

リン脂質分子の膜動態と細胞骨格制御

榎本 和生

生体膜の基本構造はリン脂質が2層に並ぶ脂質二重膜である。二重層の表裏ではリン脂質の分子種が全く異なること、いわゆる脂質非対称構造が存在することは半世紀以上前から知られていたが、その生物学的意義については長らく不明だった。筆者らは、リン脂質分子の局在・動態の可視化を目指し、特定のリン脂質分子を特異的に認識する分子プローブ群の開発を行った。さらにプローブ群や変異細胞株を駆使して、細胞膜局所においてリン脂質の非対称分布がダイナミックに変化すること、それが細胞骨格の時空間制御に関与することを突き止めた。

1. はじめに

細胞膜は細胞やオルガネラの内外界を隔てる境界である。その構造が脂質2分子膜からできていることを提唱したのは1925年 Gorter と Grendel である。その後、熱力学的に安定かつ分裂・融合を繰り返すダイナミックな障壁構造が、如何にして脂質とタンパク質により作り上げられるのかという問題について長年に渡る論争が繰り広げられ、最終的に1972年 Singer と Nicolson が発表した流動モザイクモデルにより決着した¹⁾。すなわち生体膜とは、両親媒性の脂質分子が親水頭部を外側へ、疎水部であるアシル基を内側に向けて2層に並ぶ脂質二重層構造であり、タンパク質は、あたかも“脂質の海に浮かぶ冰山”のように、二重膜中を自由に往来できる。個々の脂質分子もまた層内を自由に回転・拡散運動している。この動的モデルの出現は、従来の静的モデルでは説明できなかった膜タンパク質や膜自体のダイナミクスを解釈可能とした。

流動モザイクモデルのもう一つの新たな特徴は、脂質とタンパク質の膜内配置が不均一、つまり非対称であるという点である。すなわち、二重膜の内外層は互いに異なる

パーツから成り、外界と細胞内という全く異なる環境に対応するというアイデアである。その後、実際に様々な生体膜標本の解析が行われ、いずれの膜標本においても基本的には外層と内層を構成する脂質分子種が大きく異なることがわかってきた。

2. 生体膜リン脂質の非対称構造

これまでに、化学修飾法や酵素分解法など主として生化学的手法を用いて、様々な生体膜標本の脂質非対称分布について研究されている²⁾。最も解析がなされているヒト赤血球を例に挙げると、二重膜外層にはホスファチジルコリン(PC)、スフィンゴミエリン(SM)など親水頭部にコリンを含む分子種に富み、内層(細胞質側)はホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルイノシトール(PI)が多い(図1)。特にPSは、通常の条件下では、ほぼ100%が内層に分布し、逆にスフィンゴ糖脂質は、ほぼ100%が外層に存在するとされる。赤血球や血小板のように内膜系をもたない細胞では、脂質組成の違いはあるが、いずれの生物種においても同様の非対称性が報告されている(表1)。オルガネラ膜をもつ細胞では、技術的な問題から正確な数値を求めることは難しいが、PCやSMが外層、PSやPEが内層という大まかな非対称分布の傾向は、赤血球で得られているものと同様であると考えられている³⁾。

親水基の非対称性に加えて、疎水基である脂肪酸も二重膜外層と内層とは異なる組成を示す。この脂肪酸の非対称性は、リン脂質が一度形質膜へと運ばれた後に、細胞質

国立遺伝学研究所・神経形態研究部門/JST さきがけ
(〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111)

Molecular basis for membrane lipid dynamics and its roles in cytoskeletal organization

Kazuo Emoto (Neural Morphogenesis Lab, National Institute of Genetics/JST PRESTO, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan)

本総説は2006年度奨励賞を受賞した。

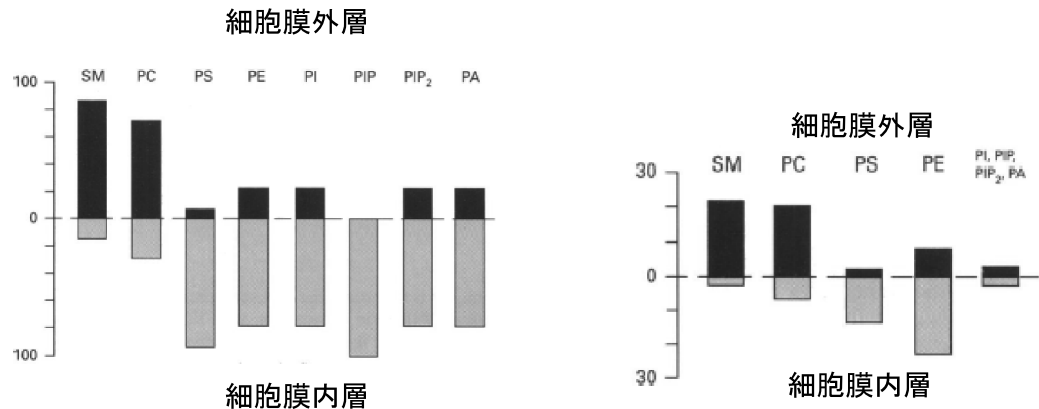


図 1 ヒト赤血球膜におけるリン脂質の非対称分布
左図は各々の脂質の分布を、右図は外内層それぞれの全脂質量を 100 としたときの各脂質の%を表示している (文献 2) より改変)。

表 1 様々な生物種の膜標本における主要リン脂質の非対称分布

	PC	SM	PE	PS
ヒト赤血球	77	80	20	5
マウス赤血球	50	85	20	0
ラット赤血球	62	100	20	6
サル赤血球	67	82	13	0
ヒト血小板	45	93	20	9
ブタ血小板	40	91	34	6

細胞膜表層に局在する各リン脂質の割合を示す。PC；ホスファチジルコリン，SM；スフィンゴミエリン，PE；ホスファチジルエタノールアミン，PS；ホスファチジルセリン (文献 2 より改変)。

