

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440069

研究課題名(和文) ゲノムワイドshRNAスクリーニングによる糖脂質代謝・輸送関連因子の探索と解析

研究課題名(英文) Search for new factors involved in glycolipid metabolism and transport by a genome-wide shRNA screen

研究代表者

山地 俊之 (Yamaji, Toshiyuki)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：50332309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではスフィンゴ糖脂質代謝・輸送に影響を及ぼす因子の網羅的な同定を目指して、shRNAライブラリーを用いた志賀毒素耐性スクリーニングを行った。その結果グルコシルセラミド合成酵素等、志賀毒素受容体Gb3の生合成に必須な遺伝子が濃縮された。ただしセラミド合成酵素の一種CERS2のshRNAに関してその効果はオフターゲットであり、ゲノム編集法でCERS2変異株を作製し、志賀毒素に対する耐性がほとんどないことを確認した。一方これら変異株のスフィンゴ脂質生合成を解析したところ、糖脂質がスフィンゴミエリンと比較し極長鎖セラミドを積極的に利用するメカニズムが存在すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, a genome-wide shRNA screen was performed using Shiga toxin (Stx)-induced cell death to search for new factors that are involved in glycolipid metabolism and transport. Several genes essential for the biosynthesis of Gb3, the Shiga-toxin receptor, were concentrated, which included glucosylceramide synthase. Furthermore, many shRNAs were concentrated in this screen. However, most of the Stx-resistant shRNAs showed off-target effects, which included an shRNA targeted for CERS2, one of the ceramide synthases. Then, CERS2 mutants were constructed by genome-editing, and non-resistance to Stx was confirmed in these mutants. On the other hand, sphingolipid biosynthesis was analyzed in these mutants, and the results suggested the existence of a yet-to-be-identified mechanism rendering very-long-chain-ceramides more accessible than C16-ceramide to glucosylceramide synthase, compared with sphingomyelin synthase.

研究分野：糖鎖生物学 細胞生物学

キーワード：スフィンゴ糖脂質 志賀毒素 ゲノムワイドスクリーニング shRNA ゲノム編集法

### 1. 研究開始当初の背景

(1) スフィンゴ糖脂質は、その機能として高次機能や疾患に深く関与することが知られている。機能解明と同時に重要なのが、スフィンゴ糖脂質群の代謝及び細胞内輸送機構の解明である。それぞれの生合成酵素は小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジネットワーク (TGN) と異なる細胞内小器官に分かれて局在しており、またセラミドやラクトシルセラミド (LacCer) からは様々な代謝産物が生じる。このことから、スフィンゴ脂質の発現制御を解明する場合、各生合成酵素の転写発現量のみならず、酵素タンパクのオルガネラ局在化機構や翻訳後制御、さらに生合成された各スフィンゴ脂質の輸送機構を明らかにすることが、発現制御の統合的な理解へと繋がる。

(2) 志賀毒素 (ベロ毒素) は腸管出血性大腸菌の病原性因子であり、細胞表面の糖脂質 Gb3 に結合後、エンドソーム-ゴルジ体-小胞体-細胞質内へと逆輸送され、リボソームを不活化することで細胞死をもたらす。この毒素を用いて遺伝学的スクリーニングを行うことで、(a) 志賀毒素-Gb3 複合体の逆輸送に関する因子、(b) 受容体 Gb3 の生合成に影響する因子 (生合成酵素に影響する因子やスフィンゴ脂質輸送に関する因子) の同定が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究目的は、プール型レンチウイルス shRNA ライブラリーを用いた、遺伝子発現低下による志賀毒素耐性スクリーニングを行うことによって、スフィンゴ糖脂質代謝・輸送に影響を及ぼす新規因子の網羅的な同定・解析を行うことである。

### 3. 研究の方法

(1) shRNA ライブラリーを用いたスクリーニング

- (a) Collecta 社のレンチウイルス shRNA ライブラリーは 15377 種のヒト mRNA に対応している (82500 種の shRNA)。このライブラリープラスミドをパッケージング細胞である 293FT 細胞 にトランスフェクションし、レンチウイルス粒子を得る。
- (b) ウイルスを 2 グループの HeLa 細胞 (志賀毒素に感受性) に独立して感染させる。
- (c) 2 グループを志賀毒素で処理し、生存してきた細胞群のゲノム DNA を単離する。
- (d) この shRNA ライブラリーには対応する遺伝子が判別できるバーコード配列を有しており、この配列をゲノム DNA から PCR で増幅することで、次世代シーケンサー用のシーケンスライブラリーを作製する。
- (e) 次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を用いて、(d)の配列を 2 グループ独立して網羅的に解読する (感染研・病原

体ゲノム解析センターとの共同研究)。

(f) 2 グループで共通に見られた配列を一次スクリーニングの候補とする。

(2) CRISPR ライブラリーを用いたスクリーニング

(a) Feng Zhang 研究室の GeCKOv2 ライブラリーを導入し、作製した CAS9 発現 HeLa を用いて、前述の shRNA ライブラリーと同様のスクリーニングを行う。

