClO₄懸濁液として添加した。脂質の構造は添加電圧によって変化し、0.0 V では流動層であるのに対して +0.2 V と -0.2 V を交互に添加すると特徴的なストライプ構造が観察された。観察された構造変化は脂質の集合状態の変化に起因することが示唆された。

*¹協力研究員 *²基礎科学特別研究員

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. Our aim is to understand the organization, assembly and function of specific lipids and lipid domains. For this purpose, we developed several lipid-specific probes and a new inhibitor of sphingolipid biosynthesis. These tools, in conjunction with biochemical, biophysical and cell biological approaches are now starting to provide valuable information to understand lipid supramolecular organization.

1. Cholesterol controls lipid endocytosis through rab11

Cellular cholesterol increases when cells reach confluency in Chinese hamster ovary (CHO) cells. We examined the endocytosis of several lipid probes in subconfluent and confluent CHO cells. In subconfluent cells, fluorescent lipid probes including poly(ethylene glycol)derivatized cholesterol, 22-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholesterol-3 β -ol, and fluorescent sphingomyelin analogs were internalized to pericentriolar recycling endosomes. This accumulation was not observed in confluent cells. Internalization of fluorescent lactosylceramide was not affected by cell confluency, suggesting that the endocytosis of specific membrane components is affected by cell confluency. The crucial role of cellular cholesterol in cell confluency-dependent endocytosis was suggested by the observation that the fluorescent sphingomyelin was transported to recycling endosomes when cellular cholesterol was depleted in confluent cells. To understand the molecular mechanism(s) of cell confluency- and cholesterol-dependent endocytosis, we examined intracellular distribution of rab small GTPases. Our results indicate that rab11 but not rab4, altered intracellular localization in a cell confluency-associated manner, and this alteration was dependent on cell cholesterol. In addition, the expression of a constitutive active mutant of rab11 changed the endocytic route of lipid probes from early to recycling endosomes. These results thus suggest that cholesterol controls endocytic routes of a subset of membrane lipids through rab11.

2. Curvature-dependent recognition of ethanolamine phospholipids by duramycin and cinnamycin

Duramycin is a 19-amino-acid tetracyclic lantibiotic closely related to cinnamycin (Ro09-0198), which is known to bind phosphatidylethanolamine (PE). The lipid specificity of duramycin was not established. The present study indicates that both duramycin and cinnamycin exclusively bind to ethanolamine phospholipids (PE and ethanolamine plasmalogen). Model membrane study indicates that the binding of duramycin and cinnamycin to PE-containing liposomes is dependent on membrane curvature, i.e., the lantibiotics bind small vesicles more efficiently than large liposomes. The binding of the lantibiotics to multilamellar liposomes induces tubulation of membranes, as revealed by electron microscopy and small-angle x-ray scattering. These results suggest that both duramycin and cinnamycin promote their binding to the PE-containing membrane by deforming membrane curvature.

3. De novo biosynthesis of the late endosome lipid, bis(monoacylglycerol)phosphate

Bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP) is a unique lipid enriched in the internal membranes of the late endosome where it participates actively in the trafficking of lipids and proteins through this organelle. The *de novo* biosynthesis of BMP has not been clearly demonstrated. We investigated whether phosphatidylglycerol and cardiolipin could serve as precursors of the BMP *de novo* synthesis using two different cellular models: Chinese hamster ovary (CHO) cells deficient in phosphatidylglycerophosphate (PGP) synthase, the enzyme responsible for the first step of phosphatidylglycerol synthesis and human lymphoblasts from patients with Barth syndrome characterized by mutations in tafazzin, an enzyme implicated in the deacylation/acylation cycle of cardiolipin. The biosynthesis of both phosphatidylglycerol and BMP was significantly reduced in the PGP synthase-deficient CHO mutants. Furthermore, overexpression of the PGP synthase in the deficient mutants induced an increase of BMP biosynthesis. However the cellular content of BMP remained unchanged, most likely because of the slower turnover of the lipid in the phosphatidylglycerophosphate synthase-deficient mutants. In contrast to CHO mutant, BMP biosynthesis and its fatty acid composition were not altered in Barth syndrome lymphoblasts. Our results thus suggest that in mammalian cells, phosphatidylglycerol, but not cardiolipin, is a precursor of the *de novo* biosynthesis of BMP.

4. EC-STM observation on electrochemical response of fluidic phospholipids monolayer on Au(111) modified with 1-octanethiol

Electrochemical scanning tunneling microscopy (EC-STM) was applied to observe phospholipid layers over thiol-modified gold substrates as a model biological cell membrane. On a monolayer of 1-octanethiol on Au (111), a synthetic lipid, 1, 2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, was introduced in a neutral 0.05M NH₄ClO₄ buffer solution. The lipid molecules formed a fluidic layer at 0.0V vs. RHE of the substrate electrode potential. By cycling the electrode potential between +0.2V and -0.2V, the lipid layer reversibly changed over between the fluidic phase and a striped/grainy structure. This structural change might involve partial decomposition and oligomerization of phospholipids. This method will contribute for molecular biology by revealing the nanometer-scale structure of cell membrane.

Staff

Head

Dr. Toshihide KOBAYASHI

Members

Dr. Reiko ISHITSUKA

Dr. Mitsuhiro ABE

Dr. Motohide MURATE*

Dr. Yoshibumi UEDA*

Dr. Kunihiko IWAMOTO**

Dr. Kotonu MURASE**

Dr. Hironori INADOME**

Dr. Asami MAKINO***

Dr. Françoise HULLIN-MATSUDA***

Dr. Hiroshi TAKAHASHI***

Ms. Yukiko SENOH

*Contract Researcher

**Special Postdoctoral Fellow

***Visiting Scientist