

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19296

研究課題名（和文）昆虫細胞の変形能を制御する分子群の網羅的同定

研究課題名（英文）Identification of molecules that regulate the deformability of insect cells

研究代表者

梅田 眞郷（Umeda, Masato）

京都大学・工学研究科・名誉教授

研究者番号：10185069

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：キイロショウジョウバエの細胞が、哺乳類の細胞株と比較して膜張力が著しく低く、またすり応力へも高い耐性を示す、極めて粘弾性の高い特異な物理化学的特性を有することを見出した。次に、ショウジョウバエ細胞の形質膜では、リン脂質スクランブラーゼXKRが恒常的に活性化することによりリン脂質の非対称な分布が失われ、膜リン脂質のフリップ・フロップ運動の促進により細胞骨格のダイナミックな再編が誘導されることにより、高い細胞変形能が維持されていることを明らかにした。さらに、ショウジョウバエXKRを哺乳動物細胞に発現した際にも変形能の顕著な増加が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫は地球上で最も多様化を遂げ繁栄している動物種であり、その中には進化過程において極度な小型化を達成した昆虫種も存在する。これらの微小昆虫も、大型高等動物と同様の複雑に構築された脳・神経組織、循環・消化器系を有している。従来、昆虫の小型化については、その形態学的な特性について研究が進められているが、その微小組織を構築する分子基盤についての研究はなされていない。本研究は、小型昆虫が極めて変形能が高い特異な細胞を有することを明らかにし、そのユニークな物理化学的特性を司る分子レベルでのメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrate that *Drosophila* and *Aedes* have highly elastic cell membranes with extremely low membrane tension and high resistance to mechanical stress. In contrast to other eukaryotic cells, phospholipids are symmetrically distributed between the bilayer leaflets of the insect plasma membrane, where phospholipid scramblase (XKR) that disrupts the lipid asymmetry is constitutively active. We also demonstrate that XKR-facilitated phospholipid scrambling promotes the deformability of cell membranes by regulating both actin cortex dynamics and mechanical properties of the phospholipid bilayer. Moreover, XKR-mediated construction of elastic cell membranes is essential for hemocyte circulation in the *Drosophila* cardiovascular system. Deformation of mammalian cells is also enhanced by expression of *Aedes* XKR, thus phospholipid scrambling may contribute to formation of highly deformable cell membranes in a variety of living eukaryotic cells.

研究分野：生化学 細胞生物学

キーワード：ショウジョウバエ 細胞 変形能 リン脂質 細胞骨格 リン脂質スクランブラーゼ 細胞膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫は地球上で最も多様化を遂げ繁栄している動物種であり、その中には進化過程において極度な小型化を達成した昆虫種も存在する。これらの微小昆虫も、大型高等動物と同様の複雑に構築された脳・神経組織、循環・消化器系を有している。従来、昆虫の小型化については、その形態学的な特性について研究が進められているが、その微小組織を構築する分子基盤についての研究はなされていない。申請者らは、体長数 mm のモデル動物であるショウジョウバエをモデル動物として、その微小組織の構築単位である細胞の膜に着目して、その物理化学的特性の詳細な解析に着手した。

2. 研究の目的

申請者らは、キロショウジョウバエの細胞が、哺乳類の細胞株と比較して膜張力が著しく低く、またずり応力へも高い耐性を示す、極めて特異な物理化学的特性を有することを見出した。本研究では、ショウジョウバエ細胞の示す特異な物理化学的特性を制御する分子群の同定とその生物機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 昆虫細胞と哺乳動物細胞において、細胞膜を構築する分子群の相違を明らかにする。
- (2) 細胞膜の変形能を定量的に計測する測定系を確立し、細胞膜の変形能を制御する分子群を同定する。
- (3) 細胞膜-細胞骨格を連動し細胞の変形能を制御する分子機構を明らかにする。
- (4) 細胞変形能を制御する分子の昆虫における生理機能を明らかにする。
- (5) 当該分子の哺乳動物細胞における機能を検証する。

