

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15060

研究課題名（和文）オルガネラへの脂質分配と細胞分裂を調和させる分子機構の解明

研究課題名（英文）Study on subcellular lipid redistribution during cell growth

研究代表者

土谷 正樹 (Tsuchiya, Masaki)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：00837338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳動物細胞の細胞分裂を可能にするオルガネラ間の脂質動態を遺伝子レベルで解明するために、細胞内の局所的にリン脂質分子ホスファチジルコリン(PC)を蛍光標識し、CRISPRスクリーニングを実施した。PCのデノボ合成や小胞体-ミトコンドリアのPC輸送に重要な遺伝子群の同定に成功した。PCへの関与が既知の遺伝子だけでなく、これまで見つかっていなかった新規の遺伝子も発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCはヒト細胞の総脂質の約半分程度を占める主要な脂質代謝物である。PCの代謝動態の異常は細胞・生体活動の不調と強い関連がある。本研究で同定した遺伝子は、PCが作用する生理/病理プロセスの機序解明の鍵となることが期待される。特に、PC代謝動態はヒトの脂質代謝系における中心的な位置にあるため、脂質代謝異常を伴う疾患・肥満・老化の理解深化・予防に向けて、今後の同定遺伝子の解析が役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：CRISPR screening coupled with spatially-limited fluorescent labeling of phosphatidylcholine (PC) lipids was developed to identify genes involved in lipid metabolism in mammalian cell growth. The genes included regulators of de novo PC biosynthesis, PC transfer between endoplasmic reticulum and mitochondria.

研究分野：脂質代謝

キーワード：CRISPRスクリーニング リン脂質 ホスファチジルコリン クリックケミストリー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞を含む真核生物は、細胞増殖の過程で生体膜を構成する脂質を合成し、オルガネラ膜に供給し、膜タンパク質の機能発現の足場となる膜脂質環境を形成する。ホスファチジルコリン(PC)はヒト細胞の総脂質のおよそ半分程度を占める主要なリン脂質である。PC デノボ合成は脂質代謝系において中心的な経路であり、PC 合成不良は細胞レベルでは増殖不良を招き、生体レベルで肝臓・筋・網膜疾患などをもたらす。PC 代謝は細胞分裂・細胞増殖の進行と関連して、制御されることが知られるが、そのメカニズムおよび鍵となる制御因子は知られていない。ヒト細胞のゲノムは約2万種類の遺伝子を含むが、脂質解析の技術的な難しさから、個々の遺伝子が脂質の代謝動態にどのように寄与するのか網羅的な解析は未踏であった。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト細胞における PC 代謝動態に重要な遺伝子群を同定し、特に、細胞分裂・増殖に重要な因子を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

プール型 CRISPR スクリーンへの展開を目指して、クリックケミストリーを用いた PC への蛍光ラベル化法とフローサイトメトリーを融合した手法を構築することとした。まず、コリンにクリック反応基を導入したアジドコリン(cho-N3)を細胞に与え、内在性代謝機構によりアジド PC (PC-N3)を生合成させ、細胞内に分配させた。次に、蛍光反応試薬で細胞を処理し、狙いのオルガネラでのみアジド PC を蛍光ラベル化した。このとき、ラベル化 PC の蛍光波長と蛍光強度は位置と量を表すことから、フローサイトメトリーを用いて、1細胞中の PC 代謝動態の情報を高速解析した。上の手法を最適化した後、プール型 CRISPR-KO ライブラリーに適用し、PC 合成不良またはオルガネラ間の PC 分配異常を表現型にもつ変異細胞を FACS により選抜した。ゲノム DNA を抽出し、PCR を行い、NGS 解析を行った。変異細胞サンプルに濃縮された sgRNA 配列を解析し、候補遺伝子を解析した。PC 代謝動態への関連が強く示唆される遺伝子について、CRISPR-KO 細胞を作成し、特性解析した。

4. 研究成果

K562 細胞はコリン欠損培地で通常時に比べ cho-N3 から PC-N3 への生合成活性が増強することを利用し、コリン欠乏下で PC-N3 量が低下した変異細胞をスクリーニングした。GeCKO V2 sgRNA library A を用いて小胞体-ゴルジ体局在型クリック色素(BDP-DBCO)で蛍光ラベル化した後に、蛍光強度が下位1%の細胞集団を分取した。濃縮された sgRNA の NGS 解析および統計解析した結果、全19050個からなる遺伝子ランキングにおいて PCYT1A が上位61位にヒットした。このことは、今回のスクリーニングが PC 合成不良を表現型とする細胞群を濃縮できていることを示唆した。さらにランキング上位の候補遺伝子群を個別に解析すると、上位93位にヒットした遺伝子 CHEK1 を標的とする sgRNA を発現する細胞において、sgPCYT1A 発現細胞と同様の PC-N3 レベルの低下を認めた。さらに、遺伝子 CHEK1 がコードするタンパク質 CHK1 に対する阻害剤実験から、CRISPR-KO と同様な PC-N3 レベルの低下が認められた。CHK1 は CDC25A-

CDK2 経路により細胞周期を制御することが知られていることから、CHK1 阻害剤および CDK2 阻害剤を同時投与したところ、PC-N3 の蛍光低下が解消された。さらの PC 合成の律速酵素 PCYT1A についてリン酸化状態を解析すると、C 末端のリン酸化レベルが CHK1 阻害剤で増加したが、CDK2 阻害剤の共処理で低下した。これらのことから、CHK1-CDC25A-CDK2 経路は PCYT1A の C 末端のリン酸化制御を通じて PC 合成を制御することが示唆された。

またミトコンドリア PC 動態を指標としたスクリーニングを実施したところ、STARD7 が再現性良くランキング上位に得られた。これは STARD7 がミトコンドリアへの PC 輸送に重要である過去の先行研究とよく合致した(JBC, 285, 7358 (2010))。また、これまで PC 代謝への寄与が知られていないミトファジー関連遺伝子 PELO も発見され、STARD7-KO 細胞と同様な PC 分布異常の表現型を示し、PC 分布変化への新規な寄与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Masaki Tsuchiya, Nobuhiko Tachibana, Kohjiro Nagao, Tomonori Tamura, Itaru Hamachi	4. 巻 -
2. 論文標題 Organelle-selective click labeling coupled with flow cytometry allows pooled CRISPR screening of genes involved in phosphatidylcholine metabolism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	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） 10.1016/j.cmet.2023.02.014	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 Tsuchiya Masaki, Tachibana Nobuhiko, Hamachi Itaru	4. 巻 4
2. 論文標題 Flow cytometric analysis of phosphatidylcholine metabolism using organelle-selective click labeling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102525 - 102525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102525	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 -

〔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 土谷正樹
2. 発表標題 コリン欠乏により誘導される細胞死の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（名古屋国際会議場）
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
---------	---------