

令和2年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究		
研究課題名		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		継続		
研究代表者	所属	国立感染症研究所細胞化学部	40 歳 以下○	35 歳 以下○
	職名・氏名	主任研究官 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	教授・田中 一馬		
概要 (100～150 字程度)		スフィンゴミエリン (SM) 合成経路を確立することを目的として、 Eqt に耐性を示す変異細胞を探索することにより、 SM 生合成・輸送に関連する遺伝子群を見出すことを目指した。本年度は、スクリーニングの実験系の確立を目指し、必要な SM 結合毒素の調製条件とスクリーニング条件の確立を行なった。		
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スフィンゴミエリン (SM) は、小胞体で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。そこで本研究では、 SM に結合し細胞障害性を示すエキナトキシン (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、 Eqt に耐性を示す変異細胞を探索する事により、 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・Web 会議の回数も記載)		令和元年度より行なっている SM に結合し細胞障害性を示す Eqt を用いたスクリーニングの系 (Eqt に耐性を示す変異細胞の探索) の構築を継続し、条件検討を進めている。このスクリーニングでのボトルネックとなっているのは、 Eqt 組換えタンパク質の大量調製である。本年度より田中研究室の岸本助教に参画していただき、電話および web 会議 (合計 4 回) を行った。会議の内容は主に、実験結果の報告と相互にフィードバックすること、そしてコロナ禍であることを勘案した研究体制の構築について議論を中心に進めた。また、具体的に新たに得られた実験結果について報告は随時メール連絡にて協議を行った。令和 3 年度もコロナ禍で往来が困難となる		

	事も予測されることから、本年度途中から Eqt は北大グループで全面的に調製を進め、それを用いたスクリーニングを当方で実施する役割分担を決定した。本年度途中からその体勢に移行し共同研究が円滑に進むように、それぞれ実験条件検討を進めている。北大グループが Eqt の発現条件、精製過程など効率よく調製するプロトコルを確立する一方、当方では、その Eqt を用いたスクリーニング至適濃度の検討、スクリーニングサイズの決定などをすすめた。その結果、現時点で条件検討がほぼ終了し、スクリーニングを開始できる段階までに研究が進んでいる。今後は、Eq_t の大量調製を開始し、SM 生合成・輸送に関連する遺伝子群を見出すことを目指したい。往來の規制がある程度緩和された段階で、Eq_t スクリーニング後の解析で使用する予定の Eq_t 誘導体の調製を進めたい。 また、現在進めている Eq_t 毒性を指標にしたスクリーニングの構築に加えて、本年度の共同利用プログラムから派生的に新たな実験系を考案することができた。具体的には、蛍光タンパク質を融合させた Eq_t (Eq_t-EGFP) を用いた、SM の動態・分布を指標にしたスクリーニングおよびその解析を行うことも次年度に計画している。また、Eq_t-EGFP を用いてこれまでに当部で樹立してきた様々な遺伝子欠損細胞における SM 分布の解析も行う予定である。このような実験は Eq_t 同様に Eq_t-EGFP の大量調製が必要となり、この点は、発現の難しい組換えタンパク質においても大量調製を得意とする田中研究室との共同研究によって可能となる。この新たな実験系には、CERT の発見者でありスフィンゴ脂質研究に長年携わってきた当研究部の前主催者花田賢太郎と Eq_t-EGFP を用いた実験を担当する博士研究員島崎健太郎の参加を予定しており、令和3年度 of 分担者として申請させていただいた。
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】