

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ソロタイプ「画期的医薬品の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域  
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation, Solo-type, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) PI4P 駆動型脂質対向輸送システムの分子機構とその生理機能の解明  
(英語) Mechanisms and physiology of PI4P-driven lipid countertransport

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人新潟大学 大学院医歯学総合研究科分子細胞医学専攻・准教授・中津 史

所属 役職 氏名： (英語) Department of Neurochemistry and Molecular Cell Biology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University・Associate Professor・Fubito Nakatsu

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）

### ・ 研究開発代表者による報告の場合

本研究開発は、新規脂質対向輸送システムを同定し、分子レベル、細胞レベルおよび個体レベルでの解析を通してその分子機構と生理機能の解明を目標としている。

本年度は、まず本研究開発を進める上で重要なツールであるイメージングシステムの整備を行なった。また、培養細胞における内在性レベルの発現の検出を可能とする染色・イメージング条件の検討を行なうと共に、以下のような研究を行なった。

先行研究から、細胞膜の PI4P は Oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 5 (ORP5) や ORP8 を細胞膜にリクルートすることで、小胞体-細胞膜接触部位における PI4P とホスファチジルセリンの交換輸送を制御することが判明している (Chung et al, 2015)。細胞膜 PI4P 合成酵素 Phosphatidylinositol 4-kinase type III $\alpha$  (PI4KIII $\alpha$ ) のコンディショナルノックアウト線維芽細胞に 4-hydroxytamoxifen を作用させて PI4KIII $\alpha$  のノックアウトを誘導し、コントロール細胞と比較したときのノックアウト細胞における局在の変化を指標に新たな脂質対向輸送システムの同定を試みたところ、機能未知の分子 2 種を同定した。そしてこれら分子群の細胞機能解明のため、生化学的および細胞生物学的手法により細胞内局在の決定を行った。さらに、これら分子群の機能を分子レベルで解析するために精製タンパク質調整の条件検討を行った。また、これら分子群の生理機能を解明するために、CRISPR/Cas9 法による培養細胞およびゼブラフィッシュのノックアウトラインの樹立に着手し、培養細胞ではノックアウト細胞株を樹立した。ゼブラフィッシュについては、CRISPR/Cas9 ターゲット配列の選定を完了し、順次ヘテロ個体の作成を行なっている。

The primary goal of the current study is to identify novel lipid transport systems in cells, and investigate them at molecular, cellular and organism levels. First, we built a confocal-based imaging system that enables the determination of localization/dynamics of proteins or lipids, and optogenetic and/or chemical biology-based manipulation of lipids in cells. To corroborate the preliminary observations that implicate novel regulators of lipid transport, a screening was carried out with a candidate approach to identify proteins whose localization at the plasma membrane depends on lipids at the plasma membrane. Two candidate proteins obtained from the screening were transiently expressed as a fusion protein with GFP or epitope-tags in COS7 cells or HeLa cells, and those cells were analyzed with the confocal microscopy to determine the subcellular localizations. Toward the physiological understanding of the lipid transport mechanisms mediated by the novel regulators, knockout cell lines were established using the CRISPR/Cas9 system. In addition, zebrafish KO lines are being established.

### ・ 研究開発分担者による報告の場合

### 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 1 件、国際誌 1 件）

1. 中津 史. ホスファチジルイノシトール 4-リン酸による細胞機能の制御 *領域融合レビュー* 2016, 5, e008
2. Nozumi M, Nakatsu F, Katoh K and Igarashi M.: Coordinated Movement of Vesicles and Actin Bundles During Nerve Growth Revealed by Superresolution Microscopy. *Cell Rep.* 2017, 18, 2203-2216

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当無し

(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