

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06636

研究課題名(和文) CRISPRゲノムワイドスクリーニングによるマクロピノサイトーシス制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of regulators of macropinocytosis by a genome-wide CRISPR/Cas9 screen

研究代表者

坂巻 純一 (Sakamaki, Jun-ichi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：10825938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マクロピノサイトーシスは細胞膜のラメリポディアの伸長と退縮により、細胞外液とそこに含まれる高分子を細胞内に取り込み、リソソームで分解する機構である。本計画では、マクロピノサイトーシス制御遺伝子を同定するために、CRISPR-Cas9システムを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。平行して行った研究により、真核細胞においてオルガネラ膜を構成するリン脂質がユビキチン化されることを発見した(Mol Cell 2022)。また、オートファジー活性レポーターを用いたCRISPRスクリーニングを行い、プリン核酸合成がオートファジーを負に制御することを発見した(J Biol Chem. 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチンとタンパク質の共有結合は真核細胞で普遍的に見られる修飾反応である。ユビキチン化は標的タンパク質の分解や性質の変化をもたらすシグナルとして働き、細胞の恒常性を維持する上で重要な働きを担っている。この機構の破綻はがん、神経変性、感染症などの疾患に関連することが示唆されている。ユビキチン化の標的は長らくタンパク質のみであると考えられてきたが、本研究ではオルガネラ膜を構成するリン脂質であるホスファチジルエタノールアミンがユビキチン化されることを明らかにした。多くの生命現象や疾患に関連することが知られているユビキチンの全く新しい機能を解明し、ユビキチン化修飾の概念や考え方を変える新発見である。

研究成果の概要(英文)：Macropinocytosis is a process that delivers extracellular molecules to lysosomes for degradation. To identify novel regulators of micropinocytosis, I performed a genome-wide CRISPR-Cas9 screen using fluorescent labeled albumin.

I also focused on the regulatory mechanism of organellar function and dynamics. I have discovered that the phospholipid phosphatidylethanolamine is ubiquitinated in eukaryotic cells (Sakamaki J et al. Mol Cell 2022).

To identify negative regulators of autophagy, we performed a genome-wide CRISPR-Cas9 screen using the quantitative autophagic flux reporter GFP-LC3-RFP. We found that knockout of the purine synthesis enzyme PFAS activates autophagy and purine nucleoside synthesis negatively regulates autophagy (Mimura, Sakamaki, et al. J Biol Chem. 2021).

研究分野：細胞生物学

キーワード：マクロピノサイトーシス CRISPR-Cas9 ユビキチン リン脂質 オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マクロピノサイトーシスは細胞膜のラメリポディアの伸長と退縮により、細胞外液とそこに含まれる高分子を細胞内に取り込み、リソソームで分解する機構である。この機構はがん細胞で活性化しており、その生存と増殖のためのエネルギー供給源となっていることが示唆されている。しかし、この経路の分子制御機構は未だ不明な点が多く、特異的な阻害法が確立していない。

2. 研究の目的

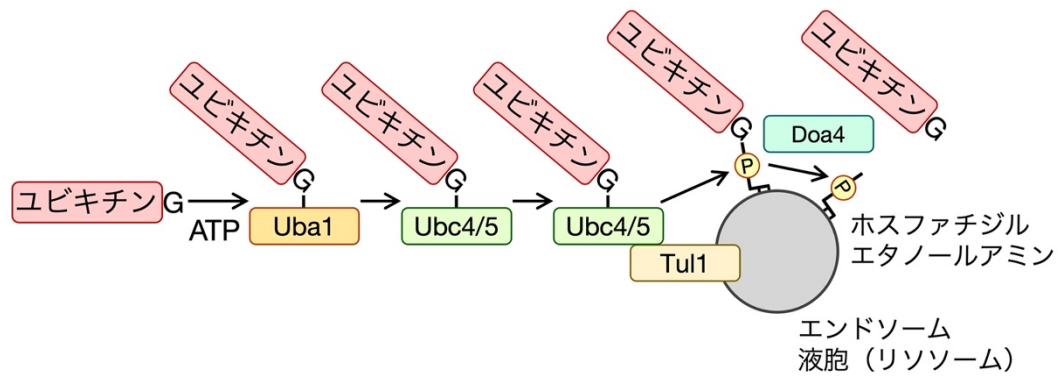
本研究では、マクロピノサイトーシス制御遺伝子を網羅的に同定するために、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。

