

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07265

研究課題名(和文)カルシウム依存性に起こる細胞内ホスファチジルセリンの分布変化

研究課題名(英文)Calcium-dependent changes in intracellular phosphatidylserine distribution

研究代表者

辻 琢磨 (Tsuji, Takuma)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：40725628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ホスファチジルセリン(PS)は主要な負電荷リン脂質であり、細胞表面膜では細胞質側リーフレットに豊富で、外層に少ない非対称性に分布する。細胞膜タンパク質TMEM16FはCa<sup>2+</sup>により活性化され、細胞質側PSを外層に輸送することが報告されている。我々は急速凍結・凍結切断レプリカ標識法を用いて、MEF細胞の小胞体膜ではPSは細胞質側リーフレットに豊富な非対称性分布であり、細胞質Ca<sup>2+</sup>濃度上昇により、小胞体膜タンパク質TMEM16K依存的に内腔側リーフレットに輸送されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜スクランブラーゼTMEM16F/ANO6は細胞内カルシウム濃度の上昇により活性化し、細胞質側のPSを細胞外側に輸送する。細胞内にもTMEM16ファミリー分子が存在し、全身性に発現するTMEM16K/ANO10は脊髄小脳変性症の原因遺伝子である。本研究で得られた成果は基礎生物学分野のみならず、医学的にも重要性が高いと言える。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylserine (PS) is a major anionic phospholipid. Asymmetric distribution of PS in the plasma membrane is well established, and Ca<sup>2+</sup>-activated TMEM16F-dependent scrambling of PtdSer has been shown. In the present study, we developed a freeze-fracture electron microscopy method that can define the PS distribution in the individual leaflets of cellular membranes. Using this method, we found that the ER of mouse embryonic fibroblasts harbored abundant PS in the cytoplasmic leaflet and much less in the luminal leaflet. Significant amount of PS appeared in the luminal side of the ER upon treatment with the Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 for 10 min. Interestingly, the A23187 treatment also increased PS in the nuclear membrane. This Ca<sup>2+</sup>-induced PS redistribution was not observed in TMEM16K KO cells, but was recovered in cells re-expressing Flag-TMEM16K. The results indicate that TMEM16K mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid scrambling in the ER.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ホスファチジルセリン スクランブラーゼ 電子顕微鏡 凍結切断レプリカ標識法 小胞体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルセリン (PS) は生体膜に豊富に存在する負電荷リン脂質であり、細胞表面膜 (細胞膜) においては細胞質側に偏って分布し、正電荷タンパク質の局在を制御することが知られている。また様々な刺激に応じて細胞表面へ露出すること、すなわち分布が変化することがアポトーシス細胞のクリアランス、血液凝固、筋管形成など生理的に重要であることが知られている。しかしながら細胞内については、PS 分布は十分には明らかではなく、PS の機能解明を阻んできた。

なぜ PS 分布解析は十分ではなかったのか？ PS の細胞内局在解析は主に細胞質に発現させた蛍光タグ PS 結合タンパク質 (蛍光 PS プローブ) を用いて行われてきた。この方法によって貴重な知見が得られてきたが、一方、無視できない方法上の問題も存在する。例えば、細胞質中の PS プローブは内在性の PS 結合タンパク質と競合阻害を起こすことが容易に予想される。そのため、シグナルがない=PS が存在しないと結論することは難しい。また、細胞質中の蛍光 PS プローブでは脂質二重層のうち細胞質側しか解析できないことも弱点となる。これらの問題を克服し真の細胞内 PS 分布を解き明かすために我々は急速凍結・凍結割断レプリカ標識電子顕微鏡法による PS 可視化技術を確立した。本法により脂質二重層の両リーフレットについて、ナノスケールの PS 局在解析が可能になった。その結果、我々はこれまでの通説とは異なり、小胞体膜細胞質側に非対称性に PS が分布すること、さらに細胞質  $Ca^{2+}$  の上昇により 10 分以内に小胞体膜内腔側に PS が出現し、同時に内・外核膜脂質二重層の PS 密度が著しく上昇することを見出した。