に存在するホスホリパーゼ群とアシル基転移酵素群が協調的に機能することにより、形質膜内層に存在するリン脂質のアシル基がリモデリングを受けて形成される。このリモデリング経路はランス経路と呼ばれ、その存在は 50 年以上前から知られていたが、近年になってようやく分子機構が明らかにされつつある³⁻⁵⁾。

一方、ゴルジ体や小胞体など細胞内オルガネラ、シナプス小胞などに関しては、形質膜と比べて非対称性が弱い傾向にあるという報告もあるが、いまだコンセンサスは得られていない²⁾。

3. リン脂質分子のフリップ・フロップ運動

膜タンパク質の膜配向性は、合成時における小胞体膜への挿入段階で一義的に決定される。これに対して、リン脂質の膜配向性は各々のリン脂質分子が二重層を横切る動きであるフリップ・フロップ (flip-flop) 運動を行うことにより変化し得る。例えば、赤血球の老化⁶⁾、血小板の活性化⁷⁾、細胞のアポトーシス初期⁸⁾などにおいて、形質膜内層に局在していた PS や PE が、速やかに細胞表面へと移行することはよく知られている。表層に現れた PS は、複数

の PS レセプターを介して貪食細胞に認識され、その細胞は貪食除去される。これらの場合、膜脂質の非対称性の崩壊は不可逆的变化であり、細胞自身にとって意味することは「死」である。

ところが、このような末期的状況ではなくとも、形質膜上のリン脂質は恒常的にフリップ・フロップ運動を行っていることがわかってきた。たとえば、PE 結合ペプチド (後述) を用いて PE のフリップ・フロップ頻度を測定すると、健常な赤血球においても数分のオーダーで常にフリップ・フロップ運動を行っていることがわかる⁹⁾。従って、生体膜におけるリン脂質の非対称分布とは、決して静的なものではなく、あくまでも個々のリン脂質が常時行っている活発なフリップ・フロップ運動の暫時的な平衡状態であると考える必要がある。

リン脂質がフリップ・フロップ運動を行うためには、親水性である極性頭部が疎水膜中を通過する必要がある、大きなエネルギーを必要とする。実際、人工膜中のリン脂質分子のフリップ・フロップ運動は数日に 1 回の頻度でしか起こらない。後述するように、細胞はリン脂質をフリップ・フロップ運動させるために特別な分子装置を装備し、膨大なエネルギーを費やして絶えず膜上のリン脂質分子を内外両方向へと動かし続け、そのベクトル総和として非対称構造を形成しているのである。なぜ細胞は、このように一見無駄とも思える行為を続けているのだろうか？ この謎に挑戦するためには、リン脂質分子が「いつ・どこで」動いているのかという時空間情報が不可欠であると考えられた。

4. リン脂質分子の膜動態の可視化

私達は、リン脂質分子の局在・動態の可視化を目指して、リン脂質分子に対して特異的に結合する低分子プローブの開発を行ってきた。その中の一つである Ro09-0198 (以後 Ro) は、放線菌 *Streptoverticillium griseoverticillatum*

培養上清より単離されたアミノ酸 17 個からなる分子量 2,041 の環状ポリペプチドである。Inoue らは、このペプチドが細胞膜上の PE に対して結合し細胞膜障害性を示すことを明らかにした¹⁰⁾。その結合特異性は極めて厳密であり、PE の遊離アミノ基、リン酸基、および、それらの距離のいずれに構造変化を起こしても、全く結合しない (図 2)。またアシル基を 1 本欠いたリゾ PE に対しても、親和性は約 1/10 にまで低下する。NMR を用いた解析結果は、Ro が PE の親水基全体とアシル基の一部を包み込むようにして、モル比 1:1 で結合することを示している¹¹⁾。

PE の膜配向性を含めた正確な位置情報を得るためには、その細胞膜障害性が大きな問題となる。私達は、ビオチン化した Ro ペプチドとストレプトアビジンとの複合体を形成させると、PE に対する結合特異性を保ったまま、膜障害性のみ消失することを見出した¹²⁾。Ro ペプチドが膜障害性を示すメカニズムは、2 ステップ、すなわち 1) PE に対して結合するステップと、2) それが膜上で会合して穴を形成するステップがあると考えられているが、ストレプトアビジンとの複合体を形成させることにより、後者のみが阻害されたと解釈している。私達は、蛍光標識したストレプトアビジンと Ro ペプチドとの複合体 (以後、PE 結合ペプチド) を用いて、赤血球膜における PE の膜配向性¹²⁾や、アポトーシスに伴う PE の内層から外層への移行¹³⁾を可視化できることを示し、脂質イメージング・プローブとして使用可能であることを確認した。

5. 細胞分裂期における PE の膜配向性変化

実際に生体膜上における PE 局在の可視化を行うと、驚いたことに、様々な細胞活動に伴い PE の膜配向性が変化していることがわかってきた。特に、細胞分裂期においては、細胞がくびれる部分である分裂溝 (cleavage furrow) 特異的に PE が膜表層へと現れることを見出した (図 3)。この配向性変化は一過的であり、終期において表層に現れた PE は、分裂終了時に内層へと再び移動した。

そこで、表層に出てきた PE を PE 結合ペプチドによりトラップしたときに何が起きるのかを検討した。分裂中期に同調した細胞に PE ペプチドを添加して培養を続けると、約 80% の細胞が最終期で分裂を停止した (図 4)。このとき、多くの細胞において、二つの娘細胞の間に橋のような構造物が形成されることから、分裂の最終過程が特異的に阻害されていると考えられた。実際、電子顕微鏡により PE 結合ペプチド処理細胞を観察すると、核を含むすべてのオルガネラや微小管の分配・再構成は異常なく行われていた。これに対して、顕著な異常が観察されたのはアクチン線維の分布である^{12,14)}。アクチン線維は、細胞分裂期になると細胞中央部に濃縮して収縮環 (contractile ring) を形成し、分裂溝の収縮に伴って徐々に脱重合するが、分裂