4. 研究成果

(1) マイクロピペットを用いて様々な細胞株における形質膜の物理化学的性質を評価する測定系を確立した。さらに、ショウジョウバエやヒトスジシマカ等の小型昆虫の培養細胞は膜張力が 19-28 pN/μm と哺乳類の培養細胞と比較して非常に低く(図1)、ずり応力に対しても高い耐性を示すことが明らかとなった。

(2) 細胞膜の主要成分であるリン脂質について詳細な解析を行った結果、ショウジョウバエおよびヒトスジシマカの細胞膜では、ホスファチジルエタノールアミン(PE)が主要なリン脂質であり、形質膜を構築する脂質二重層の外層と内層で対称的に分布することが明らかとなり、哺乳動物を含めた他の真核生物と異なる特異な膜を有することが示された。

(3) 細胞膜におけるリン脂質分布を制御する分子群について解析を進めた結果、哺乳類ではアポトーシス時のみ活性化されるリン脂質スクランブラーゼ XKR がショウジョウバエでは恒常的に活性化状態であり、リン脂質を常に形質膜の外層と内層間の双方向へ輸送していることを見いだした。

図1. 昆虫細胞と哺乳動物細胞の膜張力の比較

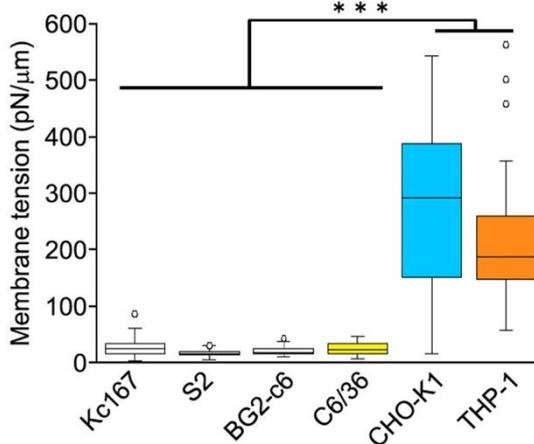
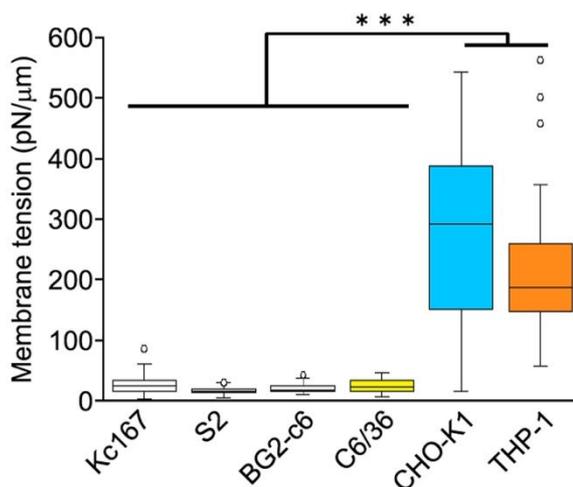


