

研究終了報告書

「光による生体膜機能制御」

研究期間：2017年10月～2021年3月（コロナ延長支援：2021年9月まで継続）

研究者：鈴木 友美

1. 研究のねらい

細胞や細胞小器官を囲む膜（生体膜）は脂質とタンパク質を主な構成成分とする。脂質の膜内分布は一様ではなく、外葉・内葉（細胞質側）間で非対称な分布を示す。例えば、通常条件下の内葉ではホスファチジルセリン(PS)やホスファチジリエタノールアミン(PE)が、外葉ではホスファチジルコリン(PC)やスフィンゴ脂質が偏在する。このような脂質の非対称性は、分化・発達段階によって局所的に変化し、その変化が生命活動を支えるための多用な生体膜機能に作用する。この脂質の非対称性の形成・維持を担っているのが脂質輸送体であり、その一つがフリッパーゼである。

フリッパーゼは広く真核生物に保存され、PE、PS、PC などの特異的なリン脂質を細胞質側にATPの加水分解エネルギーを利用して輸送する。出芽酵母では、小胞輸送、細胞骨格であるアクチンの局在変化、細胞の先端成長、細胞増殖にフリッパーゼが関与する。出芽間もない娘細胞の先端ではPEが膜表面に露出し、細胞は先端成長を示す。細胞周期が進行するとPEはフリッパーゼによって内化し、娘細胞は等方成長に変換する。これは、フリッパーゼの活性が限定的な場所で限定的な時刻に制御されていることを示す。哺乳類培養細胞では、細胞運動にフリッパーゼが関与する。スムーズな細胞運動を可能にするには、進行方向に対して細胞の前後で異なる膜ダイナミクスを短時間で制御する必要がある。しかし、フリッパーゼの活性が、どのように時空間的な精密さをもって制御され、その制御により細胞膜の物性がどのように変化し、その変化が細胞膜機能をどのように制御するのか、そのメカニズムは未だ分かっていない。細胞膜のダイナミクスを研究するこれまでの解析では、薬理的な阻害、RNA干渉、恒常的な遺伝子欠損や過剰発現系に依存していた。しかし、これらの方法ではフリッパーゼ活性の精密な制御機序を捉えることができない。また、時空間解像度が低く且つ代償反応が起きる可能性が高いため正確な現象を見ることができない。これらの問題を解決するには、可逆性・即時性・局所性において優れており、かつ侵襲性の低い光操作技術の開発が必要であると考えた。そこで、本研究では「脂質輸送体フリッパーゼの活性を光操作する技術」を確立し、生体膜機能を光制御することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

フリッパーゼ活性を光操作する技術を確立するため、最初に出芽酵母フリッパーゼの活性化因子 Fpk (Flippase kinase) 1p/2p と青色光受容体フォトトロピンのキナーゼ領域の配列相同性に着目した。フォトトロピンは植物特有の光受容体で、N末端側領域に光受容に関与するLOV (Light-Oxygen-Voltage) ドメインを2つ有し、発色団としてFMN (フラビンモノヌクレオチド) を1分子ずつ含む。C末端側領域には情報伝達に関わる Ser/Thr キナーゼ領域が

存在し(図 1)、このキナーゼ領域が Fpks のそれと類似する。この情報を基に解析を行い、*fpk1* Δ *fpk2* Δ 変異による酵母細胞の生育不能性を緑藻クラミドモナスのフォトトロピン (*CrPHOT*) が相補することを報告した(Aihara et al., 2012; 図 2)。このことは、*CrPHOT* がフリッパーゼ活性を光制御する可能性を示す。そこで、

Fpks が機能する出芽酵母にてその可能性について詳細に調べた【研究テーマ(1)】。その結果、酵母フリッパーゼのリン脂質転移活性及びフリッパーゼが関与する多数の生体膜機能を *CrPHOT* が青色光依存的に活性化することを明らかにした。これらの結果は、酵母において「*CrPHOT* がフリッパーゼ活性を光操作する優れたツールである」ことを示しており、その内容を学術論文 Scientific Reports にて発表した(Suzuki et al., 2020)。しかし、フリッパーゼによる細胞膜ダイナミクスをより詳細に調べるためには、細胞壁を有する酵母ではなく哺乳類細胞にて利用可能なツールが必要である。そこで次に、ヒト培養細胞に適用可能なツールの開発を計画した【研究テーマ(2)】。ヒト培養細胞においてはフリッパーゼの光制御ツールの確立までには至っていないものの、Fpks と同様の機能を持つヒト・フリッパーゼキナーゼ候補の取得や、*CrPHOT* によって制御されうるヒト・フリッパーゼを同定するためのシステムの構築に成功した。今後は、解析によって得られた情報やシステムを用いることで、ヒト培養細胞においてもフリッパーゼ活性を光制御するツールの確立を目指す。