停止した細胞ではブリッジ部分に濃縮したまま残存していた。このときアクチン線維とともに収縮環を形成するミオシンや、収縮環を形質膜につなぎとめる ERM (ezrin/radixin/moesin) タンパク質も残存していることから、収縮環の脱重合過程が阻害されていると考えられた。

PE 結合ペプチドによる分裂阻害は可逆的であり、分裂を停止した細胞に過剰量の PE リポソームを添加すると、膜上に結合した PE 結合ペプチドが解離し、同時に収縮環の脱重合が誘導された¹⁴⁾。この結果は、PE 結合ペプチドが膜表層 PE に結合することが、収縮環の脱重合を阻害していることを強く示唆しており、分裂溝膜の PE の配向性変化は、アクチン線維の脱重合制御に関与するものと考えられた。

6. PE は細胞分裂に必須である

PE の配向性変化と細胞骨格との機能関連を、細胞遺伝学的アプローチを用いて検証した。細胞表層への PE 輸送に異常をもつ CHO 変異細胞株の樹立である。放射標識した PE 結合ペプチドの膜結合量を指標として、変異剤処理した CHO 細胞 20 万株を 2 年がかりでスクリーニングし、形質膜表層の PE 量が通常の約 25% まで低下した変異株 R-41 の樹立に成功した¹⁵⁾。変異株のリン脂質組成を親株と比較すると、PE のみが親株の約 50% 程度まで低下していたが、PS を含む他のリン脂質には大きな違いが見られなかった。紙面の都合上、詳細は省くが、R-41 株は形質膜表層へ PE を供給する主要合成経路に異常があるために、全体量に比べて表層の PE 量に顕著な低下が見られると考えられた¹⁶⁾。

R-41 株を制限培地中で培養すると、細胞分裂終期において分裂を停止した。この細胞を詳しく調べると、収縮環が分裂溝に重合した状態で残存していた。これに対して、微小管や核膜の再構成は完了しており、G₁ 期の形態をとっていた。つまり、細胞膜の PE 量を特異的に減少させることにより、PE 結合ペプチドで形質膜表層に現れた PE をトラップしたときと全く同じ現象が観察されたのである。

R-41 株の特徴は、PE の前駆体であるリゾ PE もしくはエタノールアミンを外部から加えることにより、細胞膜表層の PE 量を回復させることができる点である¹⁴⁾。実際に、外部よりリゾ PE もしくはエタノールアミンを添加すると、細胞骨格系の異常はすべて回復することがわかった。以上の結果は、細胞膜の PE が細胞分裂の制御に関与しており、PE 結合ペプチドで得られた結果と考え合わせると、形質膜表層における恒常的な PE 濃度の低下が分裂期に見られる細胞骨格異常の主たる原因であると考えられた。

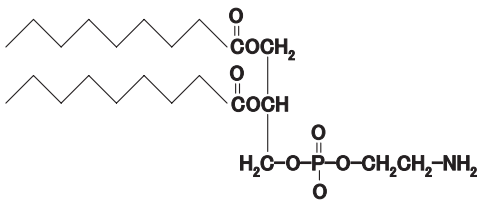
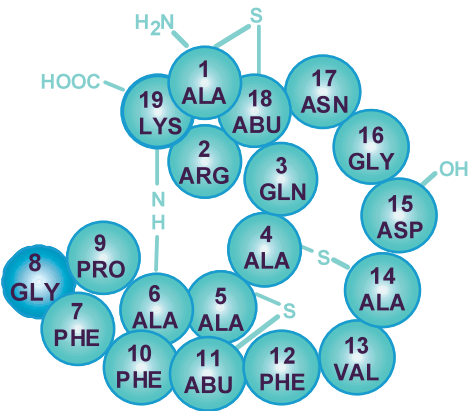


図 2 PE 特異的結合ペプチドの構造
PE 特異的結合ペプチド (左) と PE (右) との結合には, PE のアミノ基, リン酸基, アミノ基とリン酸基の間の距離, 脂肪酸部分のすべてが要求される.

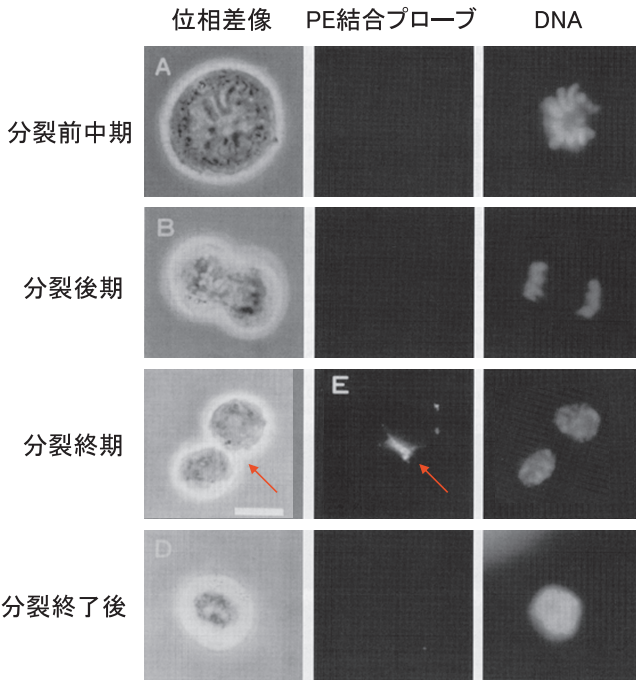


図 3 細胞分裂期における形質膜 PE の分布変化
蛍光標識した PE 結合ペプチドにより, 形質膜表層の PE 分布を追跡した. 強いシグナルは終期細胞の分裂溝のみに見られる (矢印). 文献 12) より改変.