$Ca^{2+}$  依存的に小胞体膜内腔側層に PS が出現する分子機構として細胞内スクランブラーゼの関与が考えられる。細胞膜では  $Ca^{2+}$  依存性に PS を外層に露出させるスクランブラーゼとして TMEM16F が同定されている。TMEM16 ファミリーのうち TMEM16E と 16K について、小胞体・核膜に局在し且つ PS スクラミング活性を有している可能性が報告されたが、既存の技術では内腔側リーフレットの解析が困難であるため詳細な検証は行われていない。

### 2. 研究の目的

本研究では  $Ca^{2+}$  依存的に細胞内の PS 分布が変化することに注目し、この現象を引き起こす分子機構、そしてその生理的意義を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

予備的解析でマウス胎仔線維芽 (MEF) 細胞では TMEM16K が高発現していることがわかったので、まずは TMEM16K が小胞体膜の PS 分布変化に関与しているかどうかを調べた。具体的にはまず、Crispr-Cas9 システムを利用して TMEM16K ノックアウト細胞を作製した。また、TMEM16K ノックアウト細胞に Flag タグを融合させた Flag-TMEM16K を安定発現させた細胞株を作製した。急速凍結・凍結割断レプリカ標識電子顕微鏡法は下記のように進めた。

(1) 野生型細胞と変異細胞を  $Ca^{2+}$  イオノフォア A23187 で 10 分間処理し、HPM010 により急速凍結した。

(2) 凍結サンプルを予冷したレプリカ作製装置 (BAF400) に移し、凍結状態のままナイフで割断後、白金と炭素を蒸着することで薄膜 (レプリカ) を形成し、薄膜内に脂質分子を物理的に固定した。

(3) レプリカを常温に戻しブロッキング後、GST 融合 PS 結合プローブ (GST 融合 Evectin2-PH ドメイン x2)、ウサギ抗 GST 抗体、Protein A-gold complex (10 nm) により PS を標識し、透過型電子顕微鏡で観察した。

(4) 得られた像から金コロイドの密度を算出した。

### 4. 研究成果

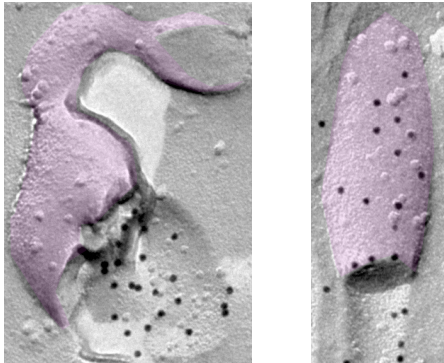
(1) 作製したノックアウト細胞、Flag-TMEM16K 発現細胞の TMEM16K 発現量を、TMEM16K 抗体を用いてウエスタンブロッティング法で確認した。野生型細胞と比較して TMEM16K ノックアウト細胞では TMEM16K 発現がほぼなく、Flag-TMEM16K 発現細胞細胞では強く発現していることがわかった。また、免疫蛍光染色法によち Flag-TMEM16K 発現細胞細胞の Flag-TMEM16K 分布を調べた。Flag-TMEM16K は MEF 細胞の小胞体と核膜に局在していることがわかった。

(2) カルシウム指示薬 Fluo-4 を用いて A23187 処理により、野生型細胞、TMEM16K ノックアウト細胞、Flag-TMEM16K 発現細胞の細胞質  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が同程度起きていることを確認した。