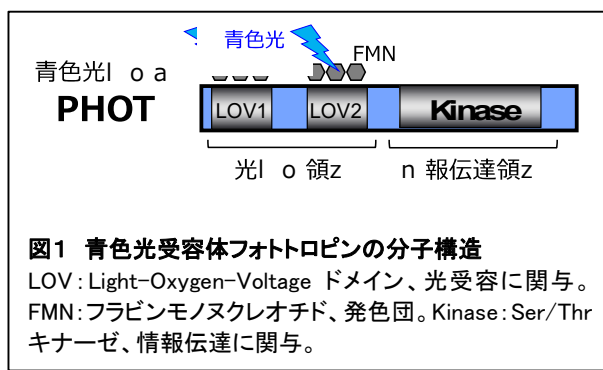


図1 青色光受容体フォトトロピンの分子構造

LOV: Light-Oxygen-Voltage ドメイン、光受容に関与。
FMN: フラビンモノヌクレオチド、発色団。Kinase: Ser/Thr キナーゼ、情報伝達に関与。

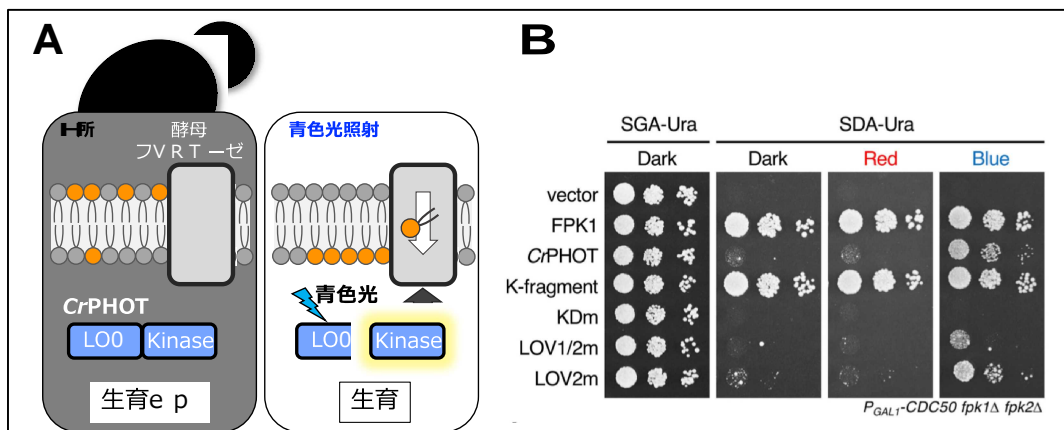


図2 *fpk1* Δ *fpk2* Δ 変異株が示す生育不能性の *CrPHOT* による光依存的相補

A. *CrPHOT* によるフリッパーゼが関与する生育への影響の推測図。Fpk1p/Fpk2p の代わりに *CrPHOT* を導入することで青色光照射下フリッパーゼが活性化され、酵母の生育が回復すると推測した。

B. *P_{GAL1}-CDC50 fpk1* Δ *fpk2* Δ 変異株の生育不能性の *CrPHOT* 及びその派生物による相補解析。K-fragment は恒常的の活性型のキナーゼ領域のみ、KDm はキナーゼ変異体、LOV1/2m 及び LOV1m は光受容に関する LOV ドメインの各変異体を示す。各遺伝子を酵母株に導入し、暗所 (Dark)、赤色光 (Red; $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)、青色光 (Blue; $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下、 28°C にて 3 日間生育した。SGA-Ura は非制限培地、SDA-Ura は制限培地を示す。図は Suzuki et al., 2020, Scientific Reports より一部抜粋。

(2) 詳細

本研究では出芽酵母にて、目的「脂質輸送体フリッパーゼの活性を光操作する技術の確立」を達成することができた【研究テーマ(1)】。しかし、細胞膜ダイナミクスをより詳細に調べるためその技術をヒト培養細胞にて確立する必要性があると考えた【研究テーマ(2)】。各テーマの成果と達成状況の詳細を下記する。

【研究テーマ(1)「生体膜機能の光制御」_出芽酵母でのフリッパーゼ活性の光制御】

フリッパーゼ活性の光制御を示すため、脂質輸送活性が青色光照射で制御できるのか、そしてその活性は関連する生体膜機能の制御に十分かについて調べた。脂質輸送活性については 2 つの解析で証明した。一つは、蛍光標識色素ニトロベンゾオキサジアゾール (NBD) が付加された PE の細胞内への取り込みを、顕微鏡による観察とフローサイトメトリー法による定量化にて行った(図 3)。もう一つは、細胞表面の PE 特異的に結合する抗生物質 Duramycin に対する生育抵抗性にて解析した。その結果、CrPHOT によるフリッパーゼの脂質輸送活性を光制御することに成功した。続いて、フリッパーゼが関連する膜機能制御については、小胞輸送と細胞周期依存的なアクチン局在変化について調べた。小胞輸送に関しては、蛍光タンパク質を融合した 2 つのマーカータンパク質 Snc1p と Tlg1p の局在を顕微鏡観察することでエンドサイトーシスを調べた。アクチン局在に関しては、Phalloidin-TRITC によるアクチン染色法とマーカータンパク質 Myo2p の局在を顕微鏡観察した。これら解析の結果、小胞輸送やアクチン局在など生体膜機能の CrPHOT による光制御を示すことができた。