(b) sgRNA 配列をゲノム DNA から PCR で増幅することで、次世代シーケンサー用のシーケンスライブラリーを作製する。上記と同様次世代シーケンサーによる解析を行う。

(3) 志賀毒素耐性候補遺伝子の解析

(a) 個々の遺伝子解析のため、レンチウイルスによる shRNA 発現株、プラスミドによるノックアウト細胞を作製する。

(b) 志賀毒素耐性の再現性を確認する。

(c) 受容体 Gb3 の発現を志賀毒素 B サブユニットによる FACS 解析及びガラクトースやセリンのパルスラベル実験による糖脂質解析を行う。

### 4. 研究成果

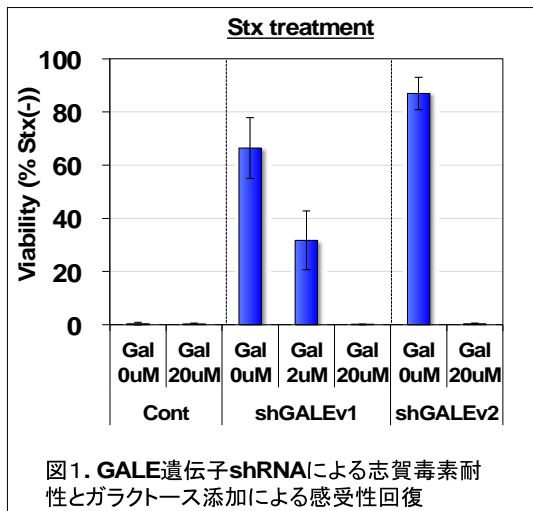
(1) shRNA ライブラリーを用いた志賀毒素耐性スクリーニング

(a) スクリーニングにおいて、複数種類の shRNA が含まれていた遺伝子として Gb3 の生合成に必須な UGCG (グルコシルセラミド (GlcCer) 合成酵素)、B4GalT5 (LacCer 合成酵素)、GALE (UDP ガラクトースエピメラーゼ)、また細胞内輸送に関与する VPS53 (GARP 複合体) が同定された。その他 1 遺伝子に対し 1 種類ではあるものの、リード数の多い shRNA が多く同定された。

(b) これまでに GALE を欠損させると糖脂質の低下を引き起こすことが報告されていた。今回単離された GALE shRNA を HeLa 細胞に発現させると、志賀毒素に対して耐性を示し、受容体である Gb3 の減少が見られた。またガラクトース添加により UDP ガラクトース量を増加させると、志賀毒素感受性及び Gb3 の回復が確認出来た (図 1)。

(c) セラミド合成酵素 CERSs の 1 つ CERS2 の shRNA が 1 種類志賀毒素耐性として濃縮されており、この shRNA は強い志賀毒素耐性を示した。ただしこの shRNA によるノックダウン細胞株に CERS2 の cDNA で発現量を回復させても、毒素感受性は親株のように戻らず、志賀毒素耐性に関しては off-target 効果であった。

(d) リード数の多かった shRNA 約 70 種に関



して、shRNA 発現細胞を作製し、それぞれ志賀毒素に対する耐性を調べたところ、差異はあるものの多くが耐性を示した。この結果はスクリーニングで耐性を示す shRNA が確かに濃縮されていることを示している。ただし強い耐性を示している shRNA のうち多くは、(i) cDNA の過剰発現で親株のように戻らない、(ii) mRNA の低下が見られない、(iii) そもそも mRNA の発現が見られない、といった off-target 効果で耐性を示すものであった。

## (2) 極長鎖脂肪酸セラミドの糖脂質における優先使用

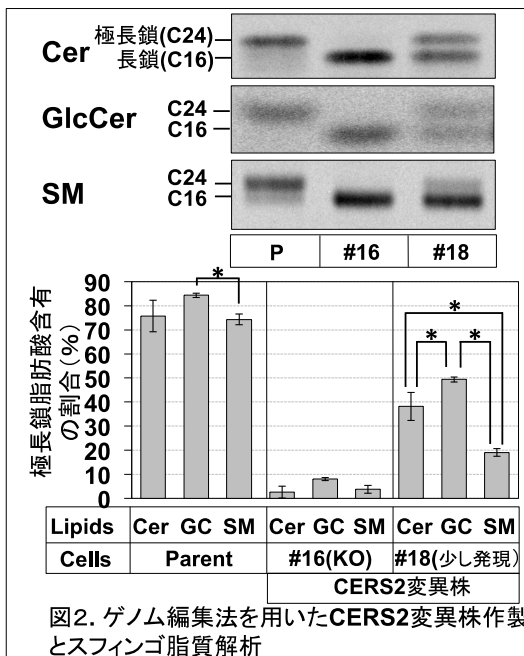
(a) (1)(c)を確認するためゲノム編集法を用いて、ノックアウトを含む CERS2 発現量の異なる HeLa 細胞変異株を作製した。これらの細胞株は志賀毒素に対する強い耐性を示さなかった。

