

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：18K19398

研究課題名(和文)リン脂質分布のゆらぎによるイオンチャネル制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulations of ion channels by fluctuation of phospholipids' distribution

研究代表者

原 雄二(Hara, Yuji)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60362456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜の構成成分であるリン脂質は、脂質二重層の内・外層間で非対称に局在し、膜の安定性や細胞内シグナリング、細胞遊走など、多様な細胞現象に重要な役割を果たしている。本研究では、脂質二重層間におけるトンボ返り運動(フリップ・フロップ)により活性制御されるイオンチャネル群のさらなる同定・解析を目的とした。脂質フリップ・フロップを改変することで、脂質局在を乱した状態で各イオンチャネルを発現させ、チャネル活性への影響を検討したところ、Ca²⁺透過型イオンチャネルの一つが有意に活性減弱を示したことから、リン脂質の膜間分布の変化は、様々なイオンチャネル制御にも関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで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る。そのため脂質環境の微細なゆらぎとイオンチャネル活性調節について深く追求した研究は未だ少ない。本研究にて膜リン脂質によるチャネル制御機構を解明することは、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を解明することにつながる。本申請によりイオンチャネルが関わる細胞応答、さらに個体レベルの恒常性維持機構、病態発症機構等についてさらなる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 asymmetrically distributed between the inner and the outer leaflets. Previous literatures including our recent finding have shown that the asymmetric distribution of phospholipids governs a variety of cellular processes including membrane biophysics, intracellular signaling, and cell migration. But it is still obscure about the molecular mechanism as to how the changes in phospholipids' distribution contributes to a variety of cellular events. In this project, we have examined the importance of phospholipids' distribution in regulation of membrane proteins. Our results identified one of Ca²⁺-permeable cation channels regulated by bidirectional transport of phospholipids across the plasma membrane. These results strongly support the importance of the "flip-flop switch" mechanism that changes in the trans-bilayer distribution of lipids regulates the function of membrane proteins including ion channels.

研究分野：生理学

キーワード：リン脂質 リン脂質フリッパーゼ イオンチャネル

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膜タンパク質と相互作用することで、膜タンパク質の構造や活性などを制御する。しかし生体膜中の脂質分子およびその動態、さらに脂質との相互作用によりもたらされる膜タンパク質機能の調節機構については、未だその全容は明らかでない。

イオンチャネルは多量体を形成し、チャネルポアを通じて特定のイオンを細胞内外に通過させる。イオンチャネルの開閉は他の膜タンパク質と同様に、隣接するリン脂質により制御されることが報告されてきた。しかしリン脂質の変化がイオンチャネルにどのような機能を賦与するのか、分析技術が発達した現在もその問いに対し明確に答えることは依然困難である。

我々はリン脂質群を特異的に認識するプローブ群の構築を行なってきた。それらの利用により、リン脂質は側方拡散だけでなく、脂質二重膜の内層・外層間で特定の輸送体により輸送され、膜内層・外層間でリン脂質分子は不均一に局在することが明らかになった。さらに興味深いことに、リン脂質輸送体により形成されたリン脂質分子の配向性の変化が細胞分裂、細胞の遊走、形態形成など、多彩な細胞現象に密接に関わることを見出した(文献①、②)。すなわち膜タンパク質は生体膜のリン脂質分子の非対称分布(配向性)の局所的なゆらぎを感知し、それを細胞内へと化学的なシグナルへと伝達し、細胞応答を惹起することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、リン脂質分布(配向性)のゆらぎが引き起こす細胞応答のメカニズムを明らかにすることを目的とした。細胞膜に存在するイオンチャネルを実験材料として、リン脂質非対称分布およびそのゆらぎが様々なイオンチャネルに対しどのような応答を引き起こすかを解明することにより、膜タンパク質-脂質相互作用の意義、および膜を基軸とする生命現象についてのメカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