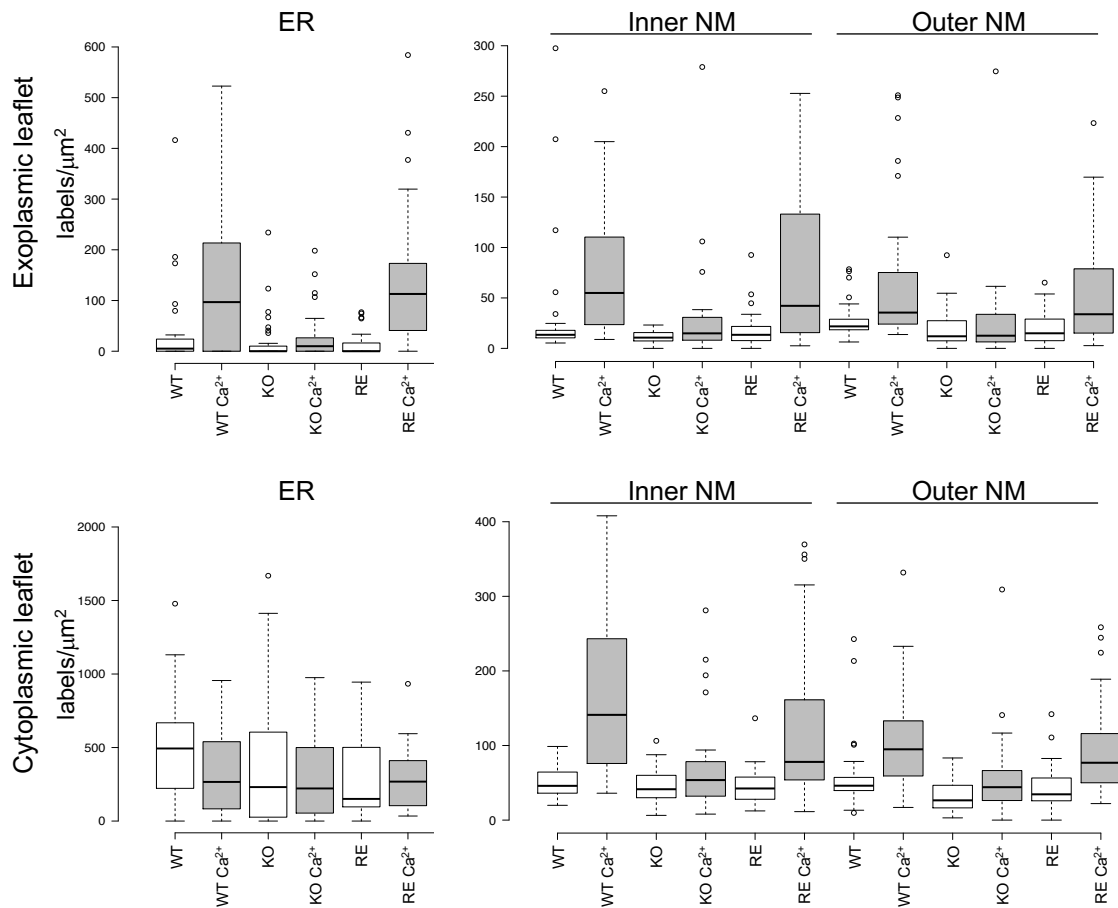
(3) TMEM16K ノックアウト細胞、Flag-TMEM16K 発現細胞の A23187 処理前の細胞内の PS 分布を急速凍結・凍結割断レプリカ標識法で調べ、野生型細胞と差がないことを確認した。

(4) 野生型 MEF 細胞の小胞体では PS は細胞質側リーフレットに偏って存在するが、細胞質  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させると、細胞質側リーフレットの PS が減少し、内腔側リーフレットの PS が増加する (図 1)。急速凍結・凍結割断レプリカ標識電子顕微鏡法による PS 分布解析の結果、今回作製した TMEM16K ノックアウト細胞では、野生型細胞と同様に細胞質  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させても、小胞

体膜内腔側リーフレットでの PS 増加が抑制されることがわかった (図 2)。また細胞質  $Ca^{2+}$  濃度上昇により野生型細胞では内・外核膜の 4 つのリーフレットで PS が増加するが、TMEM16K ノックアウト細胞では、核膜での PS 増加も抑制されることがわかった。一方で、Flag-TMEM16K を戻した細胞を解析したところ、野生型細胞と同様に、細胞質  $Ca^{2+}$  濃度上昇により小胞体膜内腔側リーフレット、内・外核膜の PS が増加することがわかった。これらの結果から、細胞質  $Ca^{2+}$  濃度上昇による PS 分布変化が TMEM16K 依存性に起こること、TMEM16K は小胞体膜・核膜でスクランブラーゼとして機能し、脂質二重層間の PS 分布を変化させていることが強く示唆された。



(図 1) 野生型 MEF 細胞小胞体膜の PS 分布変化。黒点は PS を標識している金コロイド (10 nm)。ピンク色は小胞体膜の内腔側リーフレットを示す。左側は A23187 処理前の細胞、右側は A23187 で 10 分間処理した細胞。A23187 処理により小胞体膜内腔側リーフレットに PS が増加したことがわかる。



