

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19261

研究課題名（和文）オルガネラコンタクトによる細胞膜脂質動態制御タンパク質の活性化機構

研究課題名（英文）Regulation of lipid dynamics on plasma membrane by the organelle contact

研究代表者

鈴木 淳（Suzuki, Jun）

京都大学・高等研究院・教授

研究者番号：30511894

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）：細胞はエネルギーを用いて物質の非対称性分布を構築し、それを速やかに変化させることで環境変化に柔軟に対応している。これまで、ナトリウムイオンやカルシウムイオンなどのイオンの非対称性分布の変化については多くの研究がなされてきたが、脂質の非対称性分布の変化については未だ不明な点が多い。本研究においては、我々がこれまでに同定した細胞膜スクランブラーゼXkrファミリー、TMEM16ファミリー以外のスクランブラーゼを同定することを目的として研究を進め、CRISPRスクリーニングによって、カルシウム刺激で細胞膜と小胞体のコンタクトサイトで活性化するスクランブラーゼが存在することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜の非対称性分布の変化は生体内の様々な局面で機能し、恒常性維持を担っている。例えば、出血時には血小板で脂質の非対称性が変化することで血液凝固が開始され、死んだ細胞で脂質の非対称性が変化した時には、貪食細胞によって貪食されるための"Eat-me Signal"として機能する。脂質の非対称性変化は様々な生体反応を制御すると考えられているが、その全貌の理解にはまだ遠い。本研究では、申請者達がこれまでに同定したスクランブラーゼ以外の新しいスクランブラーゼを同定することを目的として研究を進め、細胞膜と小胞体のコンタクトサイトで活性化するスクランブラーゼが存在することを示した点に意義がある。

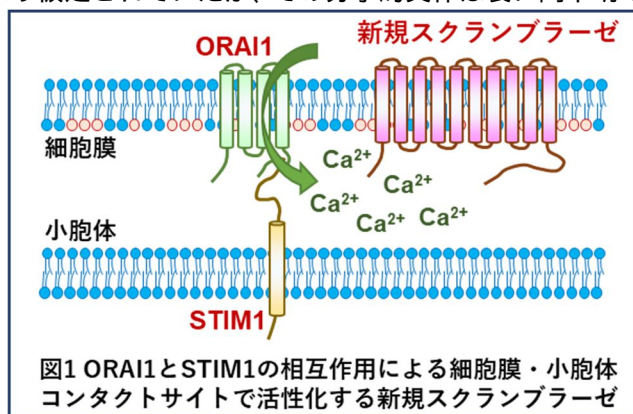
研究成果の概要（英文）：Cells establish the asymmetrical distribution of molecules using ATP as an energy and quickly alter them when environmental changes occur. Although there have been many studies on changes in the asymmetry distribution of ions such as sodium and calcium ions, it has been largely unknown how the asymmetry distribution of lipids is changed. In this study, we aimed to identify novel plasma membrane scramblases other than Xkr family and TMEM16 family that we have previously identified. Using CRISPR sgRNA library screening, here we demonstrated that there are scramblases that are activated at contact sites between the plasma membrane and endoplasmic reticulum upon calcium stimulation.

研究分野：細胞・臓器リノベーション

キーワード：細胞膜 小胞体 コンタクトサイト スクランブラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物において細胞膜を構成するリン脂質は非対称的に存在しており、ホスファチジルセリン (PS) は常に細胞膜の内側に位置している、しかしながらその非対称性は生体内において様々な局面で崩壊し、PS は細胞表面に露出する。この PS を露出するタンパク質はスクランブラーゼとよばれその存在が 1980 年初頭より仮定されていたが、その分子の実体は長い間不明であった。我々はこれまでに、カルシウムによって活性化されるスクランブラーゼとして TMEM16F (Suzuki et al., 2010, Nature)、アポトーシス時にカスパーゼによる切断によって活性化されるスクランブラーゼとして Xkr8 (Suzuki et al., 2013 Science) を同定しているが、その両者がなくとも、細胞膜上のカルシウムチャネル ORAI1、小胞体の STIM1 の相互作用で活性化する新規スクランブラーゼが存在することを見出している (図 1)。



## 2. 研究の目的

本研究では、「細胞膜・小胞体のコンタクトサイトで活性化する新規スクランブラーゼ」の分子の実体を解明し同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### cdNA library screening

これまでの我々の解析において、pro-B 細胞由来の Ba/F3 細胞においてはこの新規スクランブラーゼが存在するが、T 細胞由来の WR19L 細胞においてはこのスクランブラーゼが存在しないことを見出している。また、CRISPR screening によってスクランブラーゼは同定されなかったことから、機能喪失スクリーニングによっての分子同定が困難であると考えられた。そこで本研究では、Ba/F3 細胞より調製した cdNA library を用いて WR19L に発現させることで、スクランブラーゼ活性をもつ遺伝子の発現クローニングに挑戦した。発現クローニングにおいて最も重要なのは cdNA library の質である。これまでの研究で作製した cdNA library においては、cdNA の末端に同じアダプターを付加するため、遺伝子がベクターに双方向に挿入されることが問題であった。そこで本研究においては、Directional cloning system を用いてベクターに正方向にのみ遺伝子を挿入できるシステムを採用した。これにより、TMEM16F<sup>-/-</sup> Xkr8<sup>-/-</sup> の Ba/F3 細胞の cdNA を用いて 100 万クローンからなる cdNA library の作製に成功した。

