

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16075

研究課題名（和文）CRISPRスクリーニングによる細胞膜脂質とイオンチャネルの機能連関の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of links between membrane lipids and ion channels using CRISPR screens

研究代表者

土谷 正樹 (Tsuchiya, Masaki)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：00837338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞膜に存在するリン脂質分子と膜タンパク質の機能的な関係を明らかにするために、哺乳動物の主要な膜リン脂質であるホスファチジルコリンが細胞膜脂質二重層に正しく分布するために必要な遺伝子群をCRISPRスクリーニングにより同定することを試みた。生合成されたホスファチジルコリンが細胞膜外層に表出する事象に強く寄与する遺伝子としてTMEM30Aを同定した。TMEM30A欠損細胞では、形質膜外層のホスファチジルコリンが減少した一方で他のリン脂質ホスファチジルセリンとホスファチジリエタノールアミンが増加したことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人の健康と疾患に強く関わり薬剤開発の標的分子としてイオンチャネルなどの膜タンパク質は注目されている。その膜タンパク質は膜脂質に覆われた状態で機能している。今回のスクリーニングにより、ヒト細胞の脂質を半分近く占めるホスファチジルコリンの細胞膜分布を制御する因子としてTMEM30Aを発見した。TMEM30Aはいくつかの膜受容体タンパク質の機能に関連することが報告されている。今回の研究結果から、TMEM30Aを介したホスファチジルコリンの分布調節が膜タンパク質の機能発現に寄与する新しい可能性が浮かび上がった。

研究成果の概要（英文）：To study a functional link between membrane lipids and membrane proteins, I conducted CRISPR screens to identify genes that are required for appropriate distribution of phosphatidylcholine in the plasma membrane lipid bilayer. TMEM30A was identified as a major contributor to cell surface translocation of phosphatidylcholine. In the plasma membrane outer layer of TMEM30A-deficient cells, phosphatidylcholine was decreased while phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine were increased.

研究分野：脂質生物学

キーワード：CRISPRスクリーニング ホスファチジルコリン TMEM30A

1. 研究開始当初の背景

最も単純な膜は一種類の脂質から形成され、その中で脂質は自由に動く。しかし、実際の細胞膜は数万種類もの脂質からなり、さらに脂質は種類によって二重層の内外や膜局所で偏って存在している。この細胞膜脂質の多様性と偏在性は、脂質の代謝・輸送・配置を司る様々なタンパク質群により制御されている。生物は莫大な労力を費やしてまで細胞膜に特殊な脂質環境を作り上げるのだろうか。

細胞膜に埋め込まれた膜タンパク質はその周りを取り囲む多数の膜脂質と結合した状態で活動する。とくに、イオンチャネルなどの細胞膜に局在する受容体は多彩な生物現象と疾患の鍵を握るため、その制御機構の解明は生命科学全般の根幹的命題である。精製タンパク質の解析や人工膜への再構成実験から、イオンチャネルの構造と機能は結合脂質の種類とその膜中での位置により制御されることが示されてきた。一方、細胞膜を実際に構成する脂質がイオンチャネルにどのように作用するのか、さらに細胞膜脂質の代謝・動態を司る上流タンパク質がイオンチャネルの機能に影響するのかどうか、依然不明である。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的遺伝子探索法を駆使して、イオンチャネルなどの膜タンパク質の機能制御に関わると考えられる脂質関連タンパク質群の同定を目的とした。つぎに、脂質解析の基盤技術を駆使し、同タンパク質群が制御する脂質の代謝・動態を特定することを目指した。そして、膜脂質環境と膜タンパク質の活性変化の連関を追究し、細胞膜脂質による膜タンパク質の機能制御機構の解明を狙う。

