

長期間派遣成果報告書

タイトル	インスリンシグナリングにおけるラフト動態の解析 Analysis of raft dynamics during the insulin signaling
所属・氏名	ジュネーブ大学 生化学学科 梅林 美和 Department of biochemistry, University of Geneva, Miwa UMEBAYASHI
派遣期間	2009年5月1日～2013年3月31日 May 1, 2009 – March 31, 2013
研究機関	Department of biochemistry, University of Geneva 30 quai Ernest-Ansermet, 1211, Geneva, Switzerland
研究指導者	Prof. Howard Riezman

Cellular membranes are composed of numerous different lipids and proteins, and aren't always homogeneous. Certain sets of lipids and proteins can be preferentially associated and form distinct membrane domains. Sterols, sphingolipids and specific proteins are thought to be assembled into microdomains, called rafts. It has been considered that rafts act as platforms for signal transduction, membrane traffic and so on. Due to the association between sterols and sphingolipids, rafts can be highly ordered and segregated from liquid-disordered domains.

To investigate protein-raft interactions, a biochemical approach based on detergent insolubility has been used extensively in the past, but seems to be unreliable. Attempts have also been made to visualize lipids and proteins in microdomains *in vivo*, but the lipid environment and the protein haven't been visualized together. For challenging this issue, we have developed a method to observe the local membrane environment surrounding a membrane protein.

In principle our technique covalently links a membrane environment-sensitive fluorescent dye via a linker of variable length to a membrane protein using the SNAP-tag. For this purpose, the insulin receptor was tagged with SNAP and then

labeled with an environment sensitive dye. We have succeeded in monitoring the membrane environment surrounding the insulin receptor.

生体膜は数千種類もの脂質で構成されており、それらの脂質は生体膜で均一に分布するのではなく、ある機能を持った特定の脂質の集合体が存在すると考えられている。脂質ラフトはコレステロールとスフィンゴ脂質に富む生体膜上のドメインで、シグナル伝達やタンパク質の選別、小胞輸送などが起こるプラットフォームとして機能するとされている。ラフトを構成するスフィンゴ脂質の多くは飽和炭化水素鎖を有し、コレステロールはスフィンゴ脂質と親和性が強いため、スフィンゴ脂質とコレステロールは秩序液晶相をとる。そのため、ラフトは生体膜の主要構成成分であるグリセロリン脂質の液晶相とは分離した膜を形成する。

ラフトはそのサイズやライフタイムをシグナルに応じて、機敏に変化させると考えられているが、シグナル伝達時における受容体周辺のラフト動態、膜の環境、極性がどのように変化するかは明らかとされていない。その原因として、特定の受容体周辺の膜の環境のみを観察する方法が無いことが挙げられる。

この問題を解決するために、私は特定の膜タンパク質、受容体の周囲の膜環境のみを観察する系を確立して、シグナル伝達時における受容体周辺のラフトの動態、膜の環境・極性の変化を解明することに取り組んでいる。

ラフトを可視化するのに有用なプローブとして、Laurdan やその派生体 C-Laurdan、PRODAN、Nile red などの環境感受性の蛍光プローブ (environment-sensitive dye) が用いられている。これらのプローブは蛍光部分に大きな励起ダイポールモーメントを有しており、周囲の極性に応じて蛍光をシフトさせる。水などの高極性溶媒中では environment-sensitive dye は高波長シフトを示し、低極性溶媒中では短波長にシフトする。ラフトの秩序液晶相では、脂質分子が密に凝集しているため、膜間の水分量が液晶相に比べて少ない。そのため、environment-sensitive dye は秩序液晶相では短波長シフトを示し、液晶相では高波長シフトを示す。environment-sensitive dye による膜の極性度は、短波長と高波長の 2 チャンネルの蛍光強度の比として示される。

脂肪細胞において、インスリンシグナリングには PI3 キナーゼ依存的な経路とラフト/カベオラ依存的な経路の 2 つの独立した異なる経路があることが示されている。脂肪細胞以外の細胞や、脂肪細胞に分化する前の前駆細胞は PI3 キナーゼ依存的な経路のみを使用している。近年、ラフト/カベオラ依存的な経路に欠損があるとインスリン抵抗性を示すことがモデルマウスを使った研究などで明らかとされている。また、特定の脂質とインスリン受容体が結合することで、インスリンシグナリングが阻害されることも示されている。

インスリン受容体周辺の膜環境のみを観察するため、インスリン受容体を environment-sensitive dye で直接ラベルをして、受容体周辺の膜環境のみを観察する系を確立することを試みた。受容体と environment-sensitive dye のラベリングには、SNAP タグを用いた。SNAP タグはローザンヌ工科大学の Kai Johnsson のグループにより開発された 20 kDa の酵素タグで、benzylguanine (BG) 誘導体と特異的に共有結合する。