3. 研究の方法

活性型変異体 KRas G12V を有し、Cas9 を発現する HEK293T 細胞を作製し、19,050 遺伝子を標的とした sgRNA ライブラリーを導入した。作製した細胞を用いて、2 種類の確立したマクロピノサイトーシスプローブである DQ-BSA と 70 kDa デキストランの細胞への取り込みをフローサイトメトリーにより検出した。プローブの蛍光強度が低い細胞集団下位約 5% の細胞集団をクロピノサイトーシス不全細胞集団として分取した。分取した細胞を増幅させ、同様の操作を繰り返し、マクロピノサイトーシス不全細胞の濃縮を試みた。

4. 研究成果

異なるプローブで複数回のスクリーニングを行った。また、平行して膜のユビキチン修飾に焦点を当てて研究を行い、真核細胞においてオルガネラ膜を構成するリン脂質、ホスファチジルエタノールアミンがユビキチン化されることを発見した (Sakamaki et al. Mol Cell 2022)。PE ユビキチン化は、エンドソームやリソソームなどのオルガネラやバキュロウイルスでみられる。この修飾はタンパク質のユビキチン化と同様の反応によって触媒されており、出芽酵母においてはユビキチン活性化 (E1) 酵素 Uba1、ユビキチン結合 (E2) 酵素 Ubc4/5、ユビキチンリガーゼ (E3) Tul1 が一連の反応を担う (図)。PE と結合したユビキチンは、脱ユビキチン化酵素 Doa4 により除去されるか、あるいは液胞へ運ばれて分解される。PE と結合したユビキチンは膜の変形や切断に関与する ESCRT タンパク質複合体をエンドソーム膜に引き寄せ、エンドソーム内腔に小胞が形成する過程 (腔内小胞形成) に関わる可能性が示唆された。本発見は、オルガネラの膜を構成するリン脂質そのものがユビキチン化されることを初めて示し、多くの生命現象や疾患に関連することが知られているユビキチンの全く新しい機能を明らかにしたものである。また、オートファジー抑制因子を網羅的に同定するため、オートファジー活性レポーターを用いて CRISPR ゲノムワイドスクリーニングを行った。その結果、プリン核酸合成経路の構成因子 PFAS 酵素の欠損がオートファジーを活性化することが明らかになった。プリン生合成の抑制は TSC-RHEB-mTORC1 シグナル伝達経路に依存してオートファジーを活性化していた。一方、ピリミジン欠乏は、プリン欠乏と異なる経路でオートファジーを活性化していることもわかった。以上、プリン、ピリミジン核酸合成がオートファジーを負に制御するという新規の制御機構が明らかになった (Mimura, Sakamaki, et al. J Biol Chem. 2021)。



図：ホスファチジルエタノールアミンのユビキチン化の分子機序

ユビキチンは E1 酵素 Uba1 (ATP：アデノシン三リン酸が必要)、E2 酵素 Ubc4/5 へと順に受け渡しされ、エンドソームや液胞に存在する E3 酵素 Tul1 が E2 酵素を呼び込み、膜上のホスファチジルエタノールアミンへ共有結合する。G はグリシンを表し、カルボキシ末端のグリシンとホスファチジルエタノールアミンが共有結合する。ホスファチジルエタノールアミンと結合したユビキチンは脱ユビキチン酵素 Doa4 により除去される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mimura Kaito, Sakamaki Jun-Ichi, Morishita Hideaki, Kawazu Masahito, Mano Hiroyuki, Mizushima Noboru	4. 巻 296
2. 論文標題 Genome-wide CRISPR screening reveals nucleotide synthesis negatively regulates autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100780 ~ 100780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100780	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 Iorio Caterina, Rourke Jillian L., Wells Lisa, Sakamaki Jun-Ichi, Moon Emily, Hu Queenie, Kin Tatsuya, Sreaton Robert A.	4. 巻 4
2. 論文標題 Silencing the G-protein coupled receptor 3-salt inducible kinase 2 pathway promotes human cell proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02433-2	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 Latif AL, Newcombe A, ... Sakamaki JI, ... Adams PD.	4. 巻 12
2. 論文標題 BRD4-mediated repression of p53 is a target for combination therapy in AML	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-020-20378-8	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 Klionsky DJ, ... Sakamaki JI, ... et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	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 該当する

