

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03180

研究課題名(和文)リン脂質スクランブリングの分子機構

研究課題名(英文)Mechanisms of phospholipid scrambling on the plasma membranes

研究代表者

鈴木 淳 (Suzuki, Jun)

京都大学・高等研究院・教授

研究者番号：30511894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞はエネルギーを用いて物質の非対称性分布を構築し、それを速やかに変化させることで環境変化に柔軟に対応している。これまで、ナトリウムイオンやカルシウムイオンなどのイオンの非対称性分布の変化については多くの研究がなされてきたが、脂質の非対称性分布の変化については未だ不明な点が多い。本研究においては、我々がこれまでに同定した細胞膜スクランブラーゼXkrファミリー、TMEM16ファミリー以外のスクランブラーゼを同定することを目的として研究を進め、cDNAライブラリースクリーニング、CRISPRスクリーニングによって、ATP1a1変異体の存在下で活性化するスクランブラーゼが存在することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜の非対称性分布の変化は様々な局面で機能し、生体の恒常性維持を担う。例えば、死細胞で脂質の非対称性が変化した時には、貪食細胞によって貪食されるための"Eat-me Signal"として機能し、出血時には血小板で脂質の非対称性が変化することで血液凝固が開始されそれらの異常は遺伝病を発症する。脂質の非対称性変化は様々な生体反応を制御すると考えられているが、その全貌はまだ理解されていない。本研究では、申請者達がこれまでに同定したスクランブラーゼ以外の新しいスクランブラーゼを同定することを目的として研究を進め、ATP1a1の変異体で活性化するスクランブラーゼが存在することを示した点に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Cells establish the asymmetrical distribution of molecules using ATP as an energy and quickly alter them when environmental changes occur. Although there have been many studies on changes in the asymmetry distribution of ions such as sodium and calcium ions, it has been largely unknown how the asymmetry distribution of lipids is changed. In this study, we aimed to identify novel plasma membrane scramblases other than Xkr family and TMEM16 family that we have previously identified. Using cDNA library and CRISPR sgRNA library screening approaches, here we demonstrated that there are scramblases that are activated by ATP1a1 mutants.

研究分野：細胞・臓器リノベーション

キーワード：細胞膜 スクランブラーゼ ATP1a1

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成するリン脂質は非対称性を有しており、ホスファチジルセリン (PS) は細胞膜の内側に位置している。しかしながら、生体内の様々な状況においてこの非対称性は崩壊し、PS は細胞表面に露出する。例えば、活性化した血小板において細胞表面に露出した PS は血液凝固因子が活性化するための足場として機能し、死んだ細胞において表面に露出した PS は貪食細胞に食べられるための "Eat-me" signal として機能する。PS の露出には、リン脂質を双方向に輸送するスクランブラーゼが関わるとされていたがその分子の実体は長らく分かっていなかった。申請者はこれまでに、カルシウムによって活性化されるスクランブラーゼとして TMEM16F、カスパーゼによる切断によって活性化されるスクランブラーゼとして Xkr8 を同定した。この両者のスクランブラーゼは全ての細胞に発現しているが、これらの両者を欠損させた細胞においても増殖時にある頻度でリン脂質がスクランブルすることを見出していた。これは、細胞にはこの 2 つのスクランブラーゼとは異なる別のスクランブラーゼが存在することを示唆している。

2. 研究の目的

本研究においては、このリン脂質スクランブルに関与する新規スクランブラーゼを同定し、その活性化機構、生理的役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

TMEM16F、Xkr8 の両方を欠損させた Ba/F3 細胞 (BDK0) を用いてもある頻度でリン脂質スクランブル (具体的には蛍光標識したホスファチジルコリン (PC) の取り込み) が起こることから、まずは恒常的に PC を取り込む変異細胞を樹立しようと考えた。具体的には、蛍光標識した PC を取り込んだ細胞を FACS によるソーティングによって集め、増殖させた後、再度 PC を取り込ませソーティングを行った。この過程を 19 回繰り返すと、何も刺激が無くとも PC を恒常的に取り込む変異細胞 (PC19 細胞) が得られた (図 1)。

