

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19259

研究課題名(和文)リン脂質輸送体が統御するフリップ・フロップスイッチ機構の理解深化

研究課題名(英文) Mechanistic understanding of the "flip-flop switch" hypothesis generated by phospholipid translocases

研究代表者

原 雄二 (Hara, Yuji)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：60362456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜を構成するリン脂質分子は、哺乳動物細胞において膜の内・外層間で非対称に分布する。この脂質非対称分布はリン脂質輸送体群により決定され、細胞の生死、遊走を始め様々な細胞現象に関与すると考えられている。本研究では、リン脂質動態「フリップ・フロップスイッチ」が膜タンパク質の機能に影響を与えるという作業仮説の普遍性解明を目指した。特にイオンチャネル群との連関に着目した結果、機械受容イオンチャネルPIEZ01とともに冷温感受性TRPイオンチャネルを候補分子として同定した(論文投稿準備中)。さらにプロテオーム解析、遺伝子改変マウスの作出等を通じて、本研究推進を図った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで非常に多くの研究者が脂質と膜タンパク質の相互作用について従事してきた。しかし脂質は水に溶けない物性、またゲノムに直接コードされない理由から、科学技術が進歩した現在でも解析し難い対象であり、脂質環境の微細なゆらぎと膜タンパク質の機能連関の解明は未だ困難である。本研究の中心課題「リン脂質フリップ・フロップスイッチにより制御される膜タンパク質群の網羅的同定」を通じ、膜脂質とタンパク質の織りなす多様な相互作用を理解し、生体膜に機能的な多様性を賦与する分子機構の解明につながる。さらに膜タンパク質が関わる細胞応答、個体レベルの恒常性維持機構、病態発症機構等の理解深化が期待される。

研究成果の概要(英文)：Phospholipids, the main components of the plasma membrane, are known to be asymmetrically distributed to the inner and outer leaflets. This phenomenon is generated by the activity of phospholipid translocases, and is involved in a variety of cellular processes including cell survival, cell migration and so on. We have hypothesized that the transbilayer movements of phospholipids called "flip-flop switch" regulates the functions of membrane proteins. In this study, we performed a series of experiments to address our hypothesis, and identified a TRP channel protein as a candidate to be regulated by flip-flop switch. Additional experiments such as proteome analysis and generation of mutant mouse models helped us to further elucidate the molecular mechanisms.

研究分野：薬系衛生および生物化学関連

キーワード：リン脂質 フリップ・フロップスイッチ イオンチャネル制御

## 1. 研究開始当初の背景

生体膜の構成成分であるリン脂質は、細胞構造のみならず膜タンパク質の構造や活性制御に関与することは古くから論じられてきた。しかし生体膜中の脂質分子およびその動態がいかに膜タンパク質の機能調節に関わるか、分析技術が発達した現在でも、その問いに対し明確に体系立てて答えることは困難である。脂質二重層を構成するリン脂質分子群は、内層・外層間でそれらの組成が異なることが知られている。例えば、膜外層側にはホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンが、内層側にはホスファチジルセリンやホスファチジルエタノールアミン、ホスホイノシタイドが局在しているが、これらのリン脂質分子群の非対称分布には、外層から内層に特定の脂質分子を輸送するフリッパーゼ、内層から外層に輸送するフロッパーゼ、両方向に輸送するスクランブラーゼなど、二重層間の脂質輸送に関わるリン脂質輸送体群が関与している。これまでにリン脂質局在の不均一性およびその変動が、細胞分裂、細胞の遊走、形態形成等に密接に関わることを見出してきた。

膜タンパク質のうち、イオンチャネルは特に形質膜との機能的な相互作用が想定されてきた。これまでに膜張力で活性化されるイオンチャネル **PIEZO1** を研究題材とし、**PIEZO1** が生体膜のリン脂質分子のフリップ・フロップにより活性制御され、物理的な力を化学的なシグナルへと伝達し、特異な細胞応答を惹起することを明らかにした (Tsuchiya et al., *Nature Commun.*, 2018)。一方で脂質分子の微細な挙動変化が、多様な細胞現象をいかに統御するのか、その分子機構は未だ明らかではない。

## 2. 研究の目的

上記の課題を解決するため、本研究では我々が世界に先駆けて発表した「フリップ・フロップスイッチ」機構が生体内で普遍性をもって機能するか明らかにする。特に膜タンパク質全般を対象を広げることで、同機構の分子機構および細胞・生理機能を明らかにし、ひいては膜タンパク質-脂質相互作用機序、および膜を基軸とする生命現象について全容解明を目指してきた。

