

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Program for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) リン脂質フリッパーゼを介する膜張力感知機構の筋管形成における役割
(英語) The role of phospholipid flippase-mediated mechanosensitive machineries in myotube formation.

研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院工学研究科 准教授 原 雄二
所属 役職 氏名： (英語) Graduate school of engineering, Kyoto University, Associate professor
Yuji Hara, Ph.D.

実施期間： 平成 28年 10月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

生体内における細胞融合や小胞融合時において、膜構造は動的に変化することが知られている。細胞膜同士の結合後、細胞融合体は細胞骨格や細胞内小器官を制御・再編し、組織ごとに固有の形態を示す。骨格筋を例にとると、骨格筋に存在する筋芽細胞は互いに融合し合うことで、筋管と呼ばれる構造体を形成し、筋線維へと分化する。これまでに筋芽細胞の融合・形態形成に関わる因子群は同定されつつあるものの、上記素過程の根幹である、膜融合前後におけるリン脂質分布の制御機構、さらにはリン脂質分布変化が担う筋管形態形成への寄与、さらに細胞融合・形態変化時における膜張力の役割については未だ明らかではない。

そこで本研究では、細胞膜のリン脂質分子を外層から内層へと輸送（フリップ）し、リン脂質分布を調節することで、多彩な細胞機能に関与するリン脂質フリッパーゼ群に着目した。マウス筋芽細胞株 C2C12 における遺伝子発現を解析したところ、主要ユニット P4 型 ATPase のうち 7 種類、補助ユニット CDC50 のうち 1 種類の発現がそれぞれ検出された。これらの筋管形成時の役割を検討するため、CRISPR/Cas9 法により欠損株を樹立し、分化誘導を行なった。興味深いことに P4-ATPase、CDC50 各欠損株では、無秩序な細胞融合やシート状の異常な構造体形成とともに、アクチン細胞骨格の動態異常や細胞接着斑形態の異常等が認められたことから、リン脂質フリッパーゼは秩序だった細胞融合および筋管形態に関与することが示された。

我々は、細胞融合前後におけるリン脂質フリッパーゼ活性と膜物性変化の相関に焦点を当て、同分子欠損に伴い機能不全を来す膜タンパク質群の探索も進めてきた。特に細胞融合時において、リン脂質フリッパーゼ活性化により、膜張力感知機構が変化する作業仮説を立て、細胞力覚に関与する因子群について網羅的に検討を行なった。その結果、膜伸展により活性化される機械受容イオンチャンネルの 1 つが、その欠損によりリン脂質フリッパーゼ欠損株と酷似した表現型（細胞融合の過剰な進行および融合後の形態異常）を示すことが認められた。同定された機械受容イオンチャンネルについて、リン脂質フリッパーゼ欠損株に一過的発現したところ、そのイオンチャンネル活性が著しく減弱したことから、リン脂質フリッパーゼと候補機械受容チャンネルは機能的に連関することが示唆された。

リン脂質フリッパーゼと機械受容イオンチャンネルの機能連関機構を明らかにするため、田中求教授（ハイデルベルグ大・京大 iCeMS）との共同研究により、リン脂質フリッパーゼ欠損株における膜張力を光ピンセット法を用いて測定を行なった。しかし当初の予想に反し、リン脂質フリッパーゼ欠損株と野生型筋芽細胞の間では、膜張力に有意な違いは認められなかった。リン脂質フリッパーゼ欠損株において、通常時に細胞膜内層にのみ存在するはずのリン脂質群が外層にも局在したことから、各種リン脂質を細胞に添加することにより、リン脂質の局在を乱した際のイオンチャンネル活性の変化を検討した。その結果、あるリン脂質分子を野生型細胞に添加した場合、候補イオンチャンネル活性が著しく減弱することを見出した。以上、リン脂質フリッパーゼは膜リン脂質を非対称に局在化させ、機械受容イオンチャンネル活性を正に制御する「フリップ-フロップ スイッチ」機構により、秩序だった細胞融合および筋管形態をもたらす機構が示唆される。

Myoblast fusion and subsequent establishment of cell polarity in myotubes are fundamental steps to build skeletal muscle fibers. Distribution of phospholipids is thought to be tightly controlled during myoblast fusion events, despite dramatic alterations in the membrane structure. However, it is obscure how changes in phospholipid distribution govern the processes involved in myotube formation. Here we show that phospholipid flippase, which catalyzes translocation of phospholipids from the outer to the inner leaflets of the plasma membrane, is crucial for determination of the morphology in myotube formation. Deficiencies in one of the main unit of, and a gene encoding the auxiliary subunit of phospholipid flippase, caused abnormalities such as excessive myoblast fusion, aberrantly enlarged myotubes, and impaired localization of actin / myosin complex (actomyosin), indicating that phospholipid flippase is essential for regulation of myotube morphology.

We next sought to elucidate the molecular mechanisms underlying phospholipid flippase-dependent regulation during myotube formation. We hypothesized that phospholipid flippase might regulate the biophysical properties (such as membrane tension) of the plasma membrane. To address this hypothesis, we focused on mechanosensitive cation channels that were known to be activated by membrane tension. Interestingly, deficiency in one of mechanosensitive cation channels recapitulated abnormalities that were observed in phospholipid flippase-deficient syncytia. Moreover, the candidate ion channel was activated in wild-type but not in phospholipid flippase-deficient myoblasts, suggesting that the candidate ion channel could be functionally interact with phospholipid flippase.

To address the possibility that phospholipid flippase could alter the biophysical properties of the plasma membrane, we measured membrane tension using optical tweezers, by collaboration with Professor Motomu Tanaka (Heidelberg University / Kyoto University). However, contrary to our hypothesis, comparable membrane tension was detected between phospholipid flippase-deficient myoblasts and wild type cells. We instead assumed that phospholipids exposed to the outer leaflet of the plasma membrane due to the deficiency in the phospholipid flippase could be involved in impaired ion channel activity of the candidate. Indeed, when one of the phospholipids was administrated to wild type myoblasts, the ion channel activity was clearly reduced in a dose-dependent manner. Thus we propose the novel mechanism: distribution of phospholipids via phospholipid flippase positively regulates the mechanosensing machinery that is required for morphogenesis during myotube formation.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The role of phospholipid flippases in myotube formation, 口頭, Yuji Hara, Masaki Tsuchiya, Karin Itoh, Masaki Okuda, Ryotaro Nishioka & Masato Umeda, 第94回日本生理学会大会（浜松）, 2017/3/28, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し

(4) 特許出願
該当無し