

令和元年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		生体膜脂質スフィンゴミエリンの新規生合成・輸送経路の 解明
新規・継続の別		新規・ 継続
研究代表者	所属	国立感染症研究所 細胞化学部
	職名・氏名	酒井 祥太
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	
	職名・氏名	
	所属	
	職名・氏名	
受け入れ教員	職名・氏名	田中 一馬
概要 (100～150 字程度)		本研究では、スフィンゴミエリン(SM)結合毒素エキナトキシン(Eqt)および sgRNA ライブラリーを用いた CRISPR/Cas9 システムによる新規スクリーニング系を構築し、SM 生合成・輸送に関連する遺伝子群を見出す。
研究目的 (300 字程度)		申請者の所属部では、生体膜の主要な脂質の一つである SM は、小胞体で生合成されたセラミドがセラミド輸送タンパク質(CERT)によりゴルジ体に輸送され、新規合成されることを見出している。一方、CERT を欠損させた哺乳動物細胞においても、SM の新規合成は完全に欠損せず約 30%に低下するのみであり、CERT 非依存の SM 合成経路の存在が示唆されている。本研究では、SM に結合し細胞障害性を示す Eqt の毒性とそれに応答する遺伝子を sgRNA ライブラリーを用いた CRISPR/Cas9 システムを用いて探索する新規スクリーニング系を構築する。そして、構築したスクリーニング系から SM 生合成・輸送に関連する遺伝子群を見出すことを目的とした。
研究内容・成果 (1000 字程度)		本年度は、スクリーニングの系を構築するための Eqt のタンパク質精製方法について、毒性評価ならびに必要な量の検討などを中心に研究を進めた。申請者らの以前行った小スケールでの検討から推測された想定量を確保するために、組換えタンパク質を調製するための以下の条件検討、(1)コードする遺伝子のコドン改変、(2)タンパク質発現誘導の条件検討、(3)タンパク質の精製方法の検討を開始した。検討の結果、ある程度のタンパク質量の確保が可能になり、スクリーニング開始に向けては良好な結果となった。一方、精製した Eqt の毒性が予想よりも低下していることもわかり、pH、塩濃度などの精製方法の検討、精製後の保存処理など検討すべき課題も見いだすことができた。以上のように、本年度の共同研究より、スクリーニングに必要な Eqt 量などが想定よりも多く要することが明ら

	かとなり、その量を確保するための精製方法などの今後の研究方針などについて現在議論を進めている。また、共同研究の過程から、Eqt の細胞内局在を解析する蛍光タンパク質融合体についても、スクリーニング過程に visual スクリーニングを行うことができるか、または、その後の解析に使用できるかについて議論した。そして、Eqt 蛍光タンパク質融合体の精製を行うこととした。本年度の研究から、Eqt 蛍光タンパク質融合体のタンパク質量について必要と想定される約 40 % 程度の量を確保することができ、引き続き精製を行うこととなった。現在は、この融合体タンパク質を用いて visual スクリーニング過程の実験条件の検討を行っている。 このように、本年度の共同研究から、スクリーニングに向けて成果と課題を見いだすことができ、来年度の共同利用プログラムを利用することで、さらなる研究の推進を期待している。
成果	【学会報告】 参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと
	【論文発表】 著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のこと
	【新聞報道】