

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19292

研究課題名(和文) 生体膜研究を飛躍的に加速する脂質非対称バイオセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of a lipid asymmetry biosensor that dramatically facilitates studies on biomembranes

研究代表者

嘉村 巧 (Kamura, Takumi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：40333455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞膜脂質二重層における脂質分子の非対称分布(脂質非対称)の状態を生きた細胞でモニターできる脂質非対称バイオセンサーの開発を試みた。その結果、生きた酵母細胞で脂質非対称の状態変化をモニター可能なバイオセンサーの雛形の作製に成功した。さらに、その雛形に対する系統的な変異導入を行い、脂質非対称の変化をより高いS/N比で明瞭に検出できる改良版バイオセンサーも作製した。これらのバイオセンサーを用いて、様々な環境ストレス下で培養した酵母細胞をモニターしたところ、幾つかの環境ストレスが脂質非対称の状態変化を通してRim21に感知されてい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

本研究で開発した脂質非対称バイオセンサーは遺伝子にコードされているため、増幅、保存、輸送などが簡便である。国内外の研究者のリクエストに応じることで、生体膜研究の分野に大きく貢献できる。また、本研究では細胞外のpHや塩濃度などの物理化学変数の幾つかが、脂質非対称など細胞膜の物理化学的狀態に変化をもたらし、その変化を細胞膜に存在するセンサータンパク質群が感知することを示唆した。細胞外の物理化学変数を細胞が感知する仕組みはほとんど明らかになっていないが、このような新たな概念は、細胞のストレス受容機構の研究に大きなパラダイムシフトを起こす可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop a biosensor that can report the state of lipid asymmetry in the plasma membrane. For this purpose, we focused on and utilized a lipid asymmetry sensor protein Rim21 which we previously identified in yeast. As a result, we developed a prototype of lipid asymmetry biosensor that can visualize alterations in lipid asymmetry in living yeast cells. In addition, we conducted a systematic mutagenesis approach of the prototype biosensor, and succeeded in developing a series of improved biosensors with higher S/N ratio.

Using these biosensors, we monitored the state of lipid asymmetry in yeast cells exposed to environmental stresses. Interestingly, the state of lipid symmetry seemed to be altered under alkaline and salt stresses. Cells deleted for RIM21 were hypersensitive to alkaline and salt stresses, suggesting that these environmental stresses are sensed by Rim21 through alterations in the state of lipid asymmetry in the plasma membrane.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：脂質非対称 細胞膜 バイオセンサー 生体膜、 ストレス 出芽酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の脂質二重層では内外層で脂質組成や役割が異なっている。その様な脂質非対称は、様々な膜現象に密接に関わり、細胞の生存に必須である。また、ヒトではその部分的な破綻でさえ多くの疾患を引き起こす。その様な重要性にもかかわらず、脂質非対称の状態を生きた細胞でモニターできるバイオセンサーが存在せず、この研究分野のボトルネックとなっていた。私たちは、出芽酵母細胞を用いて、脂質非対称の状態変化を感知して適応反応を引き起こす脂質非対称センサータンパク質 Rim21 を見出していた。そこで、Rim21 を利用することで脂質非対称バイオセンサーが開発できるのではないかと期待が高まっていた。

2. 研究の目的

本研究では、脂質非対称センサータンパク質 Rim21 を利用して、生きた細胞で脂質非対称の状態をモニターできる脂質非対称バイオセンサーを開発することを目指した。

3. 研究の方法

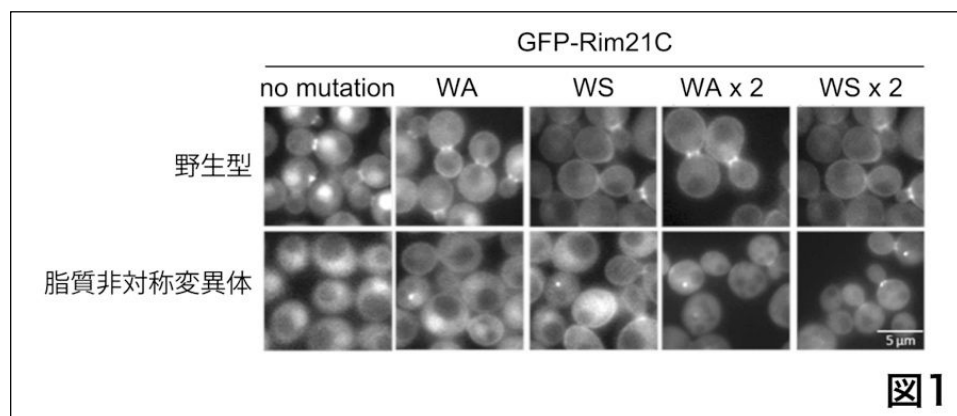
細胞膜の多重膜貫通タンパク質である Rim21 は、その C 末端細胞質領域 (Rim21C) にセンサーモチーフを有している。また、Rim21C 部分を切り出して GFP に融合すると、脂質非対称の状態変化に応じて細胞膜から解離することが知られていた。この GFP-Rim21C に系統的な変異導入を行い、脂質非対称変化に応じた局在変化をより高い S/N 比で明瞭に検出できる改良版を作製する。