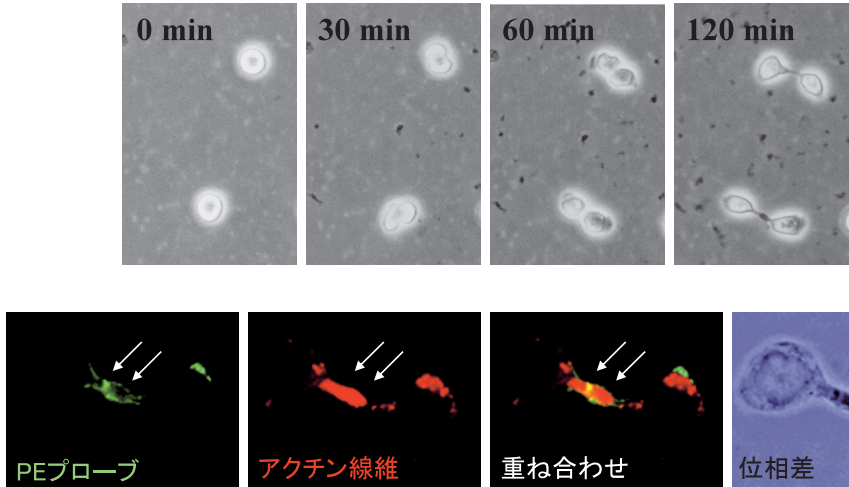


図 4 PE 結合プローブによる細胞質分裂の阻害
分裂前中期に同調した CHO 細胞に PE 結合プローブを添加し, 更に 2 時間インキュベーションを行った (上図). その結果, 二つの娘細胞間に橋状の構造物が形成された. PE 結合プローブは, 主としてブリッジ構造の膜上に結合しており, その膜直下にアクチン線維が分布している (下図). 文献 15) より改変.

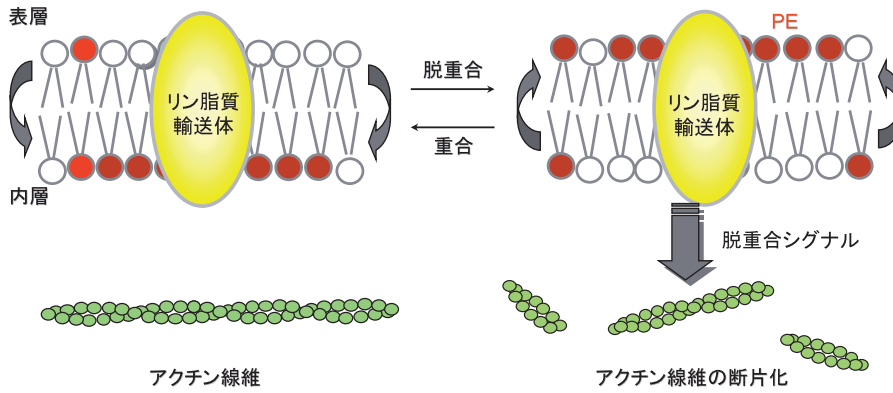


図5 PEの膜配向性変化によるアクチン線維制御のモデル図

赤丸がPE, 白丸は他のリン脂質分子を示す。形質膜直下に重合したアクチン線維(左図)は, PEが内層から表層へとフリップフロップすることにより脱重合に向かう(右図)。一方, 表層に現れたPEが内層に移行すると, アクチン線維が再びその局所に重合可能となる(左図)。その結果, PEが膜配向性を変化させることにより, 局所的なアクチン線維の重合・脱重合を可逆的に制御できる。

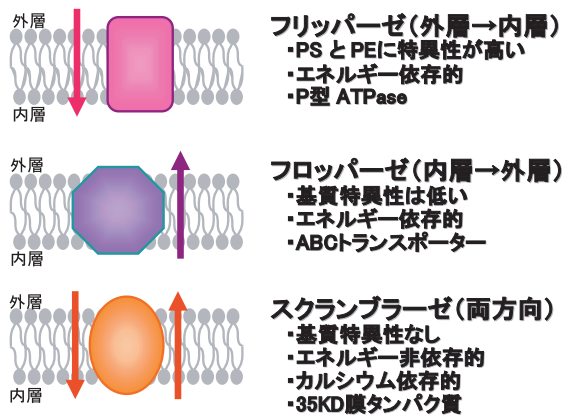


図6 リン脂質のフリップフロップ運動を制御する分子群

赤丸がPE, 水色は他のリン脂質分子を示す。形質膜直下に重合したアクチン線維(左図)は, PEが内層から外層へとフリップフロップすることにより脱重合に向かう(右図)。一方, 外層に現れたPEが内層に移行すると, アクチン線維が再びその局所に重合可能となる(左図)。その結果, PEが膜配向性を変化させることにより, 局所的なアクチン線維の重合・脱重合を可逆的に制御できる。

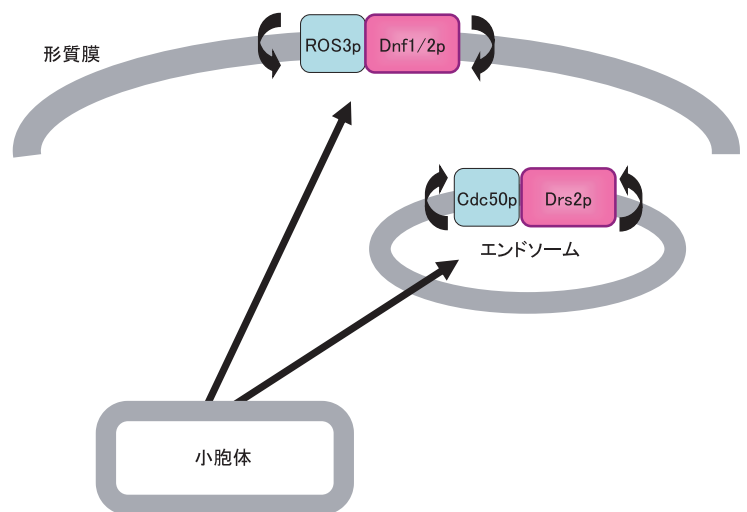


図7 ROS3/Cdc50ファミリーはP型ATPaseの膜輸送を制御する。ROS3pとCdc50pは, それぞれ異なるP型ATPaseと複合体を形成し, 小胞体から各コンパートメントへの輸送およびリン脂質フリッパーゼ活性を制御する。