具体的には下記の研究項目の推進を試みた。

- 1) リン脂質輸送体群により活性制御される膜タンパク質群の同定
- 2) リン脂質フリップ・フロップスイッチを制御する因子群の網羅的同定を通じた、生理的意義解明

## 3. 研究の方法

- 1) リン脂質輸送体群により活性制御される膜タンパク質群の同定

リン脂質フリップ・フロップにより制御される因子群の同定のため、リン脂質スクランブラーゼの恒常活性型変異体を強制発現する系を用いた。具体的には **HEK293T** 細胞に **TMEM16F** およびイオンチャネルタンパク質を共発現させる系を用いた。**TMEM16F** の恒常活性型である N 末端近傍への 21 アミノ酸挿入および **D430G** 点変異が導入された変異体 (**CA-TMEM16F**) を用いた。イオンチャネル候補として、特異的アゴニストが同定されている **TRP** チャネル群を中心に発現ベクターを構築した。初期スクリーニングとして、カルシウム指示薬 **Fura-2** を用いたカルシウム測光法にて評価を行った。

候補チャネルの電気生理学的解析について、アンプは **Axopatch 200B**、また以下に示す Bath 溶液 (40 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES; pH 7.4 NaOH)、電極溶液 (140 mM KCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES; pH 7.4 KOH) をそれぞれ用いた。

- 2) リン脂質フリップ・フロップスイッチを制御する因子群の網羅的同定を通じた、生理的意義解明

本研究推進のため、オミクス解析を行った。具体的にはリン脂質フリップ・フロップにより制御される **PIEZO1** イオンチャネルについて、**PIEZO1**-tdTomato を用いて免疫沈降法によるプロテオーム解析を行った。本研究の分担研究者である永森 收志博士 (慈恵医大) と共同で実験を推進した。具体的には筋幹細胞に発現する **PIEZO1**-tdTomato に結合する因子同定をめざし、**PIEZO1** タンパク質の可溶化、免疫沈降の条件検討を行った。プロテオーム解析として、永森博士の有する定量型質量分析計 (Thermo Q Exactive) に nano LC Michrom Bioresources Advance UHPLC を接続した nano LC-MS/MS システムはを用いた。解析については Thermo Proteome Discoverer がインストールされたワークステーション及びタンパク質同定ソフトウェア Matrix Science Mascot Server 用ワークステーションを用いた。

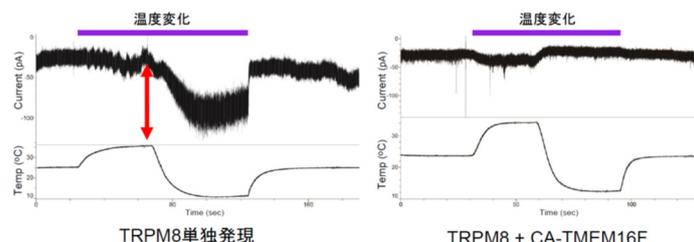
## 4. 研究成果

- 1) リン脂質輸送体群により活性制御される膜タンパク質群の同定 (分担者・村上光博士との共同での推進)

これまでに膜張力で活性化される PIEZO1 イオンチャネルが、リン脂質のフリップ・フロップにより制御されることを見出した。「フリップ・フロップスイッチ」の普遍性を明らかにするため、各種 TRP イオンチャネル発現ベクター (TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPM2 など) を用いて検討を行った。アゴニスト添加に伴う細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を  $Ca^{2+}$  プローブ Fura2 を用いて測定した。その結果、TRPM8 イオンチャネルと CA-TMEM16F を共発現させた際に、TRPM8 のアゴニストである *l*-menthol による活性化が大きく抑制された。*l*-menthol と大きく構造が異なるアゴニスト Icilin の添加によっても同様の効果が認められた。一方で、脂質輸送活性を持たない TMEM16F 変異体では、TRPM8 活性抑制効果を示さなかった。

上記の結果をさらに検証するため、電気生理学的解析によりイオンチャネル電流の評価を行った。その結果、*l*-menthol により惹起される TRPM8 内向き電流は、CA-TMEM16F の発現により有意に抑制された。

TRPM8 チャンネルの内因性活性化機構として、低温暴露が挙げられる。TRPM8 発現細胞に低温 HBS を環流処置したところ、CA-TMEM16F 共発現により、低温暴露に伴うイオンチャネル活性も顕著に減弱した。この結果はカルシウム測光、電気生理学的解析のどちらによっても観測された。以上の結果より、TRPM8 は脂質動態により活性制御されることが示唆された。



