

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06486

研究課題名(和文)細胞膜リン脂質スクランブラーゼXkr4の活性制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the regulatory mechanism of Xkr4 scramblase activity

研究代表者

圓岡 真宏 (Maruoka, Masahiro)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：70736412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が死に至る過程では、細胞膜の内側に存在するリン脂質であるホスファチジルセリン(PS)が"eat-me"シグナルとして細胞表面に露出されることで、貪食細胞に認識・除去される。研究代表者らは以前にPSの露出に関与する神経特異的スクランブラーゼXkr4を同定したが、その活性化機構は明らかではなかった。本研究ではXkr4の活性化因子を同定するためのスクリーニング法を樹立し、その活性化因子としてXRCC4を同定した。また、その具体的な活性化機構を明らかにするとともに、Xkr4ノックアウトマウスを用いてXkr4の生理的役割を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では神経特異的なスクランブラーゼであるXkr4に着目し、その制御因子としてXRCC4を同定した。脳の発達過程では不要な神経の除去や、神経の不要な一部が除去されることが適切な神経回路の形成に重要であると考えられている。Xkr4はこのような不要部位でeat-meシグナルとしてPSを露出する可能性が考えられる。このことから、本研究の成果は脳の発達を理解するうえで重要な知見となる。また、神経シナプスの過剰形成は発達障害を引き起こすと考えられていることから、本研究の成果はこのような発達障害を理解するうえでも重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：During cell death, phosphatidylserine (PS), a phospholipid located in the inner membrane, is exposed on the cell surface as an "eat-me" signal, which is recognized and removed by phagocytic cells. We previously identified Xkr4, a neuron-specific scramblase involved in PS exposure. However, the activation mechanism of Xkr4 was not clear. In this study, we established a screening method to identify activators of Xkr4 and identified XRCC4 as the Xkr4 activator. In addition, we clarified the detailed activation mechanism of Xkr4 and analyzed the physiological role using Xkr4 knockout mice.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：スクランブラーゼ リン脂質 Xkr4 "eat-me" signal CRISPR XRCC4

1. 研究開始当初の背景

動物細胞の細胞膜はリン脂質二重層で構成されており、外側と内側を構成する脂質分子の種類が異なっている。例えば、ホスファチジルコリン(PC)の多くは外側に、ホスファチジルセリン(PS)は内側に位置しており、PSはフリッパーゼとよばれる酵素によって細胞膜外側から内側へと輸送され非対称的に分布している。しかしながら、アポトーシス誘導時にはこの非対称性が破綻しPSは細胞表面に露出する。PSの露出にはフリッパーゼの不活性化のみでは不十分で、リン脂質を区別なく双方向に輸送するスクランブラーゼの存在が示唆されていたが、その分子の実体はながらく不明であった(図1)。研究代表者が所属するグループにおいて、これまでに機能的スクリーニングによりTMEM16FやXkr8をスクランブラーゼとして同定している(Suzuki et al., 2010 Nature; Suzuki et al., 2013 Science)。また、TMEM16Fはカルシウム刺激依存的にPSを露出するスクランブラーゼであり、Xkr8はアポトーシス刺激依存的にPSを露出するスクランブラーゼであることを示している。

2. 研究の目的

Xkrファミリーはヒトにおいて9つのメンバーから構成されており、Xkr8以外にもXkr4とXkr9がスクランブラーゼ活性を示す(Suzuki et al., 2014 J Biol Chem)。これらのメンバーは、アポトーシス時にC末端の細胞内領域がカスパーゼによって切断されることで活性化される。ところが、Xkr4のカスパーゼ切断型を発現しただけではスクランブラーゼ活性を示さないことから、Xkr4の活性化においては、制御因子の存在が示唆された。本研究では、Xkr4の活性化候補因子をスクリーニングにより同定したので、それによるXkr4の活性化機構、および生理的役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

