

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05983

研究課題名（和文）膜リン脂質を介したpH依存性細胞応答機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of pH-dependent cellular responses mediated by membrane phospholipids

研究代表者

迫 圭輔（SAKO, KEISUKE）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：50786291

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）：細胞は、機械刺激、温度、酸素を含む多様な外環境に対して、適切に反応し適応することで生存が可能になる。重要な外環境の一つに、間質液や血液中のプロトン濃度、すなわち外液pHがあるが、pHに対する細胞の適応機構はそれほど理解されていない。本研究では、外液pH変化に直接接触する細胞膜に着目して解析を行い、細胞膜を構成する膜リン脂質が、その局在を内層から外層に変化させるという、新たな感知・適応機構を見つけた。この機構を制御する膜タンパク質を欠損する個体は異常発生を示すことから、体の中で適切にpH応答することが個体発生に大事であるという知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出した、膜リン脂質のトポロジカルな変化を介した、新規pH応答機構を欠損する個体では、発育不全や胎生致死など様々な表現型を呈することが明らかになってきた。これらの結果は、体の中では常にpHの変動が起きており、うまく対処できない場合には、個体に異常をきたし、最悪死に至る可能性があることを示唆している。今後、例えばpH変動が起きると言われる虚血性心疾患や炎症反応時、またがん組織においてpH応答機構を調べることで、新たな病態の原因解明や新規治療法の確立につながる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Cells survive by responding and adapting to diverse external environments, including mechanical stimuli, temperature, and oxygen. A crucial external factor is the proton concentration in an external fluid pH, for instance, in interstitial fluid and blood. However, the mechanisms of cellular adaptation to pH are not well understood yet. In this study, we focused on the plasma membrane, which is directly exposed to changes in external fluid pH, and discovered a novel adaptation mechanism wherein membrane phospholipids, which constitute the plasma membrane, translocate from the inner to the outer leaflet. Zebrafish embryos without the membrane protein that regulates this mechanism exhibit abnormal development, indicating that an appropriate pH response is vital for proper development.

研究分野：発生生物学

キーワード：pH PIP2 ゼブラフィッシュ 初期発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は、酸性度 (以下 pH)、温度、酸素、力に代表される様々な環境因子から影響を受けて、酵素反応や代謝反応など多くの生理反応が変化する。生存に適さない環境は、細胞にとってストレスになるため、細胞は外環境を感知し適応するため様々な応答機構を獲得している。温度や酸素濃度の変化について、それぞれのセンサーを介した応答機構が理解されている。さらにその後2021年のノーベル賞が温度受容体、触覚受容体に対し授与されたことから、外環境を感知するメカニズムには注目が集まっており、温度や力を感じ取るメカニズムの解明が急速に進んでいた状況があった。それに比べて、細胞外の pH 変化を感知し、応答する機構に関しては、プロトン依存的な G タンパク質共役型受容体やイオンチャネルの発見を皮切りに少しずつ明らかになってきていたが、メカニズムの全容はよく理解されていなかった。特に、一般に外液の pH として考えられている pH7.3 前後の酸性、アルカリ性を感じし区別して適応するようなメカニズムは、よくわかっていない。さらに pH は病的な状態を除き、体内ではほとんど変動がないのではないかと、固定された考えがあり、実際に体の中で起きる間質液や血液中の pH 変化と、それが細胞や組織に与える影響、また pH 変化が引き金となるような生理現象などは、あまり理解されていない状況であった。

2. 研究の目的

細胞外の環境応答としては、まず刺激に対して応答するタンパク質に着目が集まり、これまで報告されている分子の解析、もしくは新しい分子の探索が行われる。本研究では、細胞内と外を隔てる細胞膜に着目して、直接外液に触れる細胞膜脂質そのものを対象として研究することにした。本研究の目的は、外液の pH 変化に対して細胞膜がどのように変化するのかを調べ、細胞膜の変化に依存した新しい pH 応答機構を見つけることである。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュの初期胚を構成する未分化細胞を用いて、pH の変化で誘導される、細胞膜の構成脂質の変化、特に局在の変化を調べる。理由として、ゼブラフィッシュは水性のモデル動物であり、体の pH 恒常性を司る肺と腎臓が成長する以前より、常に外環境の水の pH 変化に晒されながら発生を行う。そのため発生の早い時期の細胞が pH 応答機構を有している可能性が高いのではないかと考えたからである。細胞膜は脂質二重膜からなり、構成する脂質は内層と外層で組成が違うアシンメトリックな脂質分布を示している。これまでに、特に脂質の内層に含まれるフォスファチジルセリンは、アポトーシス細胞において、細胞内のシグナルを受けて内層から外層に移行することで貪食の目印、eat me シグナルとして機能する。外部からの刺激に応じて、内層特異的に局在する脂質が外層に露出することがあるのではないかと仮説を立て各脂質に結合する蛍光プローブを細胞外から添加して、異なる pH 条件における脂質の分布状況を調べる。