また、様々な環境ストレスに曝した出芽酵母細胞でこのバイオセンサーの挙動を追跡し、環境ストレスが脂質非対称の状態に及ぼす影響を調べる。動植物細胞・個体で発現するプロモーターに GFP-Rim21C やその改良版を連結し、動植物で脂質非対称の状態をモニター可能なバイオセンサーの開発を行う。

4. 研究成果

(1) 脂質非対称バイオセンサーの雛形に対して、系統的な変異導入を行った。Rim21C の荷電アミノ酸残基や菌類で高度に保存されているモチーフに注目し、それらのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異版 GFP-Rim21C を作製した。必要に応じてアラニンだけではなく、セリン、アルギニンにも置換した。それら変異版 GFP-Rim21C の挙動を野生株および脂質非対称が変化した変異株で観察したところ、特に菌類で保存された WEW モチーフの W 残基に変異を導入した場合に (ここではアラニンに置換した場合は WA、セリンに置換した場合は WS と表記) 野生株で細胞膜への局在が雛形に比べて明瞭に観察された (図 1)。しかし、脂質非対称変異体では雛形と同様に細胞膜から解離した。すなわち、脂質非対称変化に対する細胞膜からの解離をより高い S/N 比で明瞭に観察できる改良版脂質非対称バイオセンサーの開発に成功した。そこで WA や WS 変異を導入した Rim21C 部分をタンデムに連結した上で GFP と融合したと

ころ、脂質非対称変化に対する局在変化がさらに明瞭に観察出来る様になった。これらの改良版脂質非対称バイオセ



ンサーを雛形と共にさらなる研究に用いた。

(2) 脂質非対称バイオセンサーの雛形および改良版を発現している出芽酵母細胞を様々な環境ストレス下で培養し、バイオセンサーの挙動を観察した。すると、外界のアルカリ化ストレスと高塩濃度ストレス下において、脂質非対称バイオセンサーは細胞膜から解離した (図 2)。この結果は、これらのストレスによって細胞膜の脂質非対称が変化していることを示唆している。そこで、脂質非対称の形成・維持に必要な脂質分子の脂質二重層間反転移動の速度を測定したところ、アルカリ性培地で培養した出芽酵母細胞で大幅に低下しており (図 3)、実際にアルカリストレス下では脂質非対称の状態が乱されていることが強く示唆された。さらに RIM21 欠損株は野生株に比べてアルカリストレスに対して高感受性を示した。アルカリストレスと同

様に脂質非対称バイオセンサーが反応した高塩濃度ストレスに対しても、*RIM21* 欠損株は高感受性を示した。これらの結果は、アルカリストレスや高塩濃度ストレスは、細胞膜の脂質非対称に大きな影響を与え、それを通して *Rim21* によって感知され適応反応が惹起されることを示唆している。タンパク質性あるいは脂質性のリガンドと受容体の様な実体を伴った 1 対 1 のケースと異なり、pH や塩濃度、温度、浸透圧などの物理化学変数の感知機構はほとんど明らかになっていない。本研究によって、少なくとも幾つかの物理化学変数が脂質非対称をはじめとする細胞膜の物性に变化をもたらし、それを通して細胞膜上のセンサータンパク質群がストレスを感知する様子が浮かび上がってきた。物理化学ストレスの受容機構に関する大きなパラダイムシフトを引き起こす可能性がある。