## SNAPタグ融合インスリン受容体の構築

インスリン受容体は2組の $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットからなるヘテロ4量体だが、1組の $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットを含むポリペプチドとして生合成され、翻訳後のプロセッシングの過程において、2つのポリペプチドが会合してホモ2量体となり、最後に $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの間が切断され、ヘテロ4量体となる。Environment-sensitive dye との直接ラベリングのため、ヒトインスリン受容体の細胞外ドメインの $\alpha$ サブユニット2か所と、細胞内の $\beta$ サブユニットのC末端の位置が異なる部位にSNAPタグを融合した3種類のインスリン受容体のプラスミドを構築した。また、タグ無し、あるいはSNAPタグ融合ヒトインスリン受容体を恒常的に発現するCHO細胞を確立した。

SNAPタグ融合インスリン受容体が活性を有することを示すため、インスリン処理後のインスリン受容体とinsulin receptor substrate-1 (IRS-1) のチロシンリン酸化を調べた。いずれのSNAPタグ融合インスリン受容体発現CHO細胞において、インスリン受容体とIRS-1のチロシンリン酸化が認められた。また、SNAPタグの蛍光基質であるAlexa488-BGでラベルしたインスリン受容体が、インスリン処理後にエンドサイトーシスされることも観察した。これより、SNAPタグ融合インスリン受容体がインスリンシグナリングにおいて活性を有することが確認された。

## BG-PEG-Nile redの合成

SNAPタグ融合インスリン受容体周囲のラフト、膜環境を観察するため、BG基を付加したenvironment-sensitive dyeの合成を試みた。まず初めに、*in vitro*と*in vivo*の両方において広く使われているC-Laurdanを用いた。しかし、C-Laurdanは蛍光部分に加えてアシル鎖を有しており、細胞形質膜、及び細胞内の膜を非特異的に染めるため、SNAPタグ融合インスリン受容体を特異的にラベルするには不適であった。そこで、続いてNile redを試した。Nile redは脂肪滴の染色に広く用いられているが、蛍光部に励起ダイポールモーメントを有し、environment-sensitive dyeとしての性質も持つ。しかし、Nile redは疎水性が高いため、素早く細胞形質膜を通過して、細胞内の脂肪滴に蓄積する。細胞形質膜に局在するSNAP融合インスリン受容体を特異的に染色するために、Nile redの親水性を上げることにした。BG基に加えて、親水性のPEGリンカーをBG基とNile redの間に加えた(図1: BG-PEG11-Nile redの構造)。BG基を付加したenvironment-sensitive dyeの合成はローザンヌ工科大学のKai Johnsson研究室のLuc Reymond博士にお願いした。

タグ無し、細胞外あるいは細胞内にSNAPタグを有するインスリン受容体発現CHO細胞を、BG-PEG11-Nile redと核染色剤のDAPIで2重染色を行った。その結果、全ての細胞がDAPIで染色されたのに対して、細胞外にSNAPタグを有するインスリン受容体を発現している細胞のみにおいて、BG-PEG11-Nile redでの細胞形質膜の染色が観察された(図2)。BG-PEG11-Nile redは親水性が高いため、細胞形質膜を通過出来ずに培養液中に留まり、インスリン受容体の細胞外SNAPタグとBGが反応して共有結合を形成した後に、Nile redが細胞形質膜に局在するようになると考えられる。

## SNAP融合インスリン受容体に共有結合したBG-PEG-Nile redの評価

SNAP融合インスリン受容体と共有結合したBG-PEG-Nile redが膜の極性変化を認識する能力を持つことを確認するため、細胞内のコレステロール量を増減させた後にBG-PEG-Nile redの蛍光スペクトルがどのように変化するかを測定した。その結果、SNAP融合インスリン受容体に共有結合したBG-PEG-Nile redはコレステロールの増加後に短波長シフトを示し、膜の極性変化を感知出来ることが確認された。

## 結論と今後の展望

細胞外にSNAPタグを有するインスリン受容体を発現する細胞と、細胞外SNAPタグを特異的に染色するBG-PEG-Nile redを構築して、インスリン受容体の周辺の膜環境のみを観察することに成功した。現在、生細胞においてインスリンシグナリング時に、インスリン受容体周辺の膜環境、ラフト動態がどのように変化するかを観察している。

本研究によって、シグナリング発生時に受容体が実際にラフトに会合するのか、シグナリング時にラフト様のドメインが観察されるのか？という、長年のラフト仮説の争点ともなっていた事象を解明できるのではないかと考えている。また、本研究はインスリン抵抗性とラフト・カベオラ、脂質の代謝異常などの関わりを解析するのにも役立つものと期待している。