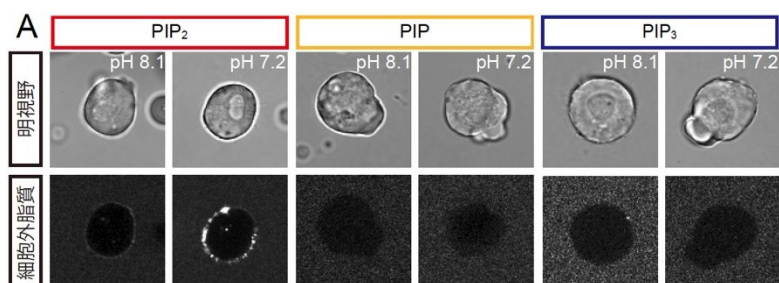
(2) (1)で pH 変化に依存して局在が大きく変化する膜脂質を見つけた段階で、pH 依存的に膜脂質の局在を変化させる分子の同定を行う。トランスポゾンシステムを採用し、ゲノムワイドなランダム遺伝子破壊実験を行う。変異を導入した細胞の中で、pH に反応しなくなり、また脂質の局在変化を起こさなくなった細胞を、FACS を使って分離・濃縮し、pH に反応しない細胞集団を樹立する。樹立した細胞集団の中から、どの遺伝子に変異が入っているか調べることで、pH 依存的に脂質の局在変化を誘導する分子を同定する。

(3) (2)で候補分子を見つけた段階では、まず培養細胞を用いて siRNA を用いたノックダウン実験を行い、候補分子のさらなるスクリーニングを実施する。脂質の局在変化への関与が疑われる分子が見つかり次第、分子の機能解析を行い、キャラクタライズを行う。

(4) (3)の実験で、候補となりうる分子が見つかった段階で、ゼブラフィッシュおよびマウスをモデルとして採用し、遺伝子欠損個体の作成を行う。欠損個体が示す表現型を調べ上げ、表現型を示す細胞の周囲の外液 pH 環境を解析し、pH 変化への適応不全が原因で起きる表現型かどうかを調べていく。

4. 研究成果

(1) まず細胞内の多機能脂質として知られるフォスファチジルイノシトール(PIPs)に着目して実験を行った。PIPs はリン酸基が結合する場所と数に応じて7つの分子種が知