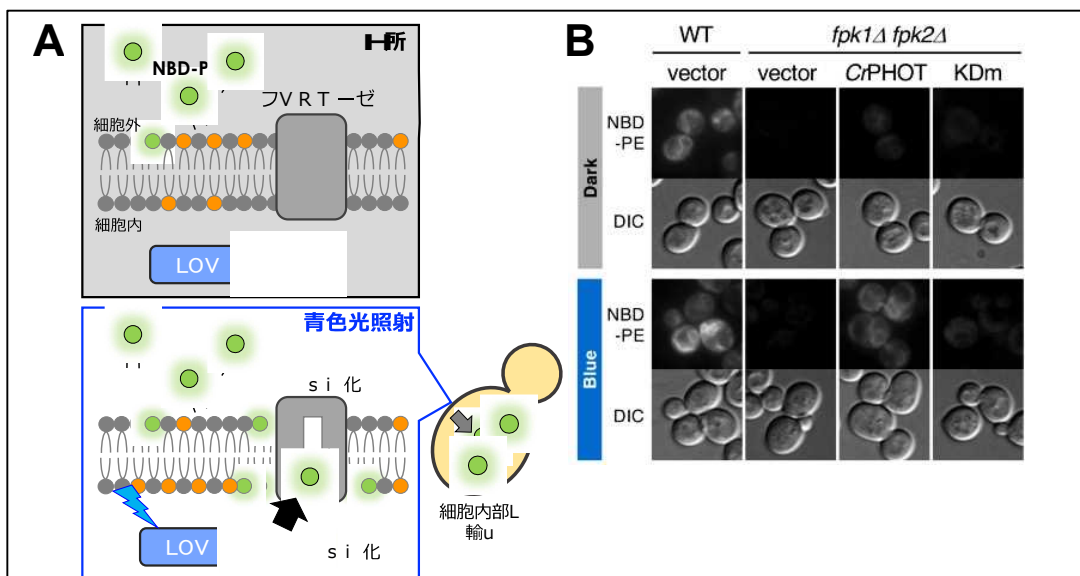


図3 CrPHOT による脂質取り込み活性の光制御

A. リン脂質 PE の細胞内取り込み解析の概要図。CrPHOT がフリッパーゼ活性を制御できれば、培養液に添加した NBD-PE が青色光照射によって酵母細胞内に取り込まれる。

B. CrPHOT による NBD-PE の光依存的な細胞内取り込み。フリッパーゼ活性により細胞膜内葉に転移された NBD-PE は速やかに細胞内に取り込まれるため、細胞内部にその蛍光が観察される。Vector、CrPHOT、KdM を有する WT(野生株)または *fpk1Δ fpk2Δ* 変異株の NBD-PE の細胞内分布を蛍光顕微鏡によって観察した。Dark; 暗所、Blue; 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 青色光、DIC; 微分干渉像を示す。図は Suzuki et al., 2020, Scientific Reports より一部抜粋。

また、解析した全ての応答において *Ct*PHOT のキナーゼ活性が必要であることも判明した。以上の結果により、*Ct*PHOT によってフリッパーゼ活性を光制御できることを示し、目的とした光操作技術の確立を達成することができた(図 4)。

【研究テーマ(2)「細胞運動の光制御」_ヒト培養細胞でのフリッパーゼ活性の光制御】

*Ct*PHOT を導入したヒト培養細胞にてフリッパーゼ活性を光

制御するため、まずは *Ct*PHOT 制御下にあるフリッパーゼの同定を計画した。ヒトでは 14 種類のフリッパーゼが存在する。その同定法として、細胞生育のみでモニター可能であり、短時間で多数の検体が解析でき、相互作用因子や変異体の取得も容易である出芽酵母での検定系の構築と利用を試みた。現在、検定用の酵母株及びベクタープラスミドの作成が完成しており、ヒト・フリッパーゼ遺伝子のクローニングも進行している。また、*Ct*PHOT がヒト培養細胞にて機能しない場合を考慮し、ヒト・フリッパーゼキナーゼを LOV によって制御する系の構築を計画した。フリッパーゼキナーゼは哺乳類では同定されていないため、研究テーマ(1)で利用した系を利用しその単離を試みたところ、いくつかのキナーゼ候補の取得に成功した。今後は、フリッパーゼキナーゼ候補の性質と、LOV によるキナーゼ活性制御の有無を確認した後に、*Ct*PHOT と同様に培養細胞に導入することで、フリッパーゼ活性の光制御システムを確立する予定である。

