令和3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	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	国立感染症研究所 細胞化学部	/	/
	職名・氏名	部長・花田 賢太郎		
	所属	国立感染症研究所 細胞化学部	/	/
	職名・氏名	研究員・島崎 健太郎		○
受け入れ教員	職名・氏名	教授・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スフィンゴミエリン(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に非依存の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で、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)		本年度は、昨年度までに確立を進めてきたEqtのタンパク質の毒性を指標に行うスクリーニングについて、実際のスクリーニングサイズでの条件検討を開始し、研究を進めた。スクリーニングを進めるにあたり、田中研究室岸本助教と複数回に渡る議論(web会議を合計8回)を行い、実験系の評価を進めた。試料について、昨年度の共同利用研究より、スクリーニングに必要なEqtタンパク質量が想定よりも多く要することが課題として生じていた。コロナ禍での往来が困難であることから、北大岸本助教側で調製していただいた試料を送付していただき、感染研で検証し、それをフィードバックする形で確保を進めた。このような方式を進めた結果、スクリーニングに必要なタンパク質量を田中研の岸本助教に確保が可能となり、スクリーニングの量的な課題を克服した。また、別の課題とし		

	<p>て、精製した Eqt の毒性が想定よりも低下する問題について、議論を通して pH、塩濃度などの精製方法の検討、精製後の保存処理など課題の検討を行った結果、許容範囲の解決策を見出すことができた。以上のように、昨年度の共同研究より、スクリーニングに必要な試薬の確保とその使用条件の検討を主に進め実効性のある条件を見出すことができ、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、Eq_t 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、スクリーニングの一環として visual スクリーニングを行うことができるかについても検討を進め、予備検討を進めている。具体的には、Eq_t 蛍光タンパク質融合体の精製を行うことを前提に、それらのタンパク質を精製し、必要と想定される量を確保することができた。この試料をもとに新たなスクリーニングの条件を検討する。</p> <p>この二種類のスクリーニングから、SM 合成、輸送などに関わる遺伝子のスクリーニングを進めているが、その過程で、予想外にもリン脂質の一つホスファチジルセリン (PS) の関連性も見出された。現在は、PS についても、スクリーニングの一要素として検討するため、PS を可視化するプローブ融合体タンパク質を用いた実験を予定しており、その条件の検討を行っている。</p> <p>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。</p>
成果	<p>【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</p> <hr/> <p>【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</p> <hr/> <p>【新聞報道】</p>