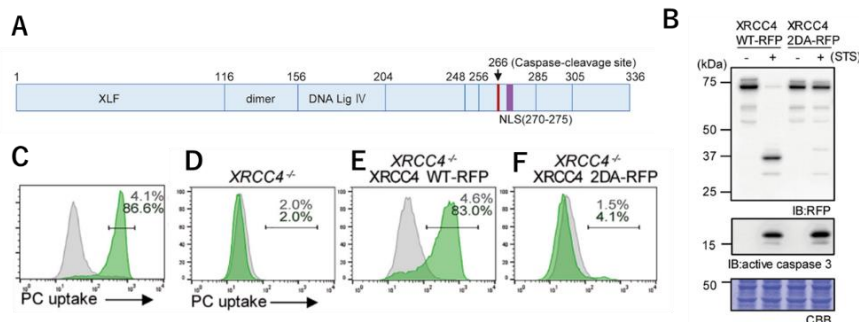
研究代表者はこれまでに、Xkr4の活性制御機構を明らかにする目的で、独自のスクリーニング法である“リバイバルスクリーニング法”を開発してXkr4の活性制御因子を探索した。具体的には、sgRNAライブラリー(Sanjana et al., 2014 Nature Methods)をXkr4発現細胞に導入後アポトーシス刺激を行い、スクランブリング活性を示さない細胞を回収する。回収した細胞からゲノムDNAを取り出しPCRによりsgRNA配列を増幅し、それをを用いて新たにsgRNAライブラリーを再構築するステップを繰り返すことで、死にゆく細胞からでも候補因子の同定を可能にした。その結果、Xkr4活性化因子として核内タンパク質XRCC4を唯一の候補として同定した。これまでの解析結果から、XRCC4は通常核内に局在化しているが、アポトーシス刺激に反応してカスパーゼにより切断され、C末端領域のみが細胞質内に局在化することが明らかになっている。そこで①活性化に必須な領域を決定し、②Xkr4とXRCC4のC末端領域との相互作用を生化学的手法により解析する。また、③Xkr4とXRCC4のC末端領域との相互作用を細胞生物学的的手法により解析し、詳細な活性化機構を解析する。

また、④Xkr4の生理的役割を解析する。Xkr4ノックアウトマウスの解析においては、藤田医科大学、宮川剛研究室との共同研究で行動解析実験をすでに行っており、耳が聞こえにくいなどの異常が明らかになっている。そこで、内耳神経に注目して解析を行う予定であった。特にXkr4は神経細胞のPS露出に関与すると予想されるので、組織切片を作製して神経マーカー、シナプスマーカー、ミクログリアマーカー等で染色し、形態変化などについて観察、及びXRCC4の2DA変異体のノックインマウスに関しても解析を進め、Xkr4ノックアウトマウスとの関連性についても解析する。

4. 研究成果

本研究では、まずXRCC4のカスパーゼによる切断が必須であることを明らかにした。その結果を以下に示す。

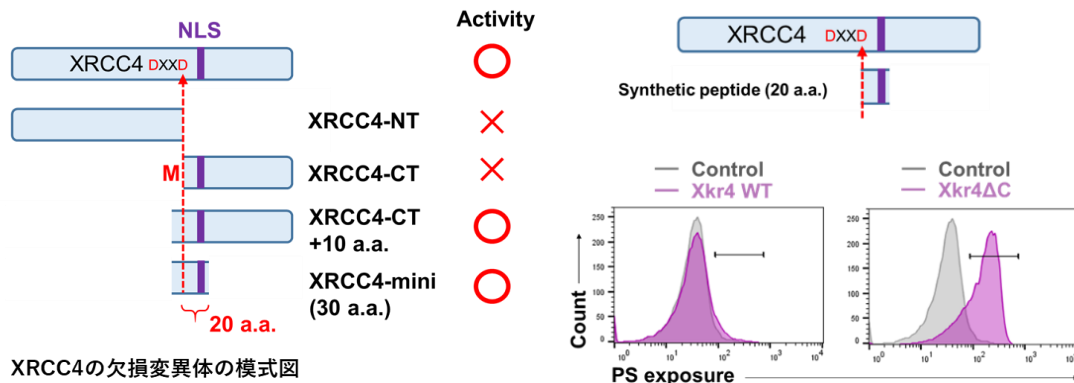
XRCC4にはカスパーゼに切断されると予想される配列が報告されていた(A)。そこでカスパーゼ切断部位に変異を導入したところ、アポトーシス刺激によりXRCC4は切断されなくなることが確認された(B)。そこで次にXRCC4のノックアウト細胞を作製し、野生型の細胞ではアポトーシス刺激に依存してスクランブリング活性(PC uptake)が上昇するが、XRCC4のノックアウト細胞ではスクランブリング活性は上昇しないことを確認した(C,D)。そこでXRCC4のノックアウト細胞に野生型XRCC4を発現すると、スクランブリング活性は回復したが、XRCC4のノックアウト細胞に2DA-XRCC4を発現した場合、スクランブリング活性は回復しなかった(E,F)。以上のことからXRCC4の切断がXkr4の活性化に必須であることが明らかになった。



A XRCC4の一次構造 カスパーゼ切断部位は265と266番目のアミノ酸の間
B カスパーゼ切断部位に変異を導入した場合(2DA)、アポトーシス刺激によりXRCC4は切断されなくなる。
C アポトーシス刺激に依存してスクランブリング活性(PC uptake)が上昇する(緑)
D XRCC4のノックアウト細胞ではスクランブリング活性は上昇しない(緑)
E XRCC4のノックアウト細胞に野生型XRCC4を発現した場合、スクランブリング活性は回復した。
F XRCC4のノックアウト細胞に2DA-XRCC4を発現した場合、スクランブリング活性は回復しなかった。

