

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15079

研究課題名(和文)新規の活性化機序のリン脂質スクランブラーゼの同定と機能解析

研究課題名(英文)Identification and characterisation of a new phospholipid scramblase

研究代表者

藤井 俊裕 (Fujii, Toshihiro)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30580104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、3'-0-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphoric acid(BzATP)によるホスファチジルセリン(PS)暴露に働く未知のリン脂質スクランブラーゼ分子の同定と活性化機序を含む機能解析と生理的意味を明らかにすることを目的とした。本研究では、CRISPR-CAS9システムとフローサイトメトリーと次世代シーケンスを用いて分子の同定を試みた。そこでEssential for Reactive Oxygen Species(Eros)を同定し、P2X7と同様に、BzATPによるPS暴露に重要な分子であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATPを介したPS暴露は、ATP駆動イオンチャネルP2X7を介したCa²⁺の細胞内の流入が引き金になっていると考えられてきた。しかしながら、Ca²⁺依存的に働くTMEM16Fが担っており、同時にCa²⁺非依存的な未知のリン脂質スクランブラーゼがあることは明らかだが、今回同定には至らなかった。この分子は分子機序が不明な細胞のPS暴露が関わっている生理的現象、例えば、筋芽細胞の融合や赤血球成熟に於いて排除された核のクリアランス等の現象を解明できるかもしれない。また同定されたEros遺伝子は、炎症性サイトカインIL-1の放出に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify and characterize an unknown phospholipid scramblase molecule that acts on phosphatidylserine (PS) exposure by 3'-0-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphoric acid (BzATP). We tried a genome-wide CRISPR screen for molecules responsible for BzATP-induced PS exposure with flow cytometry for cell sorting and a next-generation sequence. As a result, we identified a transmembrane protein, essential for reactive oxygen species (Eros), as a necessary component for P2X7 expression on the cell membrane and found that it is an important molecule for PS exposure by BzATP, similar to P2X7.

研究分野：分子生物学

キーワード：Eros P2X7 P2XR7 ATP BzATP scramblase phosphatidylserine

1. 研究開始当初の背景

すべての動物細胞の細胞膜は脂質二重層からなるが、細胞膜を構成するリン脂質は外葉と内葉とで非対称的に分布している。しかし生物は様々な生理現象の場面で脂質二重膜の非対称性を破綻させている。破綻した結果、通常脂質二重膜の内葉に局在するホスファチジルセリン(PS)は、外葉へ暴露される。そして、外葉に暴露したPSは、細胞の貪食や筋芽細胞の融合など様々な場面で寄与していることが報告されている。

脂質二重膜の非対称性を破綻させる因子としてこれまでにTMEM16Fが同定されている。この分子はCa²⁺依存的に活性化し、脂質二重膜の様々なリン脂質を内葉から外葉、外葉から内葉の両方向へ移動させる活性、リン脂質スクランブラーゼ活性を持っている。

一方、リポ多糖(LPS)で刺激されたマクロファージは、ATPまたは3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphoric acid(BzATP)刺激により活性化し、細胞内に溜め込んだpro-IL-1をIL-1に成熟させ、さらに細胞外へ放出することが知られている。このとき活性化したマクロファージはPSを細胞表面に暴露させることも報告されている。また、T細胞も同様にATPまたはBzATPによってPSを暴露している。しかしながら、マクロファージやT細胞のPS暴露は、その分子機序も生理的意味も十分に解析されていない。

一般的に、ATPとBzATPによるLPS刺激のマクロファージやT細胞のPS暴露には、ATP駆動イオンチャンネルP2X7分子が関わっていると考えられている。活性化したP2X7はCa²⁺を細胞内へ流入させ、細胞内Ca²⁺濃度の上昇によりCa²⁺依存性リン脂質スクランブラーゼを活性化させ、その結果PSを細胞外へ暴露させていると考えられてきた。

そこで最初に、骨髓細胞由来マクロファージやマクロファージ様細胞株、T細胞株に、BzATPを添加すると、PSが細胞表面に暴露されていることを確認した。さらに細胞内Ca²⁺濃度をFluo4-AMを用いて調べると、細胞内Ca²⁺濃度が上昇していることがわかった。