1. 著者名 Sakamaki Jun-ichi、Mizushima Noboru	4. 巻 -
2. 論文標題 Ubiquitination of non-protein substrates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tcb.2023.03.014	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 Sakamaki Jun-ichi、Mizushima Noboru	4. 巻 48
2. 論文標題 Cell biology of protein-lipid conjugation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 99~112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.23016	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 Shimasawa Masaru、Sakamaki Jun-ichi、Maeda Tatsuya、Mizushima Noboru	4. 巻 299
2. 論文標題 The pH-sensing Rim101 pathway regulates cell size in budding yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102973~102973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.102973	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 Sakamaki Jun-ichi、Mizushima Noboru	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocol to purify and detect ubiquitinated phospholipids in budding yeast and human cell lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101935~101935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101935	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 Sakamaki Jun-Ichi、Mizushima Noboru	4. 巻 19
2. 論文標題 Conjugation of the ubiquitin family proteins to phospholipids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1361 ~ 1362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2022.2123637	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 Sakamaki Jun-ichi、Ode Koji L.、Kurikawa Yoshitaka、Ueda Hiroki R.、Yamamoto Hayashi、Mizushima Noboru	4. 巻 82
2. 論文標題 Ubiquitination of phosphatidylethanolamine in organellar membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 3677 ~ 3692.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.08.008	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 坂巻純一、水島昇	4. 巻 41
2. 論文標題 細胞小器官の膜リン脂質のユビキチン化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 437 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/7189-00003-0000377-00	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Jun-ichi Sakamaki, Koji L. Ode, Yoshitaka Kurikawa, Hiroki R. Ueda, Hayashi Yamamoto, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Ubiquitination of phosphatidylethanolamine in organellar membranes
3. 学会等名 The 23rd TMIMS International Symposium on "New Frontiers in Ubiquitin Proteasome System" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun-ichi Sakamaki, Koji L. Ode, Yoshitaka Kurikawa, Hiroki R. Ueda, Hayashi Yamamoto, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Ubiquitination of phosphatidylethanolamine in organellar membranes
3. 学会等名 The international symposium in Tokyo 2022 "Ubiquitin New Frontier: from Neo-Biology to Targeted Protein Degradation (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun-ichi Sakamaki, Koji L. Ode, Yoshitaka Kurikawa, Hiroki R. Ueda, Hayashi Yamamoto, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Ubiquitination of phosphatidylethanolamine in organellar membranes
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂巻純一、大出晃士、栗川義峻、上田泰己、山本林、水島昇
2. 発表標題 オルガネラ膜脂質ホスファチジルエタノールアミンのユビキチン化
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun-ichi Sakamaki, Koji L. Ode, Yoshitaka Kurikawa, Hiroki R. Ueda, Hayashi Yamamoto, Noboru Mizushima
2. 発表標題 Ubiquitination of phosphatidylethanolamine in organellar membranes
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂巻純一、大出晃士、栗川義峻、上田泰己、山本林、水島昇
2. 発表標題 オルガネラ膜脂質ホスファチジルエタノールアミンのユビキチン化
3. 学会等名 第33回高遠分子細胞生物学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂巻純一、大出晃士、栗川義峻、上田泰己、山本林、水島昇
2. 発表標題 オルガネラ膜脂質ホスファチジルエタノールアミンのユビキチン化
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂巻純一、大出晃士、栗川義峻、上田泰己、山本林、水島昇
2. 発表標題 Ubiquitination of phosphatidylethanolamine in organellar membranes
3. 学会等名 第21回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022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
---------	---------