3. 研究の方法

哺乳動物細胞の細胞膜において主要な膜構成分子であるホスファチジルコリンに焦点を当てた。ホスファチジルコリンは細胞膜脂質二重層において外層に多く存在することが知られているが、ホスファチジルコリンの外層・内層間の分布を制御する機構は不明である。当研究では、ホスファチジルコリンを特異的に検出してその分布を解析するために、クリックケミストリーを活用したホスファチジルコリンラベル化法を取り入れた (Chembiochem, 16, 472, 2015; Nat. Chem. Biol, 16, 1631, 2020)。即ち、ホスファチジルコリンの前駆体コリンにクリック反応基のアジドを導入したアジドコリンを内在的な代謝経路を通じて取り込ませることで、アジド導入ホスファチジルコリンの生合成および細胞内輸送を誘導させた。続いて、小胞体 - ゴルジ体選択的な蛍光ラベル化剤および細胞膜選択的な蛍光ラベル化剤により、アジド導入ホスファチジルコリンを蛍光ラベル化した。このとき使用した二つの蛍光ラベル化剤の蛍光色素は異なる蛍光波長をもつため、別々に蛍光量を評価することができる。この原理に基づいて、ゲノムワイド CRISPR-KO ライブラリーを発現するヒト白血病細胞株 K562 について、ホスファチジルコリンを細胞膜および小胞体 - ゴルジ体について蛍光ラベル化して、細胞膜ホスファチジルコリンのみが低下した変異細胞をフローサイトメトリーにより選抜した (図 1)。次世代シーケンサーによる解析により、濃縮された CRISPR-KO のバーコード sgRNA 配列を定量評価した。ヒト遺伝子約 2 万個について遺伝子ランキングを作成し、上位 100 位に濃縮された遺伝子の一部を個別に再解析して、細胞膜および小胞体 - ゴルジ体のホスファチジルコリン量を評価した。

TMEM30A-KO 細胞について、ホスファチジルコリンの代謝動態を詳細に解析するために、安定同位体標識コリンを取り込ませ、細胞総脂質画分および細胞膜画分 (Nat. Protoc., 7, 1042, 2012) から抽出した脂質について質量分析した。また、細胞膜外層におけるホスファチジルセリンとホスファチジルエタノール

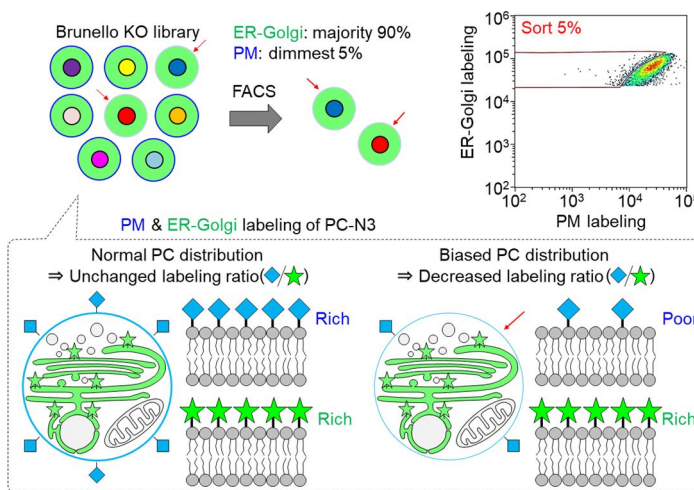


図 1 CRISPR スクリーニングの概要。小胞体 - ゴルジ体 (ER-Golgi, green) および細胞膜 (PM, blue) のホスファチジルコリンを蛍光標識して、フローサイトメトリーにより、細胞膜のホスファチジルコリン (PC) が低下した細胞を選抜した。

アミンの分布を解析するために、特異的な蛍光プローブのアネキシンVおよびデュラマイシンを用いたフローサイトメトリーを行った。さらに、細胞膜外層のみの脂質分子を定量解析するために、アルファメチルシクロデキストリンを用いて外層の脂質を抽出し (PNAS, 113, 14025, 2016)、質量分析を行った。

4. 研究成果

スクリーニングの結果、表1に示す12個の遺伝子が同定された (ネガティブコントロールに対して小胞体 - ゴルジ体の蛍光ホスファチジルコリン量が60%以上かつ細胞膜の蛍光ホスファチジルコリン量が80%以下を与える遺伝子欠損細胞)。

表1 同定された遺伝子。

Gene	Function
TMEM30A	Phospholipid translocation
TRAPPC2L	ER-Golgi vesicular transport
RAB5C	Endosomal trafficking
RAB11FIP4	Endocytic recycling
NUS1	Dolichol biosynthesis
SERAC1	Phospholipid remodeling
APOL6	Lipid transport
PITPNB	PI and PC transfer
AGPAT1	de novo phospholipid synthesis
RILP	Endosome-lysosome transport
SEC23B	ER-Golgi vesicular transport
SRSF6	Alternative mRNA splicing