cDNA library screening

PC19 細胞において何らかの遺伝子に変異が導入されている可能性を考え、PC19 細胞より total RNA を調製後、mRNA を精製、逆転写酵素により cDNA を合成し、PCR により二本鎖から成る cDNA を合成した。その後、アガロースゲルに泳動し、cDNA を小さいサイズ (1-2.5kbps) 大きいサイズ (2.5-6kbps) の 2 種類に分け、ゲルから精製後、レトロウイルスベクターに In fusion 法で挿入し cDNA ライブラリーを作製した。大腸菌にエレクトロポレーションによりプラスミドを導入後 (全体で 1000 万クローン)、プラスミドを Maxiprep により精製し、発現クローニングを行った。具体的には、cDNA ライブラリーを HEK293T 細胞にレトロウイルスのパッケージングベクターと共にトランスフェクションし、培養上清よりウイルスを回収した。遠心 (6000 g, 16 hr, 4 °C) によりウイルスを濃縮後、培地に懸濁し、1 細胞に数個のレトロウイルスが感染する条件で BDK0 細胞と反応させた。レトロウイルス感染、2 ~ 3 日後、蛍光標識した PC と反応させ、PC を取り込んだ細胞 (0.5% 程度) を、フローサイトメトリーを用いてソーティングした。1 週間程度培養した後、再び蛍光標識した PC と反応させ、PC を取り込んだ細胞をソーティングした。その結果、2.5-6kbps の cDNA ライブラリーを用いた時のみ 4 回のソーティングで PC を恒常的に取り込む細胞が濃縮されてきた (図 2)。この細胞よりゲノム DNA を精製し、組み込まれた cDNA を PCR によって増幅させ、レトロウイルスベクターに組み込み、再度発現クローニングを行った。その結果、今度は 2 回のソーティングで蛍光標識した PC を取り込む細胞の濃縮がかかった。この細胞よりゲノム DNA を精製し、組み込まれた cDNA のシーケンズ解析を行った。得られた配列を PUBMED のブラストサーチにより解析し、遺伝子を同定した。

sgRNA library screening

発現クローニングによって新規スクランブラーゼの活性化機構についてメカニズムの一端は分かったが、スクランブラーゼ自身は同定されなかった。そこで、PC19 細胞に CRISPR/Cas9 を安定的に発現させた後、レンチウイルスにコードされた sgRNA library (Addgene より入手) を発現させた。この sgRNA library は 1 遺伝子につき 6 つのターゲット配列を保有しており、130,000

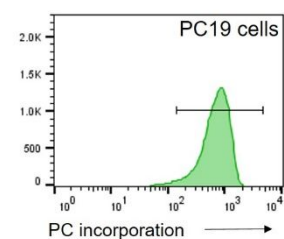
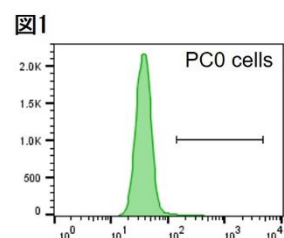
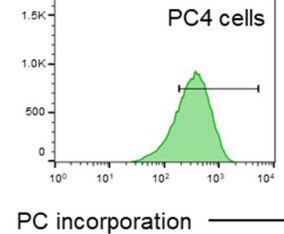
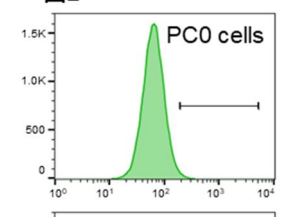


図 2



クローンからなっている。sgRNA の発現から 1 週間後、蛍光標識した PC と反応させ、PC を取り込まなかった細胞を FACS によるソーティングによって集め、増殖させた後、再度ソーティングを行った。その結果、5 回のソーティングで PC を取り込まない細胞集団が得られた。この細胞よりゲノム DNA を精製し、組み込まれた sgRNA を PCR によって増幅した後、次世代シーケンサーによる解析を行った。その後、シーケンス配列のマッピングを行い、1 遺伝子に対するターゲット配列が 6 つ中幾つ同定されたのかとそのリード数の総和を指標に解析を行った。

