

細胞の動的・高次構造体
2020 年度採択研究者

2021 年度 年次報告書

土谷 正樹

京都大学大学院 工学研究科
助教(青藍プログラム)

ゲノムレベルで細胞内脂質ダイナミクスを解明するラベル化戦略

§ 1. 研究成果の概要

本年度は、哺乳動物細胞の主要なリン脂質分子ホスファチジルコリン(PC)を標的として、オルガネラレベルでのPCの細胞内空間分布情報に基づいた遺伝子スクリーニング法を開発し、実証した。本手法では、PCの前駆体物質コリンにクリック反応基を導入したアジドコリンを細胞に取り込ませた後、細胞内に生じたアジド導入PCをオルガネラ選択的に蛍光ラベル化する。この蛍光ラベル化PCの蛍光強度は特定のオルガネラの位置情報およびPCの量的情報を含む。フローサイトメトリーを利用して1細胞の蛍光強度を計測することで、PCの細胞内空間分布をハイスループットに解析することが可能になり、プール型CRISPRスクリーニングに応用できると考えた。ヒト遺伝子約2万個をそれぞれ破壊したCRISPR-KOライブラリーを構成する細胞プールから、PCの蛍光強度が変化した遺伝子変異細胞を蛍光活性化セルソーティング(FACS)により選別した。続いて、次世代シーケンスおよび個別遺伝子に対するバリデーションを行った。小胞体とゴルジ体を選択的なスクリーニングからは、PCの生合成経路に関与することが既知の遺伝子PCYT1A、ACACA、SLC25A1を同定した。形質膜に選択的なスクリーニングからは、細胞内小胞輸送経路に関与することが既知の遺伝子SEC23B、RAB5Cなどとともに、非小胞性の脂質輸送タンパク質をコードするPITPNBを同定した。ミトコンドリアに選択的なスクリーニングからは、ミトコンドリアにPCを輸送することが知られるSTARD7を同定した。一連の結果から、PCの細胞内動態の調節に関わる遺伝子群を同定できることを示した。さらに、同定した遺伝子の特性解析により、FLVCR1がコリントランスポーターとして働くことを発見するとともに、形質膜外層にPCを表出するために重要な遺伝子としてTMEM30Aを新規に同定した。