

京都大学	博士 (工学)	氏名	土 谷 正 樹
論文題目	Studies on the functional role of phospholipid flippase in myotube formation (筋管形成におけるリン脂質フリッパーゼの役割に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>筋肉を構成する筋線維は、筋芽細胞が融合した筋管をもとにして作られる。筋管は多数の細胞核を含み、細長く真っすぐに伸びた特徴的な細胞形態をとっている。しかし、筋管特有の形態形成を司る分子機構については、未だ不明な点が数多く残されている。本論文は、この課題の解決を目標とし、筋管形成における細胞膜リン脂質の分子運動と細胞の形態制御に関わる分子群の同定および機能解析を通じ、筋管形成の分子機構に関する結果をまとめたものであり、4章から成る。</p> <p>第1章では、筋管の形態を制御する因子を同定した。哺乳類では、14種類のP4-ATPaseのうち数種類が補助ユニットのCDC50タンパク質ファミリーと複合体化することでリン脂質フリッパーゼとして機能し、細胞膜においてリン脂質ホスファチジルセリン(PS)を脂質二重層の外層から内層へと輸送する。マウス筋芽細胞株C2C12の遺伝子発現解析により、7種類のP4-ATPaseおよびCDC50Aの1種類のみを検出した。次にCDC50Aと複合体化する5種類のP4-ATPaseおよびCDC50Aについて、遺伝子を破壊した細胞の形態を観察した。リン脂質フリッパーゼ複合体ATP11A/CDC50Aを欠損した筋芽細胞は、細胞融合の昂進と細胞伸長の阻害により異常に巨大化した不定形の筋管を形成した。また同欠損細胞では、細胞融合と細胞伸長を制御する細胞骨格タンパク質アクトミオシンの再編成が損なわれていた。さらに細胞膜内層へのPSの輸送活性が減少し、細胞膜外層にPSが表出していた。そこでATP11AのようにPSを内向きに輸送するP4-ATPaseのATP11CをATP11A欠損細胞に発現させたところ、筋管の形態異常は回復した。よってリン脂質フリッパーゼはPSを細胞膜内層に留めることで筋管形成に関わることが分かった。続いて機械受容イオンチャネル群について解析を進めたところ、PIEZO1を欠損した筋芽細胞は、リン脂質フリッパーゼ欠損細胞のように、異常な筋管形態とともにアクトミオシンの消失を示した。よって筋管形成にはリン脂質フリッパーゼと機械受容チャネルPIEZO1が必須であることを見出した。</p> <p>第2章では、細胞膜リン脂質PSの脂質二重層間での移行運動によるPIEZO1チャネル活性制御の機構を明らかにした。第1章の結果から、リン脂質フリッパーゼとPIEZO1の機能的な関係を推測し、PIEZO1チャネル活性を解析すると、ATP11AおよびCDC50A欠損細胞ではPIEZO1を介したCa²⁺流入が阻害された。上記の筋管形成の回復実験と同様にATP11CをATP11A欠損細胞に発現させると、PIEZO1の活性が回復した。よって、リン脂質フリッパーゼはPIEZO1の活性化に必須であることが分かった。この機構を探るために、リン脂質フリッパーゼはPSの細胞膜内層への局在化に必須であるという点に着目し、「PSが内層に局在するとPIEZO1は活性化できるが、PSが外層に表出するとPIEZO1は阻害される」という仮説を立て検証した。まず筋管形成過程でPIEZO1チャネル活性を解析したところ、PSを細胞膜外層に表出する筋芽細胞においてのみ、PIEZO1特異的なCa²⁺流入が減弱した。次に細胞膜の脂質二重層の内外にPSを輸送するリン脂質スクランブラーゼを発現させたところ、PIEZO1の活性化が阻害された。よって細胞膜外層に表出したPSはPIEZO1を阻害することが示唆された。さらに脂質包接化合物により細胞膜外層と細胞外液の間でリン脂質を交換する方法を用いて、リン脂質フリッパーゼ欠損細胞における細胞膜外層のPSを除去すると、PIEZO1活性が回復した。従ってPIEZO1の活性化にはリン脂質フリッパーゼによる細胞膜外</p>			

層から内層への PS の輸送が必須であることが分かった。細胞膜外層 PS の PIEZO1 阻害効果を解析するために、脂肪酸鎖が一つのリゾ型 PS (LysoPS) を用いた。LysoPS は細胞膜外層に挿入されやすく、除去も容易である。LysoPS を細胞に投与すると PIEZO1 の Ca^{2+} 流入は阻害された。一方、LysoPS とは異なる極性頭部構造をもつリゾ型リン脂質は PIEZO1 を阻害しなかった。また LysoPS 処理した細胞を脂質結合タンパク質アルブミンで洗浄すると、PIEZO1 阻害効果は消失した。よって、極性頭部にホスホセリン構造をもつリン脂質が細胞膜外層に存在すると PIEZO1 のチャネル機能が抑制されることが分かった。以上から「細胞膜における PS の脂質二重層間の移行運動 (フリップフロップ) が PIEZO1 チャネルの活性を制御するための分子スイッチとして働く」という機構が見出された。