図：リン脂質スクランブラーゼによる、低温暴露に伴う TRPM8 活性阻害

TRP イオンチャネルファミリーは、様々なリガンド分子により活性化されることが知られている。TRPM8 以外のイオンチャネルについても検討を行った。TRPV1 に対するカプサイシン、TRPV4 に対する GSK-1016790A、TRPM2 に対する過酸化水素について、それらの反応性を評価したが、TMEM16F の発現の有無によってはそれぞれのイオンチャネル活性は変動しなかったことから、本現象は TRPM8 および PIEZO1 に特異的なものであることが示唆された。

以上の結果より、TRPM8 を新たな候補イオンチャネルとして論文化を進めている。今後作用する脂質分子種の同定、イオンチャネル内の脂質感知部位の同定等を通じて、TRPM8 活性制御機構の解明を目指している。またイオンチャネルについては、カルシウム透過型チャネルを中心に研究を進めてきたが、イオン透過性 ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  など)、あるいは活性化機構 (リガンド作動性、膜電位依存性、膜張力依存性) など多岐にわたる。現在も継続して「リン脂質フリップ・フロップ」により活性制御されるチャネル分子の探索を進めているところである。

## 2) リン脂質フリップ・フロップ スイッチを制御する因子群の網羅的同定を通じた、生理的意義解明 (分担者：永森 收志博士 (慈恵医大) との共同研究)

本研究推進のため、リン脂質フリップ・フロップにより制御される PIEZO1 を用い、PIEZO1 近傍に存在する因子群の網羅的同定を試みた。その理由として、①PIEZO1 は脂質動態により制御されることから、脂質分子の動態の特異的な場 (いわゆる脂質場) を感知する可能性があること、②我々の研究により、PIEZO1 は幹細胞の分裂時に分裂溝に強く集積するが、分裂溝は脂質動態が著しく変動する部位であること (Hirano et al., *Life Sci. Alliance*, 2022) が挙げられる。

内因性 PIEZO1 の C 末端部に赤色蛍光タンパク質 tdTomato (tandem dimer Tomato, Red fluorescent protein (RFP) の改変体) が付加される PIEZO1-tdTomato マウスを用いた。まず、PIEZO1 が高発現する単離筋幹細胞を用いてサンプル調製条件の検討を行った。まず膜タンパク質の可溶化に汎用される種々の界面活性剤を検討した。その結果、いくつかの界面活性剤の併用により、PIEZO1 が効率よく可溶化されることを見出した。続いて、抗 RFP 抗体が結合した Protein A 磁気ビーズを用いて PIEZO1-tdTomato の免疫沈降を行い、PIEZO1 と共にビーズに結合して溶出されるタンパク質群を銀染色法により検出した。その結果、抗 RFP 抗体に由来すると見られる夾雑バンドも強く検出された。そこで、あらかじめ抗 RFP 抗体を Protein A ビーズにクロスリンクしたところ、PIEZO1 との共免疫沈降画分における抗体由来のバンドは顕著に減少し、PIEZO1 とその結合タンパク質と予想されるバンドのみが検出された。

さらに上記免疫沈降物について、網羅的プロテオーム解析を行った。その結果、エンリッチメント解析で同定された分子群は、細胞の生育や構造維持などの基本的な細胞機能に関与するだけでなく、細胞間相互作用、さらには細胞運動といった因子群が同定された。今後その再現性ととも、機能解析につなげる予定である。

## 3) CRISPR/Cas9 法による、遺伝子改変マウスの作出 (分担者：鈴木美希博士 (静岡県大) との共同研究)

上記実験で得られた結果をさらに推進するため、簡便な遺伝子改変マウス作出法 (iGONAD 法) を用いて、変異マウスの作出を行っている。期間内にその手法確立に成功しており、今後のさらなる研究発展に努めたい。

<引用文献>

Tsuchiya M et al., *Nature Communications*, 9, 2049 (2018)

Hirano K et al., *Life Science Alliance*, e202201783 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西陸、鈴木美希、内田邦敏、原雄二
2. 発表標題 リン脂質フリップ・フロップによるTRPM8イオンチャネル活性制御
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西陸、村上光、鈴木美希、内田邦敏、原雄二
2. 発表標題 リン脂質フリップ・フロップによるTRPM8イオンチャネル活性制御
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西陸、村上光、鈴木美希、内田邦敏、原雄二
2. 発表標題 リン脂質フリップ・フロップによる冷温感受性イオンチャネルTRPM8の活性制御
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	永森 収志 (Nagamori Shushi) (90467572)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	鈴木 美希  (Suzuki Miki)		
研究協力者	村上 光  (Murakami Akira)		

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