### Proximity labeling assay

細胞膜に存在する ORAI1 は小胞体の STIM1 が結合することで活性化するカルシウムチャネルである。これまでの我々の解析において、新規スクランブラーゼは ORAI1 と STIM1 の相互作用する「オルガネラコンタクトサイト」に存在し、ORAI1 によるカルシウムの流入時、局所的な高濃度のカルシウムによって活性化することを見出している。そこで本研究では、Proximity labeling assay を並行して進め、新規スクランブラーゼを同定することを試みた。ORAI1 の C 末端の細胞質側にピオチンライゲーション活性を持つバクテリア由来のタンパク質を改変した TurboID を付加してピオチンを含む培地で培養し、質量分析によりタンパク質同定を行った。

### Revival screening

目的のスクランブラーゼを欠損した細胞は、細胞の増殖が低下する可能性を考えて、CRISPR sgRNA library を用いたリバイバルスクリーニングを行った。この方法では、レンチウイルスに組み込まれた sgRNA library を導入後、細胞にカルシウム刺激を行い、スクランブラーゼ活性を失った細胞をソーティングする。増殖による sgRNA にかかるバイアスを避けるため、細胞から gDNA を調製し、組み込まれた sgRNA 領域を PCR で増幅、それを用いて濃縮のかかった sgRNA library を再構築し、スクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

### cdNA library screening

網羅性の高い cdNA library を作製することには成功したが、それを用いた発現クローニングによってスクランブラーゼを同定することはできなかった。

### Proximity labeling assay

質量分析により ORAI の近傍に存在する因子として STIM1、STIM2 などを得ることに成功したが、スクランブラーゼの候補因子を得ることはできなかった。

### Revival screening

リバイバルスクリーニングによって、STIM1, STIM2 などのポジティブコントロールが得られ、スクランブラーゼの候補因子を得ることに成功した。

以上より、本研究においては小胞体、細胞膜のコンタクトサイトで活性化するスクランブラーゼを同定することを目的として3つのアプローチを行い、最終的にスクランブラーゼの候補因子を同定することに成功した点において意義があると考ええる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 18件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Jun Suzuki
2. 発表標題 Phospholipid scrambling on plasma membrane
3. 学会等名 iCeMS-MacDarmid Institute Online Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 不要な細胞の除去機構 -細胞膜脂質動態の観点から-
3. 学会等名 生物物理学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 リン脂質スクランブルタンパク質の制御
3. 学会等名 AMED-CREST/PRIME 脂質輸送体関連分科会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 リバイバルスクリーニング：死にゆく細胞を用いた遺伝子同定
3. 学会等名 生命科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 リバイバルスクリーニング：死にゆく細胞からの遺伝子同定
3. 学会等名 新学術領域研究「配偶子インテグリティ」第3回 若手・公募班研究集会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 細胞内脂質スクランブルタンパク質の制御
3. 学会等名 AMED-CREST/PRIME PIPs関連分科会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 除去の細胞生物学
3. 学会等名 第29回Cell death学会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 脳内の不要細胞の除去機構
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Jun Suzuki
2. 発表標題 Unbiased screening-based exploration of lipid scrambling
3. 学会等名 CMUH/iCeMS Joint Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Jun Suzuki
2. 発表標題 iCeMS strategy in Taiwan
3. 学会等名 iCeMS Crossing (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 細胞膜脂質動態の異常による神経疾患発症の理解並びにその治療戦略の提案
3. 学会等名 AMED-FORCE 研究報告会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 細胞内代謝系とリン脂質スクランブラーゼの接点
3. 学会等名 AMED-PRIME 領域会議
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 Unbiased-screening based exploration of biological phenomenon
3. 学会等名 理研BDR技術交流セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Jun Suzuki
2. 発表標題 Renovation of human organ by elimination of unwanted materials
3. 学会等名 2021 Japan-Taiwan symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 細胞内代謝による細胞膜脂質動態の制御
3. 学会等名 第2回Cell Deathコロキアム（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 Cell Biology in iCeMS
3. 学会等名 WPI AD/AO site visit（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Jun Suzuki
2. 発表標題 Unbiased screening-based exploration of biological phenomenon
3. 学会等名 NTU & Kyoto University Strategic Partnership Matching event (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 Nanometrology and Imaging (1)
3. 学会等名 NanoLSI-iCeMS Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 Regulation of phospholipid scrambling on plasma membrane
3. 学会等名 AMED 脂質領域会議
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 From basic researches through translational medicine to applications in prevention, diagnosis and therapies.
3. 学会等名 MOU ceremony of CMUH and KUIAS/iCeMS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年



1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 Mechanisms of lipid dynamics, elimination, and renovation
3. 学会等名 Seeds-needs matching (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 革新的技術の創成による脂質を介した細胞間相互作用の解明
3. 学会等名 第2回創発の場 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木淳
2. 発表標題 In vivoスクリーニングにより精子インテグリティの解明に迫る
3. 学会等名 新学術領域研究「配偶子インテグリティ」領域会議 (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------