(図 2) A23187 処理による PS 標識密度変化。WT : 野生型 MEF 細胞。KO : TMEM16K ノックアウト細胞。RE : Flag-TMEM16K 発現細胞。Exoplasmic leaflet : 内腔側リーフレット。Ca<sup>2+</sup> 上昇による PS 分布変化が TMEM16K に依存して起きていることがわかる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuji Takuma, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Ultrastructural localization of de novo synthesized phosphatidylcholine in yeast cells by freeze-fracture electron microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100990 ~ 100990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mioka Tetsuo, Guo Tian, Wang Shiyao, Tsuji Takuma, Kishimoto Takuma, Fujimoto Toyoshi, Tanaka Kazuma	4. 巻 135
2. 論文標題 Characterization of micron-scale protein-depleted plasma membrane domains in phosphatidylserine-deficient yeast cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs256529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.256529	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 Orii Minami, Tsuji Takuma, Ogasawara Yuta, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 220
2. 論文標題 Transmembrane phospholipid translocation mediated by Atg9 is involved in autophagosome formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202009194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202009194	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 Matoba Kazuaki, Kotani Tetsuya, Tsutsumi Akihisa, Tsuji Takuma, Mori Takaharu, Noshiro Daisuke, Sugita Yuji, Nomura Norimichi, Iwata So, Ohsumi Yoshinori, Fujimoto Toyoshi, Nakatogawa Hitoshi, Kikkawa Masahide, Noda Nobuo N.	4. 巻 27
2. 論文標題 Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-020-00518-w	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 Ogasawara Yuta, Tsuji Takuma, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 108
2. 論文標題 Multifarious roles of lipid droplets in autophagy ? Target, product, and what else?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2020.02.013	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 Tsuji Takuma, Cheng Jinglei, Tatematsu Tsuyako, Ebata Aoi, Kamikawa Hiroki, Fujita Akikazu, Gyobu Sayuri, Segawa Katsumori, Arai Hiroyuki, Taguchi Tomohiko, Nagata Shigekazu, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 116
2. 論文標題 Predominant localization of phosphatidylserine at the cytoplasmic leaflet of the ER, and its TMEM16K-dependent redistribution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 13368 ~ 13373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1822025116	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 Schafer Jasmin A, Schessner Julia P, Bircham Peter W, Tsuji Takuma, Funaya Charlotta, Pajonk Oliver, Schaeff Katharina, Ruffini Giulia, Papagiannidis Dimitrios, Knop Michael, Fujimoto Toyoshi, Schuck Sebastian	4. 巻 39
2. 論文標題 ESCRT machinery mediates selective microautophagy of endoplasmic reticulum in yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e102586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019102586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuji Takuma, Yoshitomi Hiroshi, Ishikawa Yoshie, Koshizaki Naoto, Suzuki Motoshi, Usukura Jiro	4. 巻 15
2. 論文標題 A method to selectively internalise submicrometer boron carbide particles into cancer cells using surface transferrin conjugation for developing a new boron neutron capture therapy agent	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Nanoscience	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17458080.2019.1692178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 辻琢磨, 藤本豊士
2. 発表標題 出芽酵母におけるミクロリポファジー機構の解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsuji T, Shibata R, Fujimoto T
2. 発表標題 Distribution of vacuolar proteins in autophagy deficient yeast
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻琢磨, 藤本豊士
2. 発表標題 電子顕微鏡による膜脂質の解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻琢磨, 藤本豊士
2. 発表標題 膜脂質の対称性・非対称性分布
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第45回関東支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻琢磨
2. 発表標題 電子顕微鏡による膜脂質分子の可視化
3. 学会等名 北海道大学 先端生命科学研究院 細胞装置学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻琢磨、藤本豊士
2. 発表標題 電子顕微鏡による膜脂質局在解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuji T, Cheng J, Tatematsu T, Ebata A, Kamikawa H, Taguchi T, Fujimoto T
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> -dependent phosphatidylserine redistribution in the ER
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻琢磨、藤本豊士
2. 発表標題 形質膜のホスファチジルセリンとカベオラ
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 辻琢磨, 藤本豊士	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 7
3. 書名 The Lipid 小胞体のリン脂質分布制御機構と関連する疾患	

1. 著者名 辻琢磨, 藤本豊士	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 脂質解析ハンドブック 脂質を解析する技術 電子顕微鏡を用いた観察	

〔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		
ドイツ	Center for Molecular Biology	Heidelberg University	