

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659134

研究課題名(和文) ヒト一倍体細胞を用いた新規スクリーニング法による貪食関連因子の網羅的探索

研究課題名(英文) Identification of phagocytic factors using haploid genetic screens in human cells

研究代表者

瀬川 勝盛 (Katsumori, Segawa)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20542971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：死細胞は、自身が処理されるべき細胞であることを貪食細胞に伝達するための目印、“eat me”シグナル、を提示すると考えられている。中でも、リン脂質であるホスファチジルセリン(PS)は、死細胞の細胞膜上で機能する重要な“eat me”シグナルであると想定されている。しかしながら、生細胞がどのようにPSを細胞膜の内層に保持し、死細胞がどのようにPSを細胞表面に露出するのか、その分子機構は不明であった。本研究では、Haploid genetic screenとよばれるスクリーニング法を用い、“eat me”シグナルである「PSの露出」の鍵となる分子としてATP11CとCDC50Aを同定した。

研究成果の概要(英文)：Phospholipids are asymmetrically distributed in the plasma membrane. This asymmetrical distribution is disrupted during apoptosis, exposing phosphatidylserine (PtdSer) on the cell surface. In this study, I found that ATP11C and CDC50A are required for aminophospholipid translocation from the outer to the inner plasma membrane leaflet. ATP11C contained caspase recognition sites, and mutations at these sites generated caspase-resistant ATP11C without affecting its flippase activity. Cells expressing caspase-resistant ATP11C did not expose PtdSer during apoptosis and were not engulfed by macrophages, which suggests that inactivation of the flippase activity is required for apoptotic PtdSer exposure. CDC50A-deficient cells displayed PtdSer on their surface and were engulfed by macrophages, indicating that PtdSer is sufficient as an “eat me” signal.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞膜 リン脂質 非対称性 マクロファージ 貪食 順遺伝学

1. 研究開始当初の背景

真核生細胞の細胞膜では、膜の構成成分であるリン脂質が非対称に維持されており、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンは主に細胞膜の外側に、ホスファチジルセリン(PtdSer)は細胞膜の内側に保持されている。一方、アポトーシスを起こした細胞では、速やかに膜の非対称性が崩壊し、細胞の表面に PtdSer が露出される。この細胞外に露出された PtdSer をマクロファージなどの食細胞が認識し、死細胞を貪食することで生体の恒常性を維持していると考えられている。従って、細胞膜における PtdSer の露出は、貪食細胞に対する“eat me”シグナルと想定されている。しかしながら、どのように生細胞が PtdSer を細胞膜の内層に保持し、死細胞がどのように PtdSer を細胞表面に露出するのかその分子機構は長らく不明であった。

2. 研究の目的

“eat me”シグナルである PtdSer の細胞膜における分布制御機構の解明

3. 研究の方法

本研究では、最初に、細胞膜上で PtdSer を内層へと輸送する酵素(フリッパーゼ)を網羅的に探索することにした。スクリーニング手法として Brummelkamp 博士らによって開発された「ヒト一倍体細胞を用いた遺伝子トラップスクリーニング法」を用いた。KBM7 細胞は慢性骨髄性白血病患者由来の細胞株で、8 番染色体以外の全ての染色体が一倍体である。この KBM7 細胞に遺伝子トラップベクターを組み込んだレトロウイルスを感染させることで、ヒト遺伝子を無作為に欠損させた細胞集団から機能スクリーニングを行うことが可能となった。ヒト KBM7 細胞は、蛍光標識したホスファ