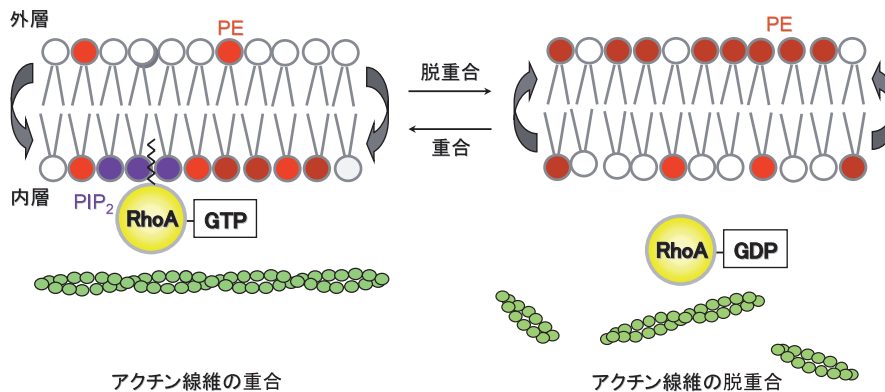


図8 PEの膜配向性変化は低分子量Gタンパク質Rhoの活性および局在調節を介してアクチン線維の再編を制御する

赤はPE, 青はPIP₂, 白は他のリン脂質分子を示す。Rhoが形質膜直下に移行・活性化することにより局所におけるアクチン線維の重合が促進される(左図)。このとき, PIP5キナーゼの活性化を介してPIP₂の産生も起きる。PEが内層から外層へとフリップフロップすると, Rhoが膜から離脱および不活性化することにより, アクチン線維の脱重合が進行する。

7. PEの膜配向性変化と細胞骨格制御

PEの膜配向性変化は、細胞のラッフル膜やニューロンの進展先端膜のように、膜とアクチン線維の再編が活発に行われる局所において頻繁に観察される¹⁷⁾。また動物細胞のみならず、酵母においても一過のかつ局所的なPEの表層移行が報告されている¹⁸⁾。出芽酵母では、G₁/S期には出芽端(bud tip)、分裂期には分裂溝においてPEが表層に現れる。分裂酵母においても同様に分裂溝膜においてPEが表層に現れる。これらPEが形質膜表層に現れる場所は、いずれの細胞においてもアクチン骨格がダイナミックな再編を行う局所と近似している。

活発に運動しているCHO細胞にPE結合ペプチドを添加すると、急激な形態変化、運動性低下とともにアクチン線維が形質膜直下に濃縮する¹⁷⁾。この現象もまた可逆的であり、膜上のPE結合ペプチドを取り除くと、数十分以内に形態や運動能が回復する。また、R-41株の形態もCHO細胞と比較すると異常(球状もしくは紡錘状)であり、この形態異常はPE前駆体の添加により完全にレスキューされる。いずれの条件下においても、アクチン線維が膜直下に過重合するが、ペプチド除去もしくはPE前駆体の添加により消失する。従って、PEの膜配向性変化によるアクチン骨格制御は、細胞分裂に特化したシステムというよりも、むしろ局所的なアクチン再編全般を担う普遍的なシステムであると考えられる。

以下に私達が想定しているモデルを示す(図5)。変異体を用いた解析から、少なくともPEが膜局所における細胞骨格の制御に関与することはほぼ間違いない。その制御様式としては、PE結合プローブを用いた解析から、PEの膜配向性変化が重要であると考えられる¹⁹⁾。まずPEが表層へと移行すると、その膜直下に重合したアクチン線維は脱重合へと向かう。このとき、表層のPEをトラップすると、表層のPE濃度が十分に上昇できない(ペプチドが結合したPEは物理化学的性質が大きく変化するので、PEとして機能できないと仮定する)。また、R-41株の場合には、形質膜全体のPE量低下により表層のPE濃度が恒常的に低下するために、局所的な細胞骨格制御に異常が生じるのではないだろうか。

一度表層に現れたPEが内層に戻って表層のPE濃度が低下すると、再びアクチン線維が重合可能となる。つまり、PEが膜配向性を変化させることにより局所的なアクチン線維の重合・脱重合を可逆的に制御できるシステムが想定される。この作動モデルを検証するためには、まず二つの分子基盤、すなわち①PEのフリップ・フロップ運動を制御するメカニズム、②PEの配向性変化を感知して細胞骨格制御を行う“膜-細胞骨格クロストーク機構”を明らかにしなければならない。

8. PEのフリップ・フロップ運動を制御する分子機構

すでに述べたように、リン脂質がフリップ・フロップ運動を行うためには、親水性の極性頭部が疎水膜を通過する必要がある、大きなエネルギーが必要となる。また、フリップ・フロップ運動には親水基の特異性(PS>PE>>PC)が見られることから、形質膜上には基質特異性や輸送方向の異なるリン脂質輸送体が複数存在すると考えられていた(図6)。しかし、実際にPEの膜配向性を制御する分子の実体に関しては、ほとんど情報がなかった。

