

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22394

研究課題名(和文)リン脂質の分布を人為的に制御する方法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a method to control distribution of phospholipids in biological membranes

研究代表者

瀬川 勝盛 (Segawa, Katsumori)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：20542971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞膜リン脂質の分布を任意に制御する方法の確立を目指した。具体的に、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を特異的に外層から内層へ移層するリン脂質フリッパーゼの基質特異性を改変することで、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンを外層から内層に移層させる新しいリン脂質フリッパーゼを樹立することを目指した。結果として、フリッパーゼの基質特異性を変化させる膜貫通領域のアミノ酸変異を同定することに成功した。この変異フリッパーゼを細胞に発現させることで、細胞膜リン脂質の分布様式に変化を与えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、任意のリン脂質を移層させる分子を樹立できれば、「細胞がなぜ、その場所のリン脂質をその組成・その分布様式にする必要があるのか?」といった問いに、実験的に答えをだすことが可能となり、リン脂質の分布という生物学の根幹的な現象の理解に大きく貢献することができる。また、各オルガネラや膜タンパク質、シグナル伝達分子の研究においても、リン脂質の分布が各種機能に役割を担うことが提唱されつつあり、改変フリッパーゼが作製できればその波及効果は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a method to control the distribution of cell membrane phospholipids. By modifying the substrate specificity of phospholipid flippases that specifically translocate phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine, we tried to establish a new phospholipid flippase that translocates phosphatidylcholine and sphingomyelin. As a result, we succeeded in identifying an amino acid mutation in the transmembrane region that alters the substrate specificity of the flippase. By expressing this mutant flippase in cells, we were able to change the distribution of cell membrane phospholipids.

研究分野：医化学、分子遺伝学

キーワード：細胞膜 リン脂質 ATPase フリッパーゼ 基質特異性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞の細胞膜は、非対称なリン脂質二重層で構成される。すなわち、アミノリン脂質であるホスファチジルセリン(PS)とホスファチジエタノールアミン(PE)は細胞質側の内層に限局し、ホスファチジルコリン(PC)やスフィンゴミエリン(SM)は主に外層に分布する。この細胞膜におけるリン脂質の非対称的な分布は、哺乳類細胞に保存される根幹的な膜構造の形態であるが、「なぜこのリン脂質の組成で、この分布様式でなければいけないのか？」あるいは「なぜ、進化の過程でこのようなリン脂質の分布様式が選択されてきたのか？」という問題について明確な答えが得られていない。原因として、特定のリン脂質の非対称分布だけを崩壊させた哺乳類細胞を樹立するのが困難なこと、あるいは、リン脂質の分布を人為的に操作する手法が確立されていないことから、その生物学的な意義を解析できないという問題点があった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞膜リン脂質の分布を任意に制御する方法の確立を目指した。具体的に、PS と PE を特異的に外層から内層へ移層するリン脂質フリッパーゼの基質特異性を改変することで、PC や SM を外層から内層に移層させる新しいリン脂質フリッパーゼを樹立する。この改変フリッパーゼを各種細胞に発現させることで、本来細胞膜の外層に存在する PtdCho や SM が内層に濃縮された細胞を作出し、この変異細胞の性質を解析することで「なぜ、全ての哺乳類細胞は PC や SM を外層に濃縮させないといけないのか」という問いに答えを出すことを目指す。さらに、PC や SM のみならず、任意のリン脂質を移層するフリッパーゼの樹立を試み、新しいリン脂質の分布様式をもつ哺乳類細胞を創出し、その生物学的特徴を解析することを目指した。

3. 研究の方法

フリッパーゼは、細胞膜の PS と PE を特異的に外層から内層へ移層させることで非対称分布を維持する。10 回膜貫通型のタンパク質の P4 型 ATPase ファミリーに属する ATP11A と ATP11C が哺乳類細胞の細胞膜で機能するフリッパーゼである。この ATP11A や ATP11C にノンバイアスに変異を導入し、PC や SM をとりこむ変異体を樹立することを目指した。具体的に、ATP11A や ATP11C の膜周辺領域に error-prone PCR 法を用いてランダムに変異を導入し、 10^7 スケールの変異体ライブラリーを作製する。次いで、変異体ライブラリーをリンパ球系細胞にレトロウイルスを用いて安定発現させ、細胞膜における PC や SM に対するフリッパーゼ活性を蛍光標識した PC や SM プロブを用いてフローサイトメトリーで定量する。通常、細胞膜は PC や SM を取り込まない。しかし、PC や SM を取り込むフリッパーゼ変異体を発現した細胞は、蛍光標識プロブを細胞膜の内層に取り込むことで高い蛍光値を示し、フローサイトメトリーで検出・回収することが可能である。この操作を繰り返すことで、変異細胞の集団から、PtdCho や SM を取り込む改変フリッパーゼを発現する細胞の濃縮を試みる。変異細胞の濃縮に成功した場合、これらの細胞から DNA を回収し、挿入されたウイルス配列を次世代シーケンサーで決定する。細胞濃縮操作の前後で、どのアミノ酸変異が濃縮されたかを解析し、PC や SM を移層させる変異を同定する。この方法により、本来存在しない PC や SM を強く移層させる改変フリッパーゼの作製に成功した場合、改変フリッパーゼを各種細胞に発現させ、実際に PC や SM が外層でな