表1. 各種昆虫細胞株の膜リン脂質組成

		PE	PC	PS	CerPE	PI	SM
Kc167	(n = 4)	59.1 ± 2.4	21.8 ± 3.2	6.6 ± 0.7	3.5 ± 0.3	9.0 ± 1.0	n.d.
XKR-deficient #122	(n = 4)	53.9 ± 1.1	23.8 ± 1.6	8.9 ± 0.9	4.3 ± 0.5	9.1 ± 1.2	n.d.
CDC50-deficient	(n = 3)	65.0 ± 0.3	15.2 ± 1.0	9.8 ± 0.9	2.1 ± 0.6	7.8 ± 0.8	n.d.
Kc167 PM	(n = 4)	65.1 ± 2.5	12.4 ± 3.3	11.2 ± 2.8	5.9 ± 1.7	5.3 ± 1.9	n.d.
S2	(n = 3)	54.2 ± 1.5	24.2 ± 0.8	8.2 ± 0.3	5.5 ± 1.5	7.9 ± 1.0	n.d.
GM2	(n = 3)	50.4 ± 1.7	24.8 ± 1.0	10.8 ± 1.5	5.5 ± 0.6	8.6 ± 0.3	n.d.
BG2-c2	(n = 3)	63.3 ± 0.8	21.9 ± 0.6	3.1 ± 0.2	4.9 ± 0.2	6.8 ± 0.4	n.d.
BG2-c6	(n = 3)	56.7 ± 1.0	22.9 ± 0.6	7.6 ± 0.5	4.3 ± 0.2	8.5 ± 0.5	n.d.
BG3-c2	(n = 3)	50.0 ± 1.9	28.1 ± 1.7	8.1 ± 0.4	6.1 ± 0.2	7.6 ± 0.2	n.d.
C6/36	(n = 4)	40.7 ± 3.1	26.4 ± 2.8	6.7 ± 0.8	10.7 ± 1.0	8.6 ± 2.7	6.9 ± 1.2
CHO-K1	(n = 3)	12.3 ± 0.0	59.3 ± 0.8	9.1 ± 1.1	n.d.	8.2 ± 1.2	11.1 ± 0.6
THP-1	(n = 3)	22.5 ± 2.5	57.2 ± 1.9	5.8 ± 0.7	n.d.	7.2 ± 0.6	7.3 ± 1.6

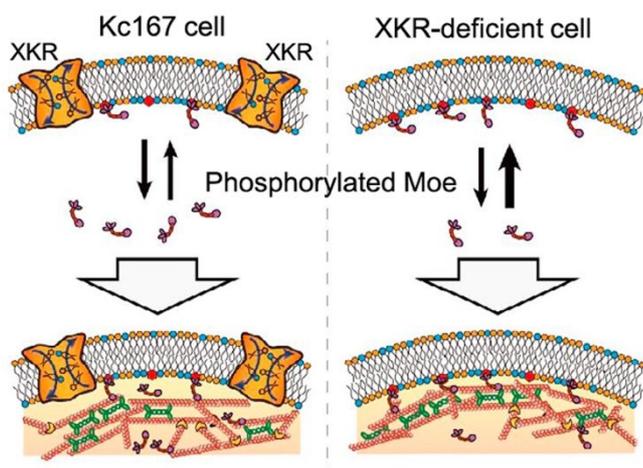
(4) CRISPR/Cas9 システムを用いて XKR を欠損させたショウジョウバエ細胞を作製した結果、XKR 欠損株では膜張力が 4.1 倍に増加しており、ずり応力を与えた時の耐性が顕著に減少することが明らかとなった(図2)。

図2. リン脂質スクランブラーゼ XKR による膜張力の制御



(5) 哺乳動物のスクランブラーゼ Xkr8 は、アポトーシス時に C-末端部分が切断されることにより活性化される。一方、ショウジョウバエおよびヒトスジシマカの XKR の構造を解析した結果、両者は C-末端の活性制御領域が欠落していることにより、恒常的に活性化していることが明らかとなった。また、同様の構造を有する XKR 分子を特定種の昆虫類が共有していることも示された。

図3. リン脂質スクランブラーゼ XKR による細胞骨格タンパク質 Moesin の膜結合の制御

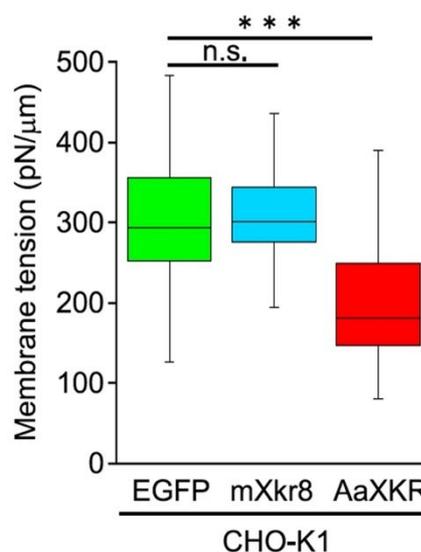


(6) XKR は細胞骨格系タンパク質 MOESIN を介して細胞骨格依存的に細胞の変形能を向上させるだけでなく、リン脂質二重層自体の変形能を向上させていることが明らかとなった(図3)。