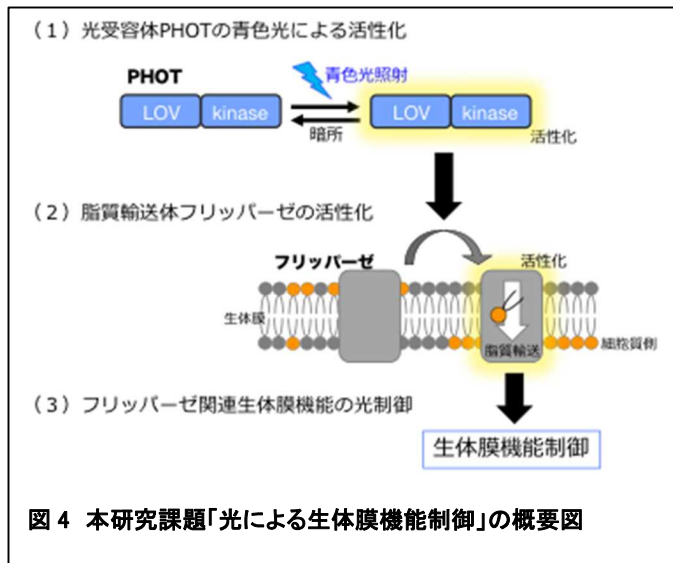


図 4 本研究課題「光による生体膜機能制御」の概要図

3. 今後の展開

ヒトにおいて、フリッパーゼは生活習慣病や免疫疾患にも関連する脂質輸送体である。本研究成果は、その輸送体を光制御するという革新的な技術である。この成果を基に、今後 2 つの研究に発展させる。一つは、既に技術が確立している出芽酵母において、可逆性・即時性・局所性がさらに優れたツールへの改良を目指す。適切な時刻に適切な場所でフリッパーゼが活性化されることが正常な細胞機能に必須であるが、改良された技術を用いてその時空間的な制御について明らかにする。もう一つは、ヒト培養細胞に *Ct*PHOT 等を導入することで、ヒト・フリッパーゼの活性を光操作する。得られた研究成果が、いずれ脂質輸送体が関連する疾患の治療戦略構築の一端を担うことを期待する。

4. 自己評価

領域外の研究グループと連携し、独創的な基礎研究に挑戦した結果、世界に先駆けて新規光操作技術を期間内に創出したことは評価したい点である。本研究課題はさきがけ事業に採択された直後にスタートした新規テーマであるが、共同研究者と頻りに連絡をとることで研究を綿

密に計画し、一歩ずつ着実に研究を遂行できたことが成功の理由の一つである。さらに、既存施設及び機器の改良、研究補助者の雇用など研究費を有効に利用出来たことも理由の一つとしてあげられる。また、領域会議での研究者との議論は非常に刺激的で、そのことがより良い研究の進め方・新分野への挑戦・他分野の研究者とのネットワーク構築・研究内容のアピールの仕方といった研究者としての能力の飛躍に繋がった。新型コロナウイルス感染症による影響で研究が遅延したとはいえ、当初計画していた培養細胞への本技術導入は期間内に遂行できなかった。しかし、今後も解析を続行することで目標を達成したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1件

1. T. Suzuki, T. Mioka, K. Tanaka, A. Nagatani. "An Optogenetic System to Control Membrane Phospholipid Asymmetry through Flippase Activation in Budding Yeast." Scientific Reports. 2020, 10 (1), 12474.

脂質輸送体フリッパーゼを光制御するツールとして、緑藻・青色光受容体(CrPHOT)の有用性を示すことに成功した。フリッパーゼは生体膜の脂質の非対称分布を形成・維持する輸送体の一つであり、真核生物の様々な細胞機能に関与する。出芽酵母に CrPHOT を導入することで、フリッパーゼの脂質輸送活性及び関連する生体膜機能(小胞輸送・アクチン分布・細胞極性等)が青色光照射にて制御可能であることを示した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 鈴木友美、入口雅也、長生昌紘、相原悠介、長谷あきら

「低温でのフォトリポピン応答への脂質輸送体フリッパーゼ変異の影響」日本植物生理学会年会、2019年3月、名古屋

2. T. Suzuki, T. Mioka, K. Tanaka, A. Nagatani.

「Optogenetic Control of Phospholipids Flipping and Related Biomembrane Functions in Budding Yeast」日本生物物理学会年会(招待講演)、2020年9月、オンライン