く内層に濃縮されているかを確認する。PC や SM の分布に変化が見られた場合、どのような細胞機能に変化があるかを、形態観察、細胞増殖、シグナル伝達、ストレス応答などを、顕微鏡観察、Micro array 法、質量分析法、Proteomics 法などを用いて網羅的に解析する。

4 . 研究成果

当初の研究計画に則り、フリッパーゼの変異体ライブラリーを作製した。この変異体ライブラリーの解析途中に、共同研究により、重篤な発達障害や神経障害を示す患者にフリッパーゼの点変異を見出した。この点変異は、フリッパーゼの膜貫通領域のアミノ酸を一残基だけ置換した。この点変異を導入したフリッパーゼ変異体を血球系の細胞株に発現させると、PS や PE を内層に移層するとともに、本来基質とならないリン脂質を内層に強く取り込むことを見出した。すなわち、この点変異はフリッパーゼの基質特異性を大きく変化させることを明らかにした。現在、この点変異周辺のアミノ酸に変異を導入し、さまざまなリン脂質を移層できるフリッパーゼ変異体の作製を試みている。ついで、この変異フリッパーゼを発現した細胞の形態や増殖能を解析した。その結果、変異細胞の定常状態におけるサイズが野生型に比し減少すること、また、増殖能が低下することを見出した。さらに、この変異細胞では、細胞膜リン脂質の組成や動態に大きな変化が生じることを明らかにした。現在、同定した点変異をもつ遺伝子改変マウスを作製し、解析を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakanishi Hanayo, Nishizawa Tomohiro, Segawa Katsumori, Nureki Osamu, Fujiyoshi Yoshinori, Nagata Shigekazu, Abe Kazuhiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Transport Cycle of Plasma Membrane Flippase ATP11C by Cryo-EM	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108208 ~ 108208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108208	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 Nagata Shigekazu, Segawa Katsumori	4. 巻 68
2. 論文標題 Sensing and clearance of apoptotic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Immunology	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) 10.1016/j.coi.2020.07.007	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 Nakanishi Hanayo, Irie Katsumasa, Segawa Katsumori, Hasegawa Kazuya, Fujiyoshi Yoshinori, Nagata Shigekazu, Abe Kazuhiro	4. 巻 295
2. 論文標題 Crystal structure of a human plasma membrane phospholipid flippase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10180 ~ 10194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014144	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 Ryoden Yuta, Fujii Toshihiro, Segawa Katsumori, Nagata Shigekazu	4. 巻 204
2. 論文標題 Functional Expression of the P2X7 ATP Receptor Requires Eros	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 559 ~ 568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900448	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 Nagata Shigekazu, Sakuragi Takaharu, Segawa Katsumori	4. 巻 62
2. 論文標題 Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Immunology	6. 最初と最後の頁 31 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coi.2019.11.009	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 Ryoden Yuta, Fujii Toshihiro, Segawa Katsumori, Nagata Shigekazu	4. 巻 204
2. 論文標題 Functional Expression of the P2X7 ATP Receptor Requires Eros	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 559 ~ 568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900448	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 Nagata Shigekazu, Sakuragi Takaharu, Segawa Katsumori	4. 巻 62
2. 論文標題 Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Immunology	6. 最初と最後の頁 31 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coi.2019.11.009	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 瀬川 勝盛	4. 巻 91
2. 論文標題 ホスファチジルセリンの移層と死細胞の認識機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 743 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910743	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 瀬川勝盛、長田重一	4. 巻 72
2. 論文標題 リン脂質フリッパーゼとB細胞分化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 80-86
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 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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 瀬川勝盛、領田優太、長田重一
2. 発表標題 リン脂質が司る生命現象と疾患
3. 学会等名 第53回 生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬川勝盛
2. 発表標題 Plasam membrane flippase: physiology & pathology
3. 学会等名 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 共同研究拠点研究集会 第一回細胞死 Colloquium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀬川勝盛
2. 発表標題 細胞膜の非対称性と脆弱性
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナー P5 細胞死研究の新展開（招待講演）
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