Revival screening

解析を進めると、目的のスクランブラーゼを欠損した細胞は細胞の増殖が低下することが分かった。これは、スクランブラーゼの活性化に関わる因子の欠損は増殖低下をきたし、通常の方法での同定が困難なことを示している。そこで CRISPR sgRNA library を用いたリバイバルスクリーニングを行った (Maruoka et al., 2021 Mol Cell)。この方法では、レンチウイルスに組み込まれた sgRNA library を PC19 細胞に導入後、スクランブラーゼ活性を失った細胞をソーティングする。増殖による sgRNA にかかるバイアスを避けるため、細胞からゲノム (g)DNA を調製し、組み込まれた sgRNA 領域を PCR で増幅、それを用いて濃縮のかかった sgRNA library を再構築し、スクリーニングを行った。これを数回繰り返すと、sgRNA の導入によりスクランブル活性を失った細胞集団が得られた。そこで、この細胞よりゲノム DNA を精製し、組み込まれた sgRNA 領域を PCR によって増幅した後、次世代シーケンサーによる解析を行った。その後、シーケンス配列のマッピングを行い、1 遺伝子に対するターゲット配列が 6 つ中、幾つ同定されたのかとそのリード数の総和を指標に解析を行った。

4. 研究成果

cDNA library screening

網羅性の高い cDNA library を作製することには成功し、それを用いた発現クローニングによって、Na/K-ATPase の ATP1a1 を同定した。興味深いことに、同定したのは野生型の ATP1a1 ではなく点変異体であった。実際に、野生型ではなく変異体 ATP1a1 を BDK0 細胞に発現させた時にリン脂質スクランブル活性が誘導された。変異体 ATP1a1 発現細胞において、Ouabain や Oligomycin で ATPase 活性を抑制するとスクランブル活性が失われることから、変異体 ATP1a1 は ATPase 活性依存的に脂質スクランブルを誘導していることが分かった。

sgRNA library screening

sgRNA library screening を行った結果、ATP1a1 遺伝子のターゲット配列が 4 つ同定されたことから実験系が機能していると結論付けた。ATP1a1 はスクランブラーゼ活性に必要なことから、発現クローニングで得られた点変異体は、機能獲得型であると考えている。また、スクリーニングにおいてトップで得られた因子は、機能未知の多重膜貫通タンパク質 (mpSCR) であり、スクランブラーゼの候補因子として同定することに成功した。実際に mpSCR をロックアウトするとスクランブラーゼ活性が失われることが分かった。

Revival screening

リバイバルスクリーニングによって、ATP1a1 以外にスクランブラーゼの活性化に必要な因子を複数得た。それらの因子を欠損させるとスクランブル活性が低下することが分かった。また、得られた因子の免疫沈降、質量分析を行うと、それらは ATP1a1 変異体と複合体を形成していることが分かった。これは ATP1a1 変異体が形成する複合体が mpSCR の活性を制御していることを示している。