第 3 章では、リン脂質フリッパーゼの下流として機能する PIEZO1 とアクトミオシンを繋ぐ細胞内情報伝達経路およびその骨格筋における役割を明らかにした。一般に低分子量 GTPase の RhoA は、Rho キナーゼ (ROCK) によるミオシン調節軽鎖のリン酸化を促し、アクトミオシンの再編成を誘導する。ATP11A、CDC50A、PIEZO1 を欠損する筋管ではミオシン調節軽鎖のリン酸化レベルが減少していたため、RhoA/ROCK/アクトミオシン経路を遺伝学的または薬理学的手法で活性化させると形態異常は回復した。さらに筋組織でのリン脂質フリッパーゼ/PIEZO1 経路の役割を探るために、筋芽細胞特異的 ATP11A 欠損マウスを作出した。損傷した筋肉の再生時に筋管を形成する筋衛星細胞において PIEZO1 が強く発現していたことから、再生過程における ATP11A 欠損マウスの筋組織を観察した。そこでは、異常に融合し形態が著しく乱れた筋線維が数多く認められた。以上の結果から、「リン脂質フリッパーゼは PS の内向き輸送により PIEZO1 の Ca^{2+} 流入を促すことで、RhoA/ROCK 依存的なアクトミオシンの再編成を誘導する。これにより細胞融合と細胞伸長が厳密に制御され、筋管の正しい形態形成に至る。」という分子機構を明らかにした。

第 4 章では、PIEZO1 機能発現に関わる分子の探索を可能にする遺伝子スクリーニング法を構築した。本研究では CRISPR/Cas9 法によりゲノムスケールで遺伝子が網羅的に破壊された細胞ライブラリーを用いた。これから PIEZO1 活性が消失した変異細胞を選抜するために、PIEZO1 活性をもつ細胞のみを死滅させられないか検討した。細胞外液の Ca^{2+} と PIEZO1 特異的活性化剤 Yoda1 の濃度を最適化すると、PIEZO1 特異的な Ca^{2+} 流入により細胞が死ぬ条件を見つけた。これを選択圧としてスクリーニングを実施したところ、Yoda1 による細胞死に耐性をもった細胞が出現し、PIEZO1 活性の完全な消失を示した。Yoda1 耐性細胞について CRISPR/Cas9 の標的遺伝子配列を次世代シーケンサーにより解析したところ、PIEZO1 遺伝子を標的とした配列が複数検出された。従って、本論文で検討した探索法は PIEZO1 チャネル活性に基づいて遺伝子変異細胞を選抜できることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞膜においてリン脂質分子のとんぼ返り運動を促進するリン脂質フリッパーゼの筋管形成における役割を解析し、筋管の形態制御に関わる分子機構の解明を目標とした研究であり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 筋管形態形成の制御因子としてリン脂質フリッパーゼ複合体 ATP11A/CDC50A と機械受容 Ca^{2+} チャネル PIEZO1 を同定した。これらの分子が、細胞融合と細胞伸長を制御する細胞骨格タンパク質アクトミオシンの再編成に必須であることを明らかにした。
2. PIEZO1 チャネルの活性化には、リン脂質フリッパーゼによるリン脂質ホスファチジルセリンの細胞膜内層への輸送が必須であることを見出した。細胞膜外層に表出したホスファチジルセリン分子は PIEZO1 チャネルの開口を可逆的に阻害し、細胞膜内層への同分子の移行運動が PIEZO1 チャネルが開口する分子スイッチとして機能することを明らかにした。
3. PIEZO1 チャネルを介する Ca^{2+} 流入により RhoA/Rho 結合キナーゼを起点とする細胞内情報伝達経路が活性化され、アクトミオシンの再編成を誘導することにより筋管特有の形態が形成されることを明らかにした。さらに、損傷した筋肉が回復する過程においても、PIEZO1 を介する情報伝達経路が正常な筋線維の形成に必須であることを明らかにした。
4. PIEZO1 の選択的な活性化に伴う過剰な Ca^{2+} 流入により細胞死が誘導されることを見出した。この現象を利用してゲノムワイドな遺伝子スクリーニング系を構築し、PIEZO1 機能に関連する遺伝子群の同定と機能解析を行った。

以上のように、本論文は筋管の形態形成の分子機構における新規な知見を多く含むものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年8月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。