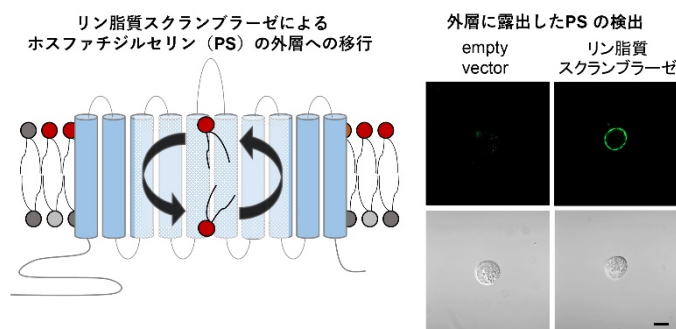
本研究では、生体膜(脂質二重膜)の内層・外層間における、リン脂質の非対称分布の形成に関わるリン脂質輸送体群(外層から内層:フリッパーゼ、内層-外層両方向:スクランブラーゼ)により活性制御されるイオンチャネルの同定を試みた。HEK293細胞株において、リン脂質スクランブラーゼの強制発現系を用いて検討を行った。脂質局在の変化については、通常形質膜内層に存在するホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミンについて、それぞれ特異的に結合するAnnexin V、Ro09-0198を用いて、脂質局在のゆらぎを検出した。

候補となるイオンチャネル群については、活性化アゴニストが確立されているもの、カルシウムイオン透過性があるものを中心に解析を行った。特に細胞内外の様々な刺激に応じて活性化されるTRP(Transient Receptor Potential)イオンチャネル群について着目し、リン脂質輸送体群との関連性について検討を行った。尚、カルシウム流入の評価系として、Fura-2による2波長励起による方法を用いた。

4. 研究成果

(1) リン脂質スクランブラーゼによる、細胞膜のリン脂質局在を変化させる系の構築:

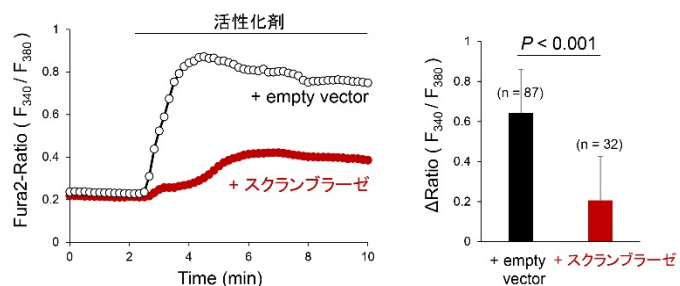
リン脂質のフリップ・フロップにより活性が制御される膜タンパク質同定のため、膜脂質の非対称分布が喪失した細胞系の構築を目指した。リン脂質を二重層の内層・外層間で輸送するリン脂質輸送体群のうち、リン脂質を内層・外層間で両方向に輸送するリン脂質スクランブラーゼの恒常活性型をHEK293細胞に一過的発現させたところ、通常形質膜内層に局在するPSおよびPEが外層側に露出することを見出した(図1)。以降、本実験系を用い、リン脂質動態により制御されるイオンチャネルの同定・解析を行うこととした。



(2) リン脂質動態により制御される イオンチャネルの同定

上記の細胞系を用い、内層・外層間のリン脂質動態により活性が制御されるイオンチャネルのスクリーニング実験を行った。HEK293細胞に、各種イオンチャネルと恒常活性型スクランブラ

一ゼを共発現させ、アゴニスト添加に伴う細胞内への Ca²⁺流入を Ca²⁺プローブ Fura2 を用いて測定した。イオンチャネルの候補群として、細胞内外の環境変化により活性化される TRP イオンチャネル群を用いた。その結果、TRP イオンチャネルの一つを発現させた際に、そのアゴニストによる活性化が大きく抑制された