(7) リン脂質スクランブラーゼ XKR の生物学的意義を解析する目的で、XKR を細胞・組織特異的に発現抑制したショウジョウバエを作製し、その機能異常を解析した。その結果、XKR を発現抑制した血液細胞(ヘモサイト)の変形能が著しく低下し、体液中で循環するヘモサイト数の著しい減少と、昆虫の心臓に相当する dorsal vessel でのヘモサイトの顕著な滞留が観察された。

(8) 哺乳動物細胞に XKR を発現した場合にも、細胞膜の変形能が著しく上昇することが示され、XKR を介するリン脂質輸送により脂質二分子膜と細胞骨格の動態が協調して、細胞膜の変形が制御されることが明らかとなった(図4)。

図4. XKR の導入による哺乳動物細胞の膜張



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shiomi Akifumi, Nagao Kohjiro, Kasai Hisae, Hara Yuji, Umeda Masato	4. 巻 84
2. 論文標題 Changes in the physicochemical properties of fish cell membranes during cellular senescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 583 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1695576	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 -
1. 著者名 Matsuo Naoya, Nagao Kohjiro, Suito Takuto, Juni Naoto, Kato Utako, Hara Yuji, Umeda Masato	4. 巻 60
2. 論文標題 Different mechanisms for selective transport of fatty acids using a single class of lipoprotein in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1199 ~ 1211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.M090779	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 -
1. 著者名 Nagao Kohjiro, Murakami Akira, Umeda Masato	4. 巻 67
2. 論文標題 Structure and Function of 9-Fatty Acid Desaturase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 327 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-01001	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 -
1. 著者名 Nagao, K., Murakami, A., Umeda, M.	4. 巻 67
2. 論文標題 Structure and Function of 9-Fatty Acid Desaturase (Review).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 327-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-01001	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12件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 梅田真郷、原雄二、長尾耕治郎
2. 発表標題 脂質改変による冬眠の誘導
3. 学会等名 理化学研究所BDR人工冬眠に向けての勉強会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷、村上光、長尾耕治郎
2. 発表標題 膜脂質を介する細胞内温度制御の分子機構
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 脂質の分子運動から生命現象を探る
3. 学会等名 生化学若い研究者の会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷、村上光、長尾耕治郎
2. 発表標題 膜脂質を介する細胞内温度の制御機構
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 昆虫から学ぶ骨格筋細胞の膜と代謝
3. 学会等名 第7回若手骨格筋研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 生体膜の分子機構
3. 学会等名 兵庫医科大学特別講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 生物と温度
3. 学会等名 和敬論談会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 脂質ダイナミズムから生命現象を理解する
3. 学会等名 リポクオリティ領域会議（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masato Umeda
2. 発表標題 Organization and deformability of insect cell membrane.
3. 学会等名 The 16th International Membrane Research Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 脂質ダイナミクスの生物機能
3. 学会等名 第13回スフィンゴセラピー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Umeda
2. 発表標題 Phospholipid flippase acts as a molecular switch for ion channel activation.
3. 学会等名 Membrane Lipid Transporter Symposium 2018-Flippases, Floppases and Scramblases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Umeda
2. 発表標題 Phospholipid flip-flop as a molecular switch for ion channel activation.
3. 学会等名 2nd Japan-Korea Lipid Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 エイコサンペンタエン酸を生産する微生物	発明者 梅田眞郷、従二直人、長尾耕治郎	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-123809	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------