

研究題目 脂質動態を制御する新規タンパク質の同定

研究組織

研究代表者：鈴木 淳（京都大学高等研究院 物質 - 細胞統合システム拠点）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

研究背景

細胞膜を構成するリン脂質は非対称性を有しており、ホスファチジルセリン (PS) はフリッパーゼによって細胞膜の内側に保たれている。しかしながら生体内における様々な条件下においてその非対称性は崩壊する。この過程にはリン脂質を双方向に区別なく輸送するスクランブラーゼが関与しており、結果として PS は細胞表面に露出する。細胞表面に露出した PS は、死んだ細胞がマクロファージによって貪食される "Eat-me" signal として機能する等、細胞外へ種々のシグナルを伝達していると考えられている。我々はこれまでに、この細胞膜脂質動態を制御するタンパク質を複数同定してきた (Suzuki et al., 2010 *Nature*; Suzuki et al., 2013 *JBC*; Suzuki et al., 2013 *Science*; Suzuki et al., 2014 *JBC*; Suzuki et al., 2016 *PNAS*)。2017 年に申請者の鈴木が京都大学で研究室を主宰してからは、cDNA library スクリーニングや CRISPR/Cas9 sgRNA library スクリーニングを組み合わせることで、世界に先駆けてスクランブラーゼの活性化因子 (Maruoka et al., *Mol Cell*) を同定した。また、細胞内の代謝状態に依存して活性化される新しい脂質スクランブリング経路を同定することにも成功している (unpublished results)。これらの同定した活性化因子や新規スクランブラーゼと相互作用するタンパク質を調べる過程で小迫英尊教授との共同研究を開始した。

研究目的

本研究では、新規スクランブラーゼ、そのサブユニット、並びにその活性化因子等を BioID 法や免疫沈降-質量分析を用いたプロテオーム解析により同定することで細胞膜構成脂質の動態を起点としたシグナル機構を解明し、生物学・医学の

発展に寄与することを目的とする。

研究概要

申請者の鈴木はこれまで、cDNA library スクリーニングや CRISPR/Cas9 sgRNA スクリーニングなどのアンバイアススクリーニングをベースとして、未解明な部分が多い細胞膜脂質動態の制御機構を明らかにしてきた。この細胞膜脂質動態研究を、「タンパク質の制御機構」という点から発展させるために、小迫英尊教授によるプロテオーム解析が不可欠であると考えた。特に、プロテオーム解析は私たちが重要だと考える「アンバイアスな方法論」をベースとしており、小迫教授の生物学的基盤に基づく質量分析における解析力は必須である。Candidate アプローチによるバイアスのかかったタンパク質を調べるのではなく、真に重要なタンパク質をプロテオーム解析で明らかにすることにより細胞膜脂質動態制御機構の本態に迫ることができると考える。既に共同研究の成果を論文として発表しており (Maruoka et al., *Mol Cell*)、共同研究により研究が加速することが期待される。

[1-2]研究の方法・経過

BioID 法を用いてスクランブラーゼ、並びに活性に関わる分子同定を同定することを目的として研究を進める。

これまでにユビキタスに発現している 2 種類の細胞膜スクランブラーゼ、TMEM16F、Xkr8 を同定した。しかしながらこれら 2 つのスクランブラーゼをリンパ球系細胞株において欠損させても、カルシウムイオノフォア A23187 を用いた高濃度のカルシウムの細胞質内への流入により PS が細胞表面に露出することが分かった。これは、リンパ球系細胞株において、未同定の細胞膜スクランブリング経路が存在していることを意味してい

る。そこで、*TMEM16F*、*Xkr8* ダブルノックアウト細胞に CRISPR/Cas9 を発現させ sgRNA library スクリーニングを行った。その結果、細胞膜と小胞体のコンタクトサイトに存在する複数のタンパク質を同定することに成功した。これら同定した因子をノックアウトすると A23187 刺激後の PS 露出は抑制された。これより、細胞膜と小胞体のコンタクトサイトで活性化する新規脂質スクランブル経路が存在することが分かった。また、新規スクランブラーゼは細胞膜と小胞体のコンタクトサイト近傍に位置すると考えられた。近傍にいるタンパク質を同定する場合、近傍タンパク質をビオチン化するために BioID が用いられているが、それよりも速いスピードでのビオチン化が可能な TurboID を本研究では用いた。すなわち、CRISPR スクリーニングで同定した細胞膜・小胞体コンタクトサイトに存在するタンパク質に TurboID を付加させ、A23187 刺激後、近傍にいるタンパク質をビオチン化させ、Tamavidin 2_REV でビオチン化ペプチドを精製後、質量分析によりビオチン化されたタンパク質を網羅的に同定することを計画した。