そこで私達は、PE結合ペプチドの細胞膜障害性を利用して、形質膜表層のPE動態に異常を有する酵母変異株の樹立および原因遺伝子の単離を試みた。変異剤処理した細胞約1万株についてスクリーニングを行い、野生株と比べると優位に高い感受性を示す変異株を24個取得した。その中で最も強い感受性を示す変異株ROS3(Ro-sensitive3)の原因遺伝子を同定したところ、機能未知の2回膜貫通型タンパク質をコードしていた²⁰⁾。蛍光標識したリン脂質アナログを用いて、各種リン脂質の輸送特異性を検討したところ、ROS3遺伝子を変異的に破壊した株では、PEの形質膜外層から内層への輸送が著しく低下していた。これに対して、エンドサイトーシスによる脂溶性物質の取り込みには全く異常が見られないことから、ROS3は形質膜においてPEのフリップ・フリップ運動を制御する分子であることが示された。

酵母ゲノム上にはROS3と高い相同性を示す遺伝子が他に2個存在する。そのうちCdc50遺伝子は、その名の通り、低温感受性の細胞周期変異株として分離されたが、コードするタンパク質の機能は全く不明だった。近年、ROS3とDnf1/Dnf2、Cdc50とDnf3/Drs2がそれぞれ複合体を形成すること、更には、その複合体形成がDnf1/Dnf2の形質膜、Dnf3/Drs2のエンドソームへの輸送に必須であることが明らかになった²¹⁾。Dnf1-3とDrs2は、タイプIV液胞型ATPaseファミリーに属する9回膜貫通型タンパク質であり、近年、アミノリン脂質を形質膜外層から内層へと移動させるフリッパーゼ(flippase)として機能することが報告された^{22~24)}。これらの情報を総合すると、ROS3ファミリーは、各々が特定のP型ATPaseをパートナーとし、その細胞内局在を制御することにより、リン脂質の膜動態を制御していることが強く示唆されたのである(図7)。

ROS3欠損株では、アクチンパッチ形成不全等の細胞骨格制御異常が認められた。逆に、ROS3遺伝子を高発現させると、一つの細胞から複数の出芽が観察された。これらの結果は、ROS3分子が局所的なPEの膜配向性を変化させることでアクチン線維の再構築を制御している可能性を

示唆している。

ROS3/Cdc50 ファミリーは、ショウジョウバエやヒトなど多細胞動物にも高い相同性を有するホモログが存在するが、調べた限りではショウジョウバエやヒトのゲノム上には単一遺伝子しか存在しない。進化に伴いゲノム上の遺伝子がコピー数を増幅させる現象は比較的頻繁に見られるが、逆に複数のファミリー遺伝子が脱落して単一遺伝子に収束する現象は稀であり、そのメカニズムも含め興味深い事例である。

マウス ROS3 はすべての組織に発現が認められるが、脳、肝臓、腎臓において特に高い。これら組織における ROS3 機能の解明は今後の課題であるが、局所的なアクチン骨格の再編を介してニューロンや上皮細胞などの細胞極性の制御に関与しているのかもしれない。

9. 膜と細胞骨格のクロストーク機構

PE の配向性変化が、細胞骨格の局所的再編において機能することは明確になってきた。次なる問題は「形質膜上における脂質分子の動きが、如何にしてアクチン骨格の再構成を促すのか？」というポイントである。私達は、細胞を PE 結合ペプチドで処理した際に、アクチン線維とともに膜直下へと蓄積する分子群の同定を行い、低分子量 G タンパク質 RhoA がアクチン線維とともに局在することを見出した²⁵⁾。glutathione S-transferase (GST) pull-down 法を用いて、活性型 (GTP 結合型) RhoA の細胞内変動を追跡したところ、PE 結合ペプチド処理後に活性型 RhoA が著しく増加した。更に、PE 結合プローブを膜表層から取り除くと、RhoA は速やかに活性型から不活性型 (GDP 結合型) へと変換され、RhoA とアクチン線維はともに膜直下から離脱した。従って、PE の配向性変化は、RhoA の膜移行および活性化を介してアクチン線維の再編を制御していると考えられた (図 8)。

RhoA は、様々な下流分子 (エフェクター分子) を使い分けることにより、細胞局所におけるアクチン線維の再編を誘導することが知られている²⁶⁾。私達は、既知の RhoA エフェクター分子群について網羅的な検討を行い、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) 主要合成酵素である PIP5 キナーゼが、PE 結合ペプチド処理の際に RhoA と挙動を共にすることを見出した²⁵⁾。さらに、分裂期の細胞では RhoA 依存的に PIP5 キナーゼが分裂溝に集積し PIP₂ を産生すること、その局所的な PIP₂ 産生が細胞分裂遂行に必須であることを示した。これらの情報を併せると、以下のような作動モデルを提示することができる (図 8)。

分裂後期になると、RhoA が分裂溝膜へと移行し、Rho キナーゼや mDia といった下流エフェクター分子群の活性化を介して収縮環の形成および収縮を誘導する。同時に

RhoA は、PIP5 キナーゼを分裂溝膜近辺にリクルートおよび活性化し、分裂溝膜直下で PIP₂ の産生を促す。このとき産生された PIP₂ は、アニリン (anillin) 等の PIP₂ 結合タンパク質をリクルートし、収縮環の維持・収縮を正に制御する。一方で、Rho を活性化させる GTP 変換因子 (GEF: GTP exchange factor) は PH ドメインをもち、PIP₂ による活性促進を受けることから、PIP₂ は Rho シグナルに正のフィードバック・ループを生み出すと考えられる。分裂終期になると、分裂溝部分で PE の配向性変化が起こり、RhoA が膜から離脱・不活性化することにより、収縮環の消失を誘起する。