続いてCa²⁺依存性リン脂質スクランブラーゼTMEM16Fが、これらの細胞のBzATP刺激によるPS暴露に関わっていると考え、TMEM16F欠損マウスからマクロファージを、CRISPR/Cas9システムによりマクロファージ様細胞株、T細胞株のTMEM16F欠損細胞を作成し、用いた。これらのTMEM16F欠損細胞にCa²⁺イオノフォアA23187を加え、Ca²⁺依存性PS暴露を調べた。その結果、TMEM16Fが欠損した細胞はPSを暴露しなかった。以上の結果より、これら細胞のCa²⁺依存性活性化するリン脂質スクランブラーゼは、TMEM16Fのみであることが明らかになった。さらに、TMEM16Fが欠損したこれら細胞にBzATPで刺激を加えた結果、予想に反して細胞表面にPSが暴露していることを見出した。

さらにBzATPによるPS暴露がCa²⁺依存性かどうかを調べるために、細胞内Ca²⁺をBAPTA-AM、細胞外Ca²⁺をEGTAでキレートした状態で、Ca²⁺非依存性PSに結合する分子MFG-E8に蛍光標識したプローブを用いてPS暴露を確認したところ、BzATPで刺激を受けたTMEM16F欠損細胞は、Ca²⁺非存在条件下で、PSを細胞表面に暴露していた。つまり、BzATPによるPS暴露には、Ca²⁺依存性で働くTMEM16FとCa²⁺非依存性で働く分子の2種類が働いていることが示唆された。

次に未知のPS暴露活性を有する分子がリン脂質スクランブラーゼかどうかを確かめるために、蛍光標識されたリン脂質NBD-PCが細胞内に取り込まれるかどうかを調べた。TMEM16F欠損T細胞株にCa²⁺非存在下でBzATPを添加した結果、この細胞はNBD-PCを取り込むことがわかった。これまでの結果から、細胞膜内葉に局在するPSが内葉から外葉へ暴露し、外葉からNBD-PCが内葉へ取り込まれたことより、BzATPで活性化した未知の分子はリン脂質スクランブラーゼ活性を有していることが示唆された。

2. 研究の目的

- A) BzATPによる細胞表面のPS暴露に、これまでの報告で関与していると考えられているイオンチャンネルP2X7受容体を介しているかどうかを明らかにする。
- B) BzATP刺激で活性化するCa²⁺非依存性リン脂質スクランブラーゼを同定する。
- C) 同定した分子の活性化機序を含めた機能的特徴を明らかにする。さらにマウスの組織・細胞での新規分子の発現を解析し、そこから新規分子の生理的役割を明らかにする。

3 . 研究の方法

- A) BzATP を介した PS 暴露は、ATP 駆動イオンチャネル P2X7 遺伝子を介して働いていると言われている。このことを確かめるために、BzATP で PS が暴露することが確認できている T 細胞株 WR19L の P2X7 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムで遺伝子破壊を行った。
- B) WR19L 細胞株に P2X7 遺伝子のアイソフォームである P2X7k を外部から発現させると、BzATP の感受性がより高い細胞を樹立した。この細胞に CRISPR/Cas9 GeCKO ライブラリ(Sanjana NE et al., Nature Methods 2014)を用意し、約 2 万個の遺伝子を標的にして遺伝子破壊を行った。GeCKO ライブラリを導入した細胞から、BzATP 刺激で PS 暴露が減弱した細胞を選択的に FACS Aria を使ってソーティングを繰り返し行った。
- C) セルソーティングで集めた細胞からゲノム DNA を精製し、次世代シーケンサーの MiSeq でゲノム DNA に組み込まれた GeCKO ライブラリを網羅的に解析した。

4 . 研究成果

- A) P2X7 遺伝子を欠損した細胞において BzATP または ATP を介した PS 暴露は消失した。
- B) GeCKO ライブラリを用いて、BzATP または ATP を介した PS 暴露に関わる遺伝子をスクリーニングした結果、Essential for Reactive OxygenSpecies(Eros)を同定した。Eros 遺伝子を欠損させた細胞は、BzATP による PS 暴露が著しく減弱した。さらに LPS と ATP による IL-1 β の放出に Eros 遺伝子が重要であることを示した。続いて Eros は P2X7 分子を細胞膜上に安定発現させているシャペロン様分子として働いていることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryoden Yuta, Fujii Toshihiro, Segawa Katsumori, Nagata Shigekazu	4. 巻 204
2. 論文標題 Functional Expression of the P2X7 ATP Receptor Requires Eros	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 559 ~ 568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------