これまでに細胞膜・小胞体コンタクトサイトに存在するタンパク質のノックアウト細胞に TurboID を付加したタンパク質を発現させ、スクランブル活性が回復すること、並びにビオチン化が起こることを確認している。また予備的な実験として、ビオチンを細胞に加えて 10 分後という短い時間で調製した細胞溶解液を解析したところ、ビオチン化されたタンパク質を質量分析で同定できる感度であることも確認済みである。本共同利用ではこの細胞を用いて、細胞膜・小胞体コンタクトサイトの近傍にいるタンパク質を網羅的に同定し、同定された候補因子を CRISPR sgRNA で破壊しその効果を検証する。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

TurboID による解析によって CRISPR sgRNA library スクリーニングで得られた複数の因子を同定することに成功した。ゆえにこのスクリーニングで得られた分子群が同じ細胞膜・小胞体コンタクトサイトに存在することが確認された。また同様に複数の細胞膜タンパク質が得られた。これらの中に、新規脂質スクランブルリング因子が存在するのか今後解析を進める。具体的には、現在進行中である CRISPR sgRNA library を用いたリバイバルスクリーニングによって同定された因子と共通のものを最終候補とする予定である。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究では新規スクランブルリング経路を制御する細胞膜・小胞体コンタクトサイトの分子群の解析を行った。本研究により、CRISPR で同定された分子群が TurboID でも同定されたことから、これらは同じ細胞膜・小胞体コンタクトサイトに位置すると考えられた。ゆえに、新しいスクランブル経路の全貌解明に近づいたと考える。またコンタクトサイトは様々なオルガネラに存在しており、今後同様の手法で様々なコンタクトサイトの構成因子が同定されることが期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

【圓岡真宏, Panpan Zhang, 鈴木 淳】不要細胞における“eat-me”シグナルの露出に関する DNA 修復タンパク質 XRCC4 の新たな役割 2021 年 9 月 39 (14)

[3-2] 学会発表

2021 年 4 月 15 日 iCeMS-MacDarmid Institute Online Workshop On line ZOOM

2021 年 5 月 20 日 生物物理学セミナー On line ZOOM

2021 年 6 月 24 日 AMED-CREST/PRIME 脂質輸送体関連分科会 On line ZOOM

2021 年 7 月 1 日 生命科学シンポジウム On line ZOOM

2021 年 7 月 5 日 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 On line ZOOM

2021 年 7 月 14 日 AMED-CREST/PRIME PIPs 関連分科会 On line ZOOM

2021 年 7 月 26 日 第 29 回 Cell death 学会 On line ZOOM

2021 年 7 月 29 日 第 44 回日本神経科学大会 On line ZOOM

2021 年 7 月 31 日 CMUH/iCeMS Joint Meeting On line ZOOM

2021 年 10 月 6 日 AMED-FORCE 研究報告会 On line ZOOM

2021 年 10 月 7 日 AMED-PRIME 領域会議 On line ZOOM

2021 年 11 月 9 日 理研 BDR 技術交流セミナー On line ZOOM

2021 年 11 月 11 日 2021 Japan-Taiwan symposium On line ZOOM

2021 年 11 月 17 日-18 日 第 2 回 Cell Death コロキアム On line ZOOM

2021 年 11 月 19 日 横浜市立大学大学院生命医学研究科講義 On line ZOOM

2021 年 12 月 15 日 WPI AD/AO site visit On line ZOOM

2021 年 12 月 22 日 NTU & iCeMS Strategic Partnership Matching event On line ZOOM

2022 年 1 月 12 日 NanoLSI-iCeMS Joint Symposium On line ZOOM

2022 年 1 月 13 日 AMED 脂質領域会議 On line ZOOM

2022 年 1 月 22 日 MOU ceremony of CMUH and KUIAS/iCeMS On line ZOOM

2022 年 1 月 27 日 Seeds-needs matching On line ZOOM

2022 年 3 月 7 日 第 2 回創発の場 On line ZOOM

2022 年 3 月 15 日 新学術領域研究「配偶子インテグリティ」領域会議 On line ZOOM

【4】今後の課題等

TurboID で同定した分子とリバイバルスクリーニングで同定した分子の解析を行う。