(b) HeLa 細胞においては、C22-24 脂肪酸(極長鎖脂肪酸)を基質とする CERS2 と C16 脂肪酸を基質とする CERS5 が主に発現しており、糖脂質、スフィンゴミエリン(SM)共にそれに相当する脂肪酸分子種が見られる。上記(a)の細胞株のスフィンゴ脂質を解析したところ、CERS2 のノックアウト細胞では糖脂質、SM 共に極長鎖脂肪酸含有分子種は発現していなかったが、CERS2 の発現量増加に伴い、GlcCer のほうが SM と比べ極長鎖脂肪酸セラミドが優先的に利用されていた(図2)。これは過去の知見と一致している。

(c) GlcCer と SM の脂肪酸分子種が異なる原因として、それぞれに供給されるセラミドの輸送経路の違いが関係していると推測した。SM の生合成に関するセラミド輸送タンパク CERT は C16 セラミドを優先的に輸送することが知られている。そこで上記の CERS2 変異株に CERT 遺伝子をノックアウトしたところ、それでもなお極長鎖

脂肪酸の優先使用が見られたことより、この GlcCer への優先利用は CERT とは別の機構により制御されている可能性が考えられた。

(d) ER-ゴルジ体小胞輸送阻害剤 Brefeldin A 処理あるいは UGCG の過剰発現により、GlcCer の C16 セラミド含有の割合が増加したことより、極長鎖の割合は基質特異性では説明がつかず、セラミドの ER-Golgi 間の輸送の過程で、糖脂質において極長鎖が積極的に利用されるメカニズムが存在すると考えられた。



## (3) CRISPR ライブラリーを用いた志賀毒素耐性スクリーニング

(a)(1)において shRNA ライブラリーによるスクリーニングでは off-target 効果による耐性が多かったことより、手法を変え CRISPR ライブラリーを用いた志賀毒素耐性スクリーニングを行った。その結果、受容体 Gb3 生合成に直接関与が明らかな酵素群が予想される限りほぼ網羅的に同定された。

## 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4件)

Nagata M, Izumi Y, Ishikawa E, Kiyotake R, Doi R, Iwai S, Omahdi Z, Yamaji T, Miyamoto T, Bamba T, Yamasaki S. Intracellular metabolite  $\beta$ -glucosylceramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: E3285-E3294 (2017) 査読有

Yamaji T, Horie A, Tachida Y, Sakuma C, Suzuki Y, Kushi Y, Hanada K. Role of

Intracellular Lipid Logistics in the Preferential Usage of Very Long Chain-Ceramides in Glucosylceramide. *Int. J. Mol. Sci.*, 17:E1761 (2016) 査読有

Yamaji T, Hanada K. Sphingolipid metabolism and interorganellar transport: localization of sphingolipid enzymes and lipid transfer proteins. *Traffic*, 16:101-122 (2015) 査読有

Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, Kuroda M, Hanada K. The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Res*, 21:673-683 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計6件)

山地俊之、花田賢太郎：スフィンゴ糖脂質とスフィンゴミエリンとの間で異なるセラミド分子種嗜好性にはセラミドの細胞内ロジスティクスが関与している、第9回セラミド研究会学術集会、2016.10.27、東京

Yamaji T, Sekizuka T, Yahiro K, Tachida Y, Sakuma C, Kuroda M, Hanada K: Application of genome editing technologies for studies on sphingolipid and glycan metabolisms, EMBO Workshop “Glycosylation in the Golgi complex”, 2016.10.24-28, Vico Equense, Italy

山地俊之、関塚剛史、八尋錦之助、鈴木佑典、櫛泰典、黒田誠、花田賢太郎：ゲノム編集技術を用いたスフィンゴ脂質・糖鎖の代謝研究、第35回日本糖質学会年会、2016.9.1-3 高知

山地俊之、堀江亜矢、関塚剛史、竹内史比古、黒田誠、花田賢太郎：志賀毒素の細胞障害作用を指標としたゲノムワイド shRNAスクリーニング、第57回日本脂質生化学会、2015.5.28-29、東京

Yamaji T, Hanada K: Genetic approaches for studying sphingolipid metabolism: Construction of sphingolipid gene disruptants in HeLa cells by genome editing, 6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology, 2014.12.9-12, Hyderabad, India

堀江亜矢、関塚剛史、竹内史比古、黒田誠、花田賢太郎、山地俊之：志賀毒素の細胞傷害作用に対するゲノムワイド shRNA スクリーニング、第87回日本生化学会大会、2014.10.15-18、京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

山地 俊之 (TOSHIYUKI YAMAJI)  
国立感染症研究所細胞化学部・室長