PE の配向性変化が、RhoA の不活性化を誘導するメカニズムは今後の課題であるが、直接 RhoA の膜親和性を制御している可能性が考えられる。RhoA を含む低分子量 G タンパク質は、プレニル化やパルミチン酸化などの脂質修飾を受けており、膜との相互作用に必須である。この脂質修飾を介する G タンパク質と膜との親和性は、脂質成分を含む膜環境に大きく依存すると予想されている^{27, 28)}。局所において PE の膜配向性変化が変化すると、周辺の膜環境が一変することは想像に難くない。実際 PE のように極性頭部の小さい脂質分子が膜局所に集積すると、ヘキサゴナルと呼ばれる特別な膜構造をとることから、PE の配向性変化は、局所において膜構造を変化させることにより RhoA の膜親和性を制御しているのかもしれない。

最近、酵母細胞においては、PE の膜配向性変化が GTP 加水分解促進因子 (GAP: GTPase-activating protein) の活性調節を介して Rho ファミリー GTPase の一つである Cdc42 活性を負に制御することが報告された²⁹⁾。興味深いことに、*in vitro* 条件下において、GAP 活性は PS と PE により促進され、逆に PIP₂ で阻害を受ける。従って、PE の膜配向性変化は、局所的な GEF や GAP の活性調節を介して Rho GTPase ファミリーを制御している可能性も考えられる。

10. お わ り に

脂質非対称構造の新たな生理的意義を発見し、更に、リン脂質のフリップ・フロップ運動を規定する新たな分子メカニズムを明らかにした。一方で以下に述べるように、未解決の問題や、本研究から新たに出てきた疑問が山積している。

まず、リン脂質の非対称分布を形成・維持する主要メカニズムについて未だ決着がついていない。フリッパーゼの基質特異性は、生体膜リン脂質の非対称分布を説明するために都合がよいことから、この分子がリン脂質の配向性を制御する分子機構の本体であると考えられてきた。近年、形質膜外層から内層への PS 輸送が野生株の 1/3 程度まで低下した変異細胞株が複数樹立されているが、意外なこと

に、いずれの変異株においてもリン脂質分布に明らかな変化は見られない^{30,31)}。この結果は、膜リン脂質の非対称構造形成・維持におけるフリッパーゼの寄与は予想よりも小さく、むしろ限られた局所・局面でリン脂質分布を変化させることにより、エンドサイトーシスや小胞輸送を活性化させる働きが主であることを示唆するのかもしれない³²⁾。

ごく最近、二つの異なるグループから、線虫のP型ATPaseであるTAT1をノックダウンさせると細胞表面のPS量が変化することが報告されたが、Hengartnerらが「TAT1はPSが外層に現れるために必要」と結論付けているのに対して、Xueらは「TAT1はPSを内層にとどめるために必要」と主張し、真っ向から対立している^{33,34)}。P型ATPaseの輸送方向および基質特異性を考慮すると、Xueらの主張のほうが受け入れ易いが、最終的な結論は今後の研究を待たなくてはならない。

第2点として脂質ドメインの問題を挙げる。分裂細胞において、PEは分裂溝膜において局所的に表層に出現する。過去の解析から、脂質分子は $0.3\sim 2.0\times 10^9\text{cm}^2/\text{sec}$ という高速で膜面を側方運動するとされており、例えばPEが局所でフリップ・フロップしたとしても、その後瞬時にして拡散すると考えられる。従って、特定の脂質が局在するドメインが成立するためには、リン脂質の自由拡散を制限し得るバリア機構の存在が不可欠となる。実際、分裂溝付近には、脂質の往来を制限できる構造物の存在が示唆されている³⁵⁾。これまでにタイトジャンクション (tight junction)³⁶⁾や軸索丘 (axon hillock: initial segment とも呼ばれる)^{37,38)}にも“脂質バリア”の存在が報告されており、今後、詳細な分子基盤を明らかにしていく必要がある。

最後に今後の課題として、個体レベルにおける脂質ダイナミクスの意義を挙げる。本稿で紹介した脂質による細胞骨格制御システムの存在意義は、脂質が局所でフリップ・フロップ運動を行うことにより、膜構造と細胞骨格構造の再編を同時に誘起できる点に尽きる。これにより、膜と細胞骨格は時空間的に連動することが可能となり、効率的な形態形成や細胞運動を促進しているのではないだろうか。従って、ニューロンや上皮細胞などの複雑かつダイナミックな形態形成を行う細胞の膜局所において、脂質膜配向性変化を介した細胞骨格制御システムが機能している可能性は十分に考えられる。実際マウスROS3分子は、脳、肝臓、腎臓など極性臓器に強く発現していることから、本分子の解析は、組織形成における脂質ダイナミクスの意義を理解するためのエントリー・ポイントとなるかもしれない。筆者は現在、ショウジョウバエ脳神経系をモデルとして、脂質分子のダイナミクスの可視化、および脂質ダイナミクスによる形態形成制御の問題に取り組んでいる³⁹⁾。これまでに培われてきた脂質の生化学的研究基盤に加えて、イメージングや遺伝学的解析を積極的に導入することによ