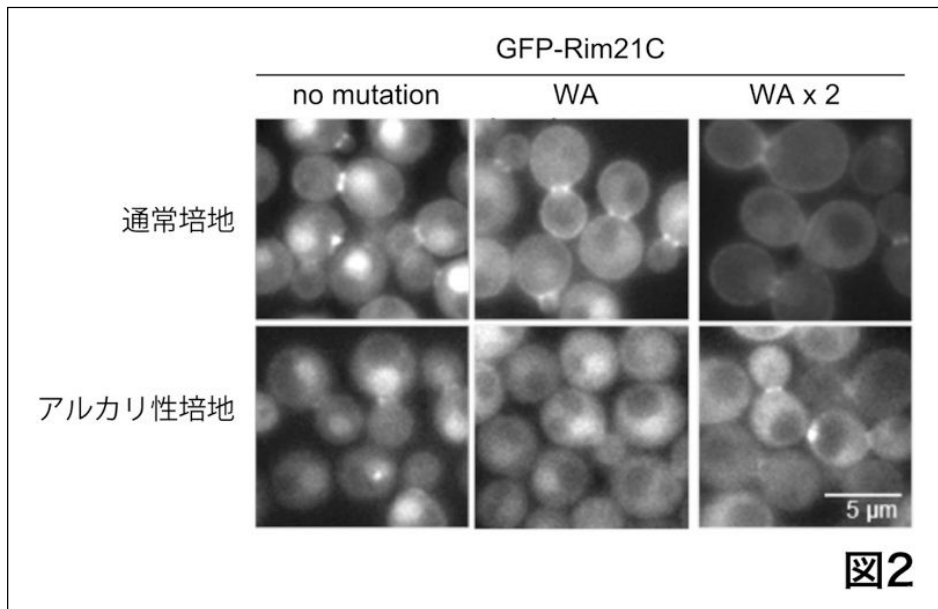


図2

(3) 動植物細胞・個体で機能する脂質非対称バイオセンサーのコンストラクトを作製した。これまでに植物培養細胞、植物個体、動物培養細胞、線虫個体で発現するプロモーターに GFP-Rim21C およびその改良版を連結したコンストラクトが完成した。動物培養細胞と線虫個体に関してはパイロット実験を開始した。今後、これらのツールを用いて動植物の膜現象に関する新たな知見を得られるであろう。

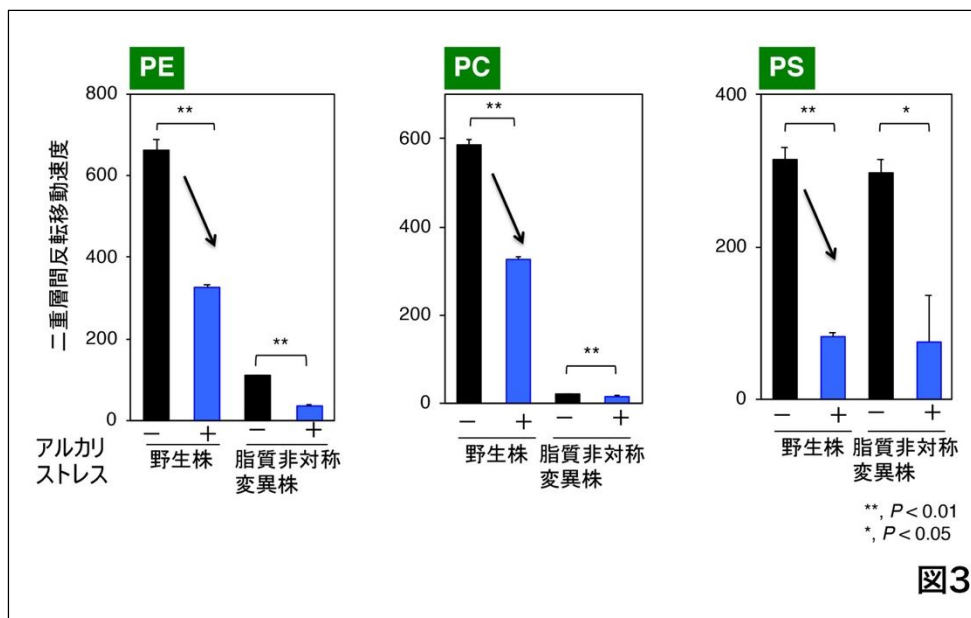


図3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Obara Keisuke, Kotani Tetsuya, Nakatogawa Hitoshi, Kihara Akio, Kamura Takumi	4. 巻 45
2. 論文標題 <i>N</i>-glycosylation of Rim21 at an Unconventional Site Fine-tunes Its Behavior in the Plasma Membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.19021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安田有那、小原圭介、嘉村巧
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称バイオセンサー開発の試み
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Obara K, Yasuda A and Kamura T
2. 発表標題 Development of a biosensor for the plasma membrane lipid asymmetry
3. 学会等名 29th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田有那、小原圭介、嘉村巧
2. 発表標題 細胞外刺激と細胞膜脂質非対称の関係性の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原圭介、安田有那、嘉村巧
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称バイオセンサーの開発
3. 学会等名 第19回日本蛋白質学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019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	小原 圭介 (Obara Keisuke) (30419858)	名古屋大学・理学研究科・助教 (13901)	