以上より、本研究において、Xkr8、TMEM16F の非存在下で A 活性化するスクランブラーゼを同定することを目的として 3 種類のスクリーニングによるアプローチを行い、最終的にスクランブラーゼ候補因子 (mpSCR)、また活性化複合体 (ATP1a1 変異体複合愛) を同定することに成功した点において本研究は意義があると考えられる。今後は、mpSCR がどのように活性化するのを明らかにすると共に、ATP1a1 変異体が形成する複合体の構造解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Maruoka M & *Suzuki J. | 4. 巻 167 |
| 2. 論文標題 Regulation of phospholipid dynamics in brain. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Neurosci Res. | 6. 最初と最後の頁 30-37 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.01.003 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Maruoka M, Zhang P, Mori H, Imanishi E Packwood D, Harada H, KosakoH & *Suzuki J. | 4. 巻 81 |
| 2. 論文標題 Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Mol Cell. | 6. 最初と最後の頁 1397-1409 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2021.02.025 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 鈴木 淳 | 4. 巻 269 |
| 2. 論文標題 細胞膜リン脂質スクランプリングの分子機構 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 医学のあゆみ | 6. 最初と最後の頁 1051-1054 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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29件（うち招待講演 22件 / うち国際学会 8件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 スクリーニングによって明らかになった細胞膜リン脂質スクランブルの活性化 |
| 3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 複数のアンバイアスクリーニングにより脂質動態のメカニズムに迫る |
| 3. 学会等名 第61回日本生化学会 中国・四国支部例会『病態生化学の最前線』（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 Mechanisms of neuronal diseases caused by defects in plasma membrane dynamics and its treatment |
| 3. 学会等名 Annual Meeting of the AMED-FORCE |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 “Eat-me” signal for brain development |
| 3. 学会等名 Scrap & Build Meeting (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 Revival screening: identifying genes from dying cells |
| 3. 学会等名 Cell death 学会評議員会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 Glycolipid synthesis in Golgi Apparatus |
| 3. 学会等名 第 93 回日本生化学 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 ~ 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 Unbiased screening-based exploration of lipid dynamics |
| 3. 学会等名 第 15 回日本トランスポーター学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 ~ 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 Phospholipid scrambling and rare diseases |
| 3. 学会等名 India-Japan Webinar on "Rare Genetic Disorders" (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 ~ 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 Revival screening: identifying genes from dying cells |
| 3. 学会等名 Cell Death コロキアム、オンライン会議 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 ~ 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 Phospholipid scrambling on plasma membrane |
| 3. 学会等名 The IBMS-iCeMS bilateral symposium (Taiwan-Japan) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 細胞膜脂質動態の理解とその応用 |
| 3. 学会等名 Annual Meeting of the AMED-PRIME |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 Mechanisms of neuronal diseases caused by defects in plasma membrane dynamics and its treatment |
| 3. 学会等名 Annual Meeting of the AMED-FORCE |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|-------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木淳 |
| 2. 発表標題 細胞膜脂質動態の制御機構 |
| 3. 学会等名 AMED 脂質領域会議 |
| 4. 発表年 2020年～2021年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 細胞膜脂質動態の制御機構並びにその応用 |
| 3. 学会等名 AMED脂質領域会議（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 細胞膜脂質動態の異常による神経疾患発症の理解並びにその治療戦略の提案 |
| 3. 学会等名 AMED-FORCEグループ会議（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 Unbiased screening-based biology |
| 3. 学会等名 WPI-ASHBi Retreat（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 Unbiased screening-based exploration of biological phenomenon ~lipid scrambling~ |
| 3. 学会等名 第13回ABCセミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 Unbiased screening-based understanding of lipid dynamics |
| 3. 学会等名 第24回細胞生理学セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 細胞膜脂質動態の異常による神経疾患発症の理解並びにその治療戦略の提案 |
| 3. 学会等名 AMED-FORCE領域会議（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Jun Suzuki |
| 2. 発表標題 On-site lab in Academia Sinica -with iCeMS Taiwan Office- |
| 3. 学会等名 Kyoto University-Academia Sinica Bilateral Symposium（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Jun Suzuki |
| 2. 発表標題 iCeMS Taiwan Office |
| 3. 学会等名 NCKU-iCeMS-ASHBi-joint Meeting（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Jun Suzuki |
| 2. 発表標題 On-site lab in Academia Sinica -with iCeMS Taiwan Office- |
| 3. 学会等名 Kyoto University International Symposium on Education and Research in Global Environmental Studies in Asia (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Jun Suzuki |
| 2. 発表標題 Phospholipid scrambling on plasma membranes |
| 3. 学会等名 1st Research Meeting on Cell Dynamics (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Jun Suzuki |
| 2. 発表標題 Unbiased screening-based exploration of biological phenomenon |
| 3. 学会等名 IBMS Seminar (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 Mechanisms of phospholipid scrambling on plasma membranes |
| 3. 学会等名 日本生化学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 "Eat-me signal"-mediated Scrap & Build |
| 3. 学会等名 Scrap & Build Meeting (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 細胞膜脂質動態の制御機構並びにその応用 |
| 3. 学会等名 AMED-PRIME領域会議 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Jun Suzuki |
| 2. 発表標題 Cellular and molecular sensing by the scramblase |
| 3. 学会等名 Academia Sinica /Kyoto University bilateral symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 淳 |
| 2. 発表標題 Mechanisms of lipid scrambling at intracellular organelles |
| 3. 学会等名 小野財団シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

不要な細胞の除去機構の発見 -核内因子が直接細胞膜に作用する！-
<https://www.icems.kyoto-u.ac.jp/news/3946/>

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|