今回のスクリーニングで上位に検出された TMEM30A 欠損細胞は、形質膜外層の蛍光ホスファチジルコリン量はコントロール細胞に対しておよそ半分以下にまで減少した一方で、小胞体 - ゴルジ体の蛍光ホスファチジルコリン量はほとんど変化しなかった。このことから TMEM30A はホスファチジルコリンの生合成レベルは変化させずに、形質膜外層へのホスファチジルコリンの転移に影響を与えることが示唆された。安定同位体コリンから生合成されるホスファチジルコリンの質量分析の結果から、全細胞中および形質膜内外層のどちらにおいてもホスファチジルコリンの量的な変化は認められなかった。このことから、TMEM30A が欠損しても、小胞体およびゴルジ体におけるホスファチジルコリンの合成、並びに形質膜全体へのホスファチジルコリンの輸送については影響が無いことが分かった。

TMEM30A は形質膜の外層から内層へとアミノリン脂質 (ホスファチジルセリンおよびホスファチジルエタノールアミン) を輸送するフリッパーゼ (P4 型 ATPase) の必須サブユニットとして知られている。今回解析した TMEM30A 欠損細胞について、形質膜外層のホスファチジルセリンおよびホスファチジルエタノールアミンをフローサイトメトリーにより解析した結果、どちらのアミノリン脂質についてもコントロールに比べて細胞膜外層への表出が増加していた。さらに、細胞膜外層の脂質を質量分析した結果、内在性のホスファチジルコリン量が TMEM30A 欠損細胞で低下し、ホスファチジルエタノールアミン量が増加していた。これらの結果より、TMEM30A は細胞膜外層におけるホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンのリン脂質の量的バランスを維持する役割を担うことが明らかとなった (図2)。

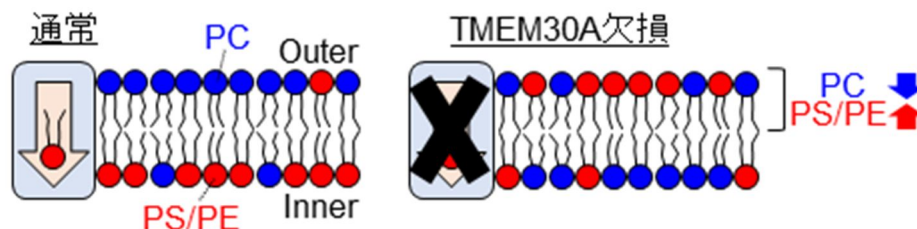


図2 TMEM30A が維持する細胞膜外層のホスファチジルコリンの量的バランス。通常、ホスファチジルコリン (PC) は主に外層に多く存在し、内層にホスファチジルセリン (PS) とホスファチジルエタノールアミン (PE) が局在する。TMEM30A が欠損すると、細胞膜外層の PC 量が減少する一方で、PS と PE は増加した。

TMEM30A は細胞膜におけるイオンチャネルや受容体の機能に関与することが知られている (Nat. Commun. 9, 2049, 2018; Nat. Med. 26, 577, 2020)。今回明らかになった TMEM30A を介した細胞膜外層のホスファチジルコリンの量的変化が今後タンパク質の機能制御にどのように関与するのか、将来的に解明されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Tsuchiya Masaki, Tachibana Nobuhiko, Nagao Kohjiro, Tamura Tomonori, Hamachi Itaru	4. 巻 -
2. 論文標題 Organelle-selective click labeling coupled with flow cytometry allows high-throughput CRISPR screening of genes involved in phosphatidylcholine metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.04.18.488621	査読の有無 無
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 Tsuchiya Masaki, Tamura Tomonori, Hamachi Itaru	4. 巻 1
2. 論文標題 Organelle Selective Labeling of Choline Containing Phospholipids (CPLs) and Real Time Imaging in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Protocols	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpz1.105	査読の有無 無
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 0件）

1. 発表者名 土谷正樹、浜地 格
2. 発表標題 脂質代謝・動態の遺伝子基盤の解明に向けたオルガネラ選択的脂質ラベリングとCRISPRスクリーニングの融合手法
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土谷 正樹、田村 朋則、藤沢 有磨、沈 佑穎、浜地 格
2. 発表標題 オルガネラ選択的リン脂質ラベリングと細胞内動態イメージング
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土谷 正樹、浜地 格
2. 発表標題 オルガネラ選択的脂質ラベリングの新展開(1): 遺伝子スクリーニングへの展開
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土谷 正樹、浜地 格
2. 発表標題 クリックケミストリーを駆使したフローサイトメトリー(click-FC)による生細胞内での脂質代謝動態の高速解析: 脂質制御遺伝子の探索に向けた CRISPR スクリーニングへの応用
3. 学会等名 第63回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2021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