

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650072

研究課題名(和文)後期エンドソーム特異的リン脂質ビスモノアシルグリセロリン酸の生合成酵素遺伝子同定

研究課題名(英文)Identification of the enzyme gene involved in the BMP biosynthesis

研究代表者

本 賢一(Moto, Ken-ichi)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：90333335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビスモノアシルグリセロリン酸(BMP)は後期エンドソーム特異的に局在するリン脂質であるが、その機能や生合成経路に関しては不明な点が多い。本研究ではBMP生合成関連酵素の同定とBMPの機能解明に有用な細胞株の作製を目的とした。

HeLa細胞エンドソームのプロテオーム解析を行った結果、複数のアシルトランスフェラーゼとホスホリパーゼを見いだした。shRNAを利用してHeLa細胞でこれらの酵素遺伝子をノックダウンした結果、ホスホリパーゼの一つがBMP生合成に関与していることが分かった。この細胞株はBMP量が減少するが、致死ではなかったことからBMPの機能解明に利用可能であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP) is a unique phospholipid enriched in the late endosome. There are some questionable points about the function of BMP and the de novo biosynthesis of BMP has not been clearly demonstrated. In this study, I tried to identify a novel enzyme gene involved in the BMP biosynthesis and establish a cell line that the amount of BMP is decreased by silencing of the gene.

From the result of proteome analysis of endosome, I found some acyltransferases and some phospholipases which may be involved in the BMP biosynthesis. Gene silencing indicated that one of the phospholipases was involved in the BMP biosynthesis. Finally I succeeded to establish the cell line the amount of BMP is decreased by silencing of the gene.

研究分野：分子生物学

キーワード：BMP ホスホリパーゼ 後期エンドソーム

1. 研究開始当初の背景

細胞内には小胞体やゴルジ体、エンドソームなど様々な小器官があり、脂質二重膜はこれらの内外を区別する役割を担っている。脂質二重膜の主要成分はリン脂質であり、試験管内では1種類のリン脂質だけで二重膜構造を再構成できるが、一方で自然界には1000種類以上のリン脂質が存在しており、これらの組成は生物種や組織、細胞小器官などの違いにより異なる。ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンは生体内において脂質二重膜を構成する主要なリン脂質であり、どの細胞小器官においても比較的多く存在するが、その一方で本研究対象であるピスモノアシルグリセロリン酸 (BMP) は後期エンドソームの内腔小胞に特異的なリン脂質であり、内腔小胞ではリン脂質の70%を占めることが報告されている。その機能については不明瞭な点が多いが、最近になって Kirkegaard らは BMP の機能の一つとして HSP70 との相互作用を介して酸性スフィンゴミエリナーゼの補助因子として働くこと報告している (Nature, 2010) が、実際にはさらに多くの未知機能があると考えられる。一方、Poorthuis らは BMP がホスファチジルグリセロール (PG) から生合成されることを示した (JBC, 1976) が、その生合成経路は不明瞭な点が多く PG 以降の生合成酵素は全く不明であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では HeLa 細胞を用い、BMP の生合成に関わる酵素遺伝子の同定を目的とする。

(2) (1) が成功した場合には、さらにこの酵素遺伝子を HeLa 細胞で人工的に欠損させるか、あるいは発現抑制させることにより BMP 量が少ない細胞株の樹立を目指す。

3. 研究の方法

(1) BMP の生合成にリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ (LPLAT) が関与しているとの仮説に基づき、マウスで報告されている 19 種類の LPLAT 遺伝子すべてを各々 CHO-K1 細胞で発現させた。トランスフェクション 2 日後の細胞から脂質を抽出した後、LC/MS を用いて BMP を定量することにより、その生合成に関与しているかどうか判断した。

(2) BMP 生合成関連酵素が後期エンドソームに特異的に存在すると仮定し、HeLa 細胞から調整した初期エンドソームおよび後期エンドソームのプロテオーム解析を行った。この解析結果から関連酵素の候補を選抜した後、各々についてテトラサイクリン誘導 shRNA 発現システムを利用した細胞株を作製した。これらの細胞株で各遺伝子を発現抑制後、LC/MS を用いて BMP を定量し、BMP 量の減少を目安として BMP 生合成酵素の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 19 種類のマウス LPLAT 遺伝子を各々 CHO-K1 細胞で発現させた後、LC/MS を用いて BMP を定量したが、野生型との比較で優位な差は見られなかった。原因を調べた結果、トランスフェクションの効率が本実験目的を達成するには十分でないことが分かった。そこで、これらの一部については強制発現可能な安定細胞株を作製した。

(2) HeLa 細胞の初期エンドソームおよび後期エンドソームのプロテオーム解析を行い、BMP 生合成関連酵素の候補として 5 種類のアシルトランスフェラーゼと 9 種類のホスホリパーゼを得た。HeLa 細胞を用いて tet-on システムを利用可能な誘導型の shRNA を持つ細胞株を作製し、各遺伝子をノックダウン後、LC-MS を用いて BMP を定量した。その結果、前述のホスホリパーゼのうちの一つをノッ

クダウンした際に BMP 量が徐々に減少し、ノックダウン 4 日目までに約 60%減少したことから、このホスホリパーゼが BMP の生合成に関与していることが明らかとなった(図 1)。また、このホスホリパーゼを継続的にノックダウンさせた場合、細胞株の増殖速度はノックダウン前に比べて 50%以下になるものの、死滅せずに 2 週間以上培養できることを確認した。したがって、この細胞株を用いて解析することにより、BMP の機能解明が期待できると考えている。

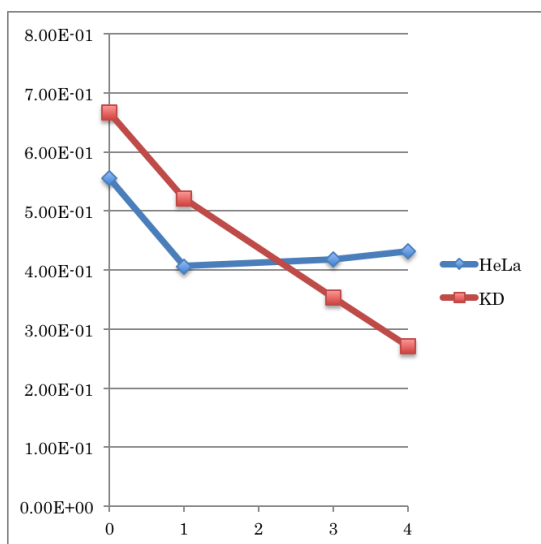


図 1 ホスホリパーゼ遺伝子をノックダウンした細胞における BMP 量の変動
BMP 生合成に関連するホスホリパーゼ遺伝子を HeLa 細胞にてノックダウンした後、LC/MS を用いて BMP を定量した。HeLa : HeLa 細胞。KD: 遺伝子ノックダウン細胞。横軸 : ノックダウン後の日数。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況(計 0 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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本 賢一 (MOTO KEN-ICHI)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学
学研究室・専任研究員

研究者番号 : 90333335

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

酒井祥太 (Sakai Shota)

北海道大学 先端生命科学研究院 特任助教
研究者番号：60611720