り、少しでも脂質の生物学的意義を個体レベルで理解することができればと考えている。

謝辞

本研究は、東京都臨床医学総合研究所・炎症研究部門の梅田真郷室長（現・京都大学化学研究所）の元で行われました。筆者が学部生の頃から長年にわたり根気強くご指導頂きました梅田真郷室長に深く感謝致します。本研究を開始するにあたり、直接ご指導頂いた小林俊秀博士（現・理化学研究所）に感謝致します。貴重なご助言を頂いた炎症研究部門のメンバー全員、一緒に実験を行ってくれた加藤詩子博士、白水秀枝修士に感謝致します。CHO変異株の樹立・性状解析についてご指導頂きました国立感染症研究所・細胞化学部の西島正弘部長（現・国立医薬品食品研究所）、久下理室長（現・九州大学）に感謝致します。酵母変異株の単離および原因遺伝子の同定についてご指導頂きました東京大学農学系大学院の太田明德教授に感謝致します。細胞骨格制御の研究を進めるにあたって多大なご助言を頂きました京都大学医学系大学院の成宮周教授に感謝致します。最後に、学部から大学院までご指導頂き、研究の厳しさ・楽しさを教えて頂きました東京大学薬学系大学院の井上圭三教授（現・帝京大学）に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Singer, S.J. & Nicolson, G.L. (1972) *Science*, **175**, 720-731.
- 2) Zachowski, A. (1993) *Biochem. J.*, **294**, 1-41.
- 3) Lands, W.E. (1958) *J. Biol. Chem.*, **231**, 883-888.
- 4) Lee, H.C., Inoue, T., Imae, R., Kono, N., Shirai, S., Matsuda, S., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., & Arai, H. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 1174-1184.
- 5) Hishikawa, D., Shindou, H., Kobayashi, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., & Shimizu, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2830-2835.
- 6) Bosman, G.J., Willekens, F.L., & Werre, J.M. (2005) *Cell Physiol. Biochem.*, **16**, 1-8.
- 7) Lentz, B.R. (2003) *Prog. Lipid Res.*, **42**, 423-438.
- 8) Wu, Y., Tibrewal, N., & Birge, R.B. (2006) *Trends Cell Biol.*, **16**, 189-197.
- 9) Aoki, Y., Uenaka, T., Aoki, J., Umeda, M., & Inoue, K. (1994) *J. Biochem.*, **116**, 291-297.
- 10) Choung, S.Y., Kobayashi, T., Takemoto, K., Ishitsuka, H., & Inoue, K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **940**, 180-187.
- 11) Wakamatsu, T., Choung, S.-Y., Kobayashi, T., Inoue, K., Higashijima, T., & Miyazawa, T. (1990) *Biochemistry*, **29**, 113-118.
- 12) Emoto, K., Kobayashi, T., Yamaji, A., Aizawa, H., Yahara, I., Inoue, K., & Umeda, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12867-12872.
- 13) Emoto, K., Toyama-Sorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K., & Umeda, M. (1997) *Exp. Cell Res.*, **232**, 430-434.
- 14) Emoto, K., Kuge, O., Nishijima, M., & Umeda, M. (1999)

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12400–12405.
- 15) Emoto, K. & Umeda, M. (2000) *J. Cell Biol.*, **149**, 1215–1224.
- 16) 榎本和生, 加藤詩子, 梅田真郷 (1999) 蛋白質核酸酵素, **44**, 1173–1180.
- 17) Umeda, M. & Emoto, K. (1999) *Chem. Phys. Lipids*, **101**, 81–91.
- 18) Iwamoto, K., Kobayashi, S., Fukuda, R., Umeda, M., Kobayashi, T., & Ohta, A. (2004) *Genes Cells*, **9**, 891–903.
- 19) Emoto, K. & Umeda, M. (2002) *Cell Struct. Funct.*, **26**, 569–575.
- 20) Kato, U., Emoto, K., Fredriksson, C., Nakamura, H., Ohta, A., Kobayashi, T., Murakami-Murobushi, K., Kobayashi, T., & Umeda, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 37855–37862.
- 21) Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M., & Tanaka, K. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3418–3432.
- 22) Paulusma, C.C. & Oude Elferink, R.P. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1741**, 11–24.
- 23) Devaux, P.F., López-Montero, I., & Bryde, S. (2006) *Chem. Phys. Lipids*, **141**, 119–132.
- 24) Daleke, D.L. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 821–825.
- 25) Emoto, K., Inadome, H., Kanaho, Y., Narumiya, S., & Umeda, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 37901–37907.
- 26) Narumiya, S. (2003) *J. Biochem.*, **134**, 305–307.
- 27) Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G., & Hancock, J.F. (2001) *Nature Cell Biol.*, **3**, 368–375.
- 28) Niv, H., Gutman, O., Kloog, Y., & Henis, Y.I. (2002) *J. Cell Biol.*, **157**, 865–872.
- 29) Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Hanamatsu, H., Kato, U., Umeda, M., Kozminski, K.G., & Tanaka, K. (2007) *Dev. Cell*, **13**, 743–751.
- 30) Endo, T.A., Kobayashi, T., & Ohki, K. (1996) *Exp. Cell Res.*, **228**, 341–346.
- 31) Hanada, K. & Pagano, R.E. (1995) *J. Cell Biol.*, **128**, 793–804.
- 32) Darland-Ransom, M., Wang, X., Sun, C.L., Mapes, J., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., & Xue, D. (2008) *Science*, **320**, 528–531.
- 33) Devaux, P.F., Herrmann, A., Ohlwein, N., & Kozlov, M.M. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1591–1600.
- 34) Züllig, S., Neukomm, L.J., Jovanovic, M., Charette, S.J., Lysenko, N.N., Halleck, M.S., Reutelingsperger, C.P., Schlegel, R.A., & Hengartner, M.O. (2007) *Curr. Biol.*, **17**, 994–999.
- 35) Tetteroo, P.A.T., Bluemink, J.G., Dictus, W.J.A.G., vanZoelen, E.J.J., & deLaat, S.W. (1984) *Dev. Biol.*, **104**, 210–218.
- 36) van Meer, G. & Simons, K. (1986) *EMBO J.*, **5**, 1455–1464.
- 37) Kobayashi, T., Storrie, B., Simons, K., & Dotti, C.G. (1992) *Nature*, **359**, 647–650.
- 38) Nakada, C., Ritchie, K., Oba, Y., Nakamura, M., Hotta, Y., Iino, R., Kasai, R.S., Yamaguchi, K., Fujiwara, T., & Kusumi, A. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 626–632.
- 39) 榎本和生 (2007) 蛋白質核酸酵素, **52**, 842–852.
-