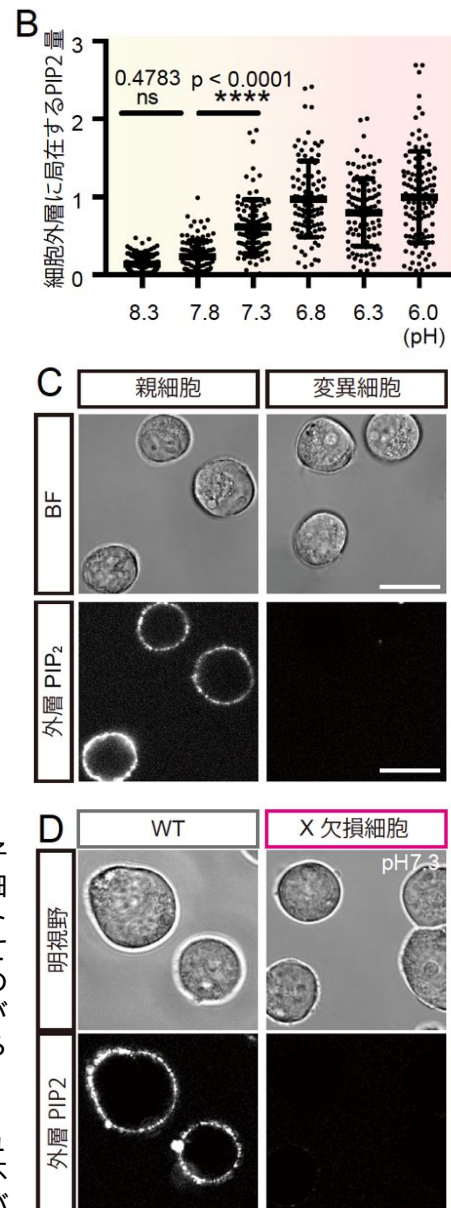


られている。その中で、特に細胞膜の内層に特異的に局在する PIP, PIP₂, PIP₃ について、pH 変化で誘導される局在の変化を調べた。その結果、pH8.1 の条件下ではこれまでの既報通り細胞外に局在している PIPs は検出できなかった。しかし、pH7.2 という弱酸性条件下においては、PIP₂ が特異的に細胞外層に局在している様子が観察された (図 A)。PIP₂ に結合しない変異型プローブは全く細胞外層に結合しないこと、蛍光タンパクの蛍光強度は pH に応じた変化を示さないこと、pH は PIP₂ とプローブの結合能には影響しないことを調べ上げた結論として、細胞外 pH が弱酸性の条件においては、通常細胞内層に局在している PIP₂ が細胞外層に局在を変化させることを突き止めた。続けて、細胞内カルシウム濃度上昇を介した PIP₂ 切断酵素 (Phospholipase C) の活性化を誘導した細胞、もしくは PIP₂ の脱リン酸化酵素 (INPP5E) を過剰発現する細胞においては、弱酸性条件下で細胞外層の PIP₂ 量が減少することから、pH に依存して増加する外層 PIP₂ は、外層で新規合成されたものではなく、内層から外層に移行したものであることが示された。

(2) (1)の結果は、ゼブラフィッシュの未分化細胞だけではなく、ヒトやマウスの細胞でも同様に見られたことから、pH に応じた PIP₂ の局在変化は、種を問わず広く保存された機構であることがわかった。そこで浮遊系の細胞である 293F を用いてスクリーニングを実施した。まず 293F 細胞における PIP₂ の局在変化を調べると、pH7.3 より酸性の条件下で PIP₂ の外層移行が起きることがわかった (図 B)。PiggyBac トランスポゾンを用いて変異を導入した細胞を PIP₂ の外層移行が起きる条件下に置き、その中で PIP₂ の外層移行ができなくなった細胞 (= PIP₂ 結合プローブに反応しなくなった細胞) を分離・増殖させて、変異細胞を樹立した。その結果、樹立した変異細胞では、外層への PIP₂ 移行が著しく低下していることが明らかとなった (図 C)。変異細胞に含まれる PIP₂ の量を質量分析計により調べた結果、細胞内に含まれている PIP₂ 量は、親細胞と同程度であることがわかった。この結果は、PIP₂ の代謝に関与する分子に変異が入ったわけではなく、PIP₂ の移行に関与する分子に変異が入った可能性があることを示唆していた。そこで変異細胞を丹念に調べ上げ、変異が挿入されている可能性がある遺伝子について解析を行った。293F 細胞を用いて、候補分子の siRNA ノックダウンスクリーニングを実施し、PIP₂ の外層移行に関与する可能性が高い膜タンパク質の同定に至った (膜タンパク質 X)。

(3) X はその機能に関して、殆ど報告がない未知の遺伝子であった。そこでまず X の機能を調べる目的で、293F 細胞に CRISPR/Cas9 のシステムを用いて、ノックアウト細胞を樹立した。その結果、ノックアウト細胞においても、ノックダウン細胞と同様に、pH に依存した PIP₂ の外層移行が著しく阻害されていた。この結果は、X が PIP₂ の外層移行に関わる経路のどこかに関与している可能性を示唆していた。

(4) (3)の結果を受けて、X を欠損するゼブラフィッシュおよびマウスを作成した。X を欠損するマウスは発育不全を示し、また発生直後全ての個体が致死になることがわかった。これはすなわち発生直後に起きる pH 変化に対応する X の機能が、個体の発生においては必須となることを示している。一方ゼブラフィッシュでは、通常の pH 条件下で生育する限り成体まで生育することが明らかになった。しかし幼生から成体に発育する過程において、マウス同様著しい発生遅延、発育不全を起こすことが明らかとなった。この結果は、マウスからゼブラフィッシュまで、X に依存した共通の機能が存在し、発生過程に必須となっていることを示している。また pH が低い条件で発生させると、野生型胚に比べて欠損胚では致死となる個体の数が優位に増加することも明らかとなってきた。今後、細胞膜を介した pH 応答機構が、どのような分子メカニズムを介して機能しているか明らかにすることで、変容する pH が生体内でどのような意味を持っているのかを明らかにすることができると期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 迫 圭輔
2. 発表標題 pH-dependent PIP2 translocation system is essential for zebrafish development
3. 学会等名 28回 小型魚類研究会
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
---------	---------