(図 2)。また TRP チャンネル-GFP 体を用いた局在解析により、スクランブラーゼの発現の有無によってその細胞内局在は変化しなかった。これらの結果から、当該 TRP チャンネルはリン脂質スクランブラーゼによる脂質動態の変化により、そのチャネル活性が制御されることが示唆された。

(3) リン脂質動態により制御されるイオンチャネルの特異性

細胞環境の変化により様々なイオンチャネル群が活性化される。そこで、温熱感受性イオンチャネルであり、トウガラシの辛味成分であるカプサイシンで活性化される TRPV1、および浸透圧感受に関わる TRPV4 をはじめとする各種イオンチャネルについて検討した。その結果、本アッセイ系では、TRPV1、TRPV4 はリン脂質スクランブラーゼを介したリン脂質動態により制御されなかった。これらの結果より、当該イオンチャネルは他のチャネルとは異なり、二重層間の脂質動態によって活性が制御されるという特異な性質を有することが示された。

(4) リン脂質動態-イオンチャネル制御に関わる脂質分子の同定

当該イオンチャネルに対し、リン脂質スクランブラーゼを介し、どの脂質分子の輸送がチャネル活性制御に関わるか同定を行った。内層の PS 量を減少させる Fendiline 添加、および PS に対し特異的に結合する LactC2 を強制発現することにより、当該チャネル活性は著しく減少した。一方、形質膜外層の PS 量を増加させる LysoPS 添加によっては有意なチャネル活性の増減は認められなかった。以上の結果より、形質膜内層の PS 量の変化により、当該イオンチャネル活性が制御されることが明らかになった。

本研究を通して、当該イオンチャネルはリン脂質スクランブラーゼにより活性が制御されることが示された。現在、スクランブラーゼによるリン脂質のフリップ・フロップを感知するアミノ酸配列の決定や、リン脂質動態を介したイオンチャネル活性制御の生理的意義を追究したい。これらの研究を発展させることで、リン脂質動態が多様な膜タンパク質群に対して機能制御をもたらす「フリップ・フロップ スイッチ」機構の全容解明に寄与したい。

<引用文献>

- ① Kato U et al., Role for Phospholipid Flippase Complex of ATP8A1 and CDC50A Proteins in Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 288, 4922-4934, 2013.
- ② Tsuchiya M et al., Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. *Nat. Commun.*, 9, 2049, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuji Hara
2. 発表標題 Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation
3. 学会等名 OIST Mini-symposium, 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 Yuji Hara, Kotaro Hirano, Masaki Tsuchiya, Masaki Tsuchiya, Masato Umeda
2. 発表標題 Role of mechanosensing machinery in skeletal muscle regeneration
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原雄二、平野航太郎、土谷正樹、高林征史、梅田真郷
2. 発表標題 細胞力覚を基軸とした骨格筋線維再生機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原雄二、土谷正樹、平野航太郎、梅田真郷
2. 発表標題 筋再生過程におけるリン脂質輸送体依存的なカルシウム動態の役割
3. 学会等名 第4回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原雄二、土谷正樹、奥田雅貴、平野航太郎、梅田真郷
2. 発表標題 リン脂質フリッパーゼによる筋線維の再生制御機構
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Hara, Masaki Tsuchiya, Kotaro Hirano, Masato Umeda
2. 発表標題 Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation
3. 学会等名 第56回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Hara, Masaki Tsuchiya, Masaki Okuda, Kotaro Hirano, Seiji Takabayashi and Masato Umeda
2. 発表標題 Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation
3. 学会等名 The 49th NIPS International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Hara, Masaki Tsuchiya, Masaki Okuda, Kotaro Hirano, Seiji Takabayashi and Masato Umeda
2. 発表標題 Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation
3. 学会等名 OIST Mini-Symposium 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 佐々木映美、原雄二
2. 発表標題 リン脂質フリップ・フロップにより制御されるイオンチャネルの同定・解析
3. 学会等名 第138回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------