ジルセリン(NBD-PS)を速やかに細胞質側に取り込んだことから、細胞膜で機能するフリッパーゼを発現していることが確かめられた。次いで、ヒト KBM7 細胞に遺伝子トラップベクターを組み込んだレトロウイルスを感染させることで、変異細胞集団を作製した。この変異細胞集団に NBD-PS を添加し、下位 1%程度の NBD-PS の取り込みが減少した細胞をフローサイトメトリーにて回収した。回収した細胞を培養し、再度 NBD-PS を添加し、その取り込みが減少した細胞をフローサイトメトリーで回収した。このようにして、NBD-PS の取り込みが減少した細胞集団を濃縮することに成功し、LF (Low-Flipping)細胞と名付けた。次世代シーケンサーを用いて LF 細胞におけるウイルス挿入位置を網羅的に解析した。

4. 研究成果

この細胞集団におけるレトロウイルスの挿入位置を次世代シーケンサーを用いて解析した結果、P4 型 ATPase に属する ATP11C と P4 型 ATPase の共通のサブユニットである CDC50A の遺伝子座に多数の挿入が確認された。実際、ATP11C を欠損した細胞はフリッパーゼ活性が親株の 20%程度に減弱していた。しかし、依然として PtdSer は細胞質側に局在し、非対称性が保持されていた。一方で、CDC50A を欠損した細胞はフリッパーゼ活性がほぼ完全に消失し、細胞表面に PtdSer を露出した。つまり、CDC50A 欠損細胞では PtdSer の非対称性が崩壊していた。これまで、いくつかの P4 型 ATPase は CDC50A と結合することにより小胞体から輸送されることが報告されている。実際、ATP11C は CDC50A に依存して小胞体から輸送され、細胞膜に局在した。以上より、ATP11C は細胞膜上の PtdSer に対する主要なフリッパーゼであり、CDC50A は ATP11C を含

むいくつかのフリッパーゼを適切な局在場所に輸送することで PtdSer の非対称性を維持すると考えられた。ところで、アポトーシス細胞では、フリッパーゼ活性の低下が起こることが知られている。そこで、細胞膜フリッパーゼである ATP11C がアポトーシスの際にどのような制御をうけるかを調べたところ、ATP11C はカスパーゼにより切断、不活性化されることが分かった。ATP11C は、細胞質内領域に3つのカスパーゼ認識配列を持ち、このカスパーゼ認識配列に変異を導入したカスパーゼ抵抗性のATP11Cを発現した細胞は、アポトーシスの際に PtdSer を細胞表面に露出しなかった。以上より、カスパーゼによるATP11Cの切断が、アポトーシスにおけるPtdSerの細胞表面への露出に必須であると結論した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Phospholipid flippase activities and substrate specificities of human type IV P-type ATPases localized to the plasma membrane.
Takatsu H, Tanaka G, Segawa K, Suzuki J, Nagata S, Nakayama K, Shin HW.
J Biol Chem. 2014 Nov 28;289(48):33543-56.

2. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure.
Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F, Nagata S.
Science. 2014 Jun 6;344(6188):1164-8.

3. MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands.
Toda S, Segawa K, Nagata S.

Blood. 2014 Jun 19;123(25):3963-71.

4. Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages.

Nishi C, Toda S, Segawa K, Nagata S.
Mol Cell Biol. 2014 Apr;34(8):1512-20.

5. Flippases and scramblases in the plasma membrane.

Segawa K, Suzuki J, Nagata S.
Cell Cycle. 2014 Oct 1;13(19):2990-1

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

1. カスパーゼによるフリッパーゼの切断とホスファチジルセリンの露出
瀬川勝盛, 長田重一
細胞工学, 2014, vol. 33, No. 12,
p1280-1281.

2. カスパーゼによるフリッパーゼの不活性化を介したホスファチジルセリンの露出
瀬川勝盛, 長田重一
ライフサイエンス新着論文レビュー,
2014,
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/8967>

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称: Method of screening agents for the treatment or prevention of cancer or apoptosis-related diseases
発明者: Shigekazu Nagata and Katsumori Segawa
権利者: 京都大学
種類: 特許
番号: 61/976,651 61/978,415
出願年月日: 2014年4月8日 出願
国内外の別: 国外

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~nagata/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川勝盛 ()

研究者番号：20542971

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：