①Xkr4に対するXRCC4の活性化に必須な領域の解析

XRCC4の活性化に必須な領域を同定した。以前の結果より、カスパーゼ切断型のXRCC4のC末端が細胞質側に放出されることが分かっていたので、XRCC4のC末端領域のみを細胞に発現させたところ、アポトーシス刺激の有無にかかわらず、Xkr4の活性化はほとんど認められなかった。ところがXRCC4のカスパーゼ切断サイト部位よりN末端側に10アミノ酸を付加して発現させると、アポトーシス刺激下でXkr4が効率よく活性化された。XRCC4が切断されると、切断部位においてイソロイシンが露出するが、C末端のみを発現させる場合にはイソロイシンの前にメチオニンを付加する必要があるため、このメチオニンが活性化を阻害している可能性が考えられた(左図)。さらにXkr4の活性化に必要な領域を解析したところ、カスパーゼ切断サイト部位よりN末端側に10アミノ酸、C末端側に20アミノ酸を含む領域だけでXkr4の活性化に十分であることがわかった(左図)。そこで、カスパーゼ切断部位よりC末端側の20アミノ



XRCC4の欠損変異体の模式図

カスパーゼ切断型のXRCC4のC末端のみを細胞に発現させたところ、アポトーシス刺激の有無にかかわらず、Xkr4の活性化はほとんど認められなかったが、XRCC4のカスパーゼ切断部位よりN末端側に10アミノ酸を付加して発現させると、Xkr4が活性化された。さらにカスパーゼ切断部位よりN末端側に10アミノ酸、C末端側に20アミノ酸を含む領域だけでXkr4の活性化に十分であることがわかった。

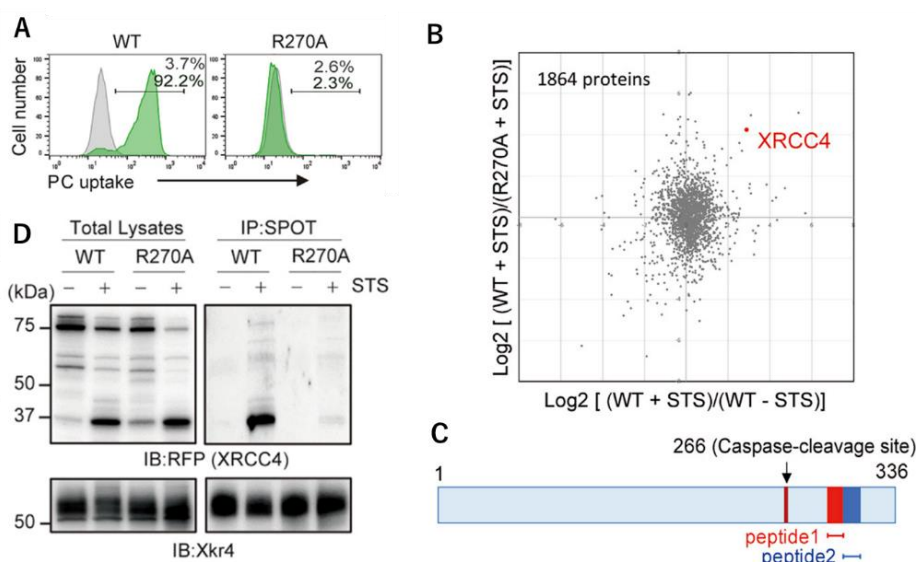
合成ペプチドの導入によるXkr4の活性化

カスパーゼ切断部位よりC末端側の20アミノ酸をペプチド合成し、Xkr4発現細胞に導入すると、野生型Xkr4(Xkr4WT)では活性が見られなかったが、Xkr4ΔCの活性化が認められた。

酸をペプチド合成し、電気穿孔法により直接細胞に導入すると、アポトーシス刺激なしでもカスパーゼ切断型 Xkr4 Δ C を活性化させることができた(右図)。また、このペプチドはカスパーゼ非切断型の野生型 Xkr4 を活性化しなかったことより、カスパーゼ 3 によって切断された XRCC4 の C 末端は、カスパーゼで切断された二量体化型 Xkr4 を活性化させると結論づけた。

② Xkr4 と XRCC4 の C 末端領域との相互作用の生化学的手法による解析

次に、XRCC4 の C 末側の断片はどのように Xkr4 を活性化するのかを解析するため、Xkr4 と XRCC4 の相互作用に必須なアミノ酸を解析した。その結果、C 末端側 20 アミノ酸の中の核内移行シグナルに存在する最初のア르기ニン (R270) をアラニンに置換した変異 (R270A) を導入すると、Xkr4 を活性化できないことがわかった(A)。そこで、XRCC4 の野生型、R270A を発現する細胞において Xkr4 に結合するタンパク質を質量分析により調べた。アポトーシス刺激後および未刺激の細胞より膜画分を調製し、Xkr4 を免疫沈降して、Xkr4 結合タンパク質を質量分析により解析した(B)。すると、アポトーシス刺激依存的に XRCC4 の野生型の C 末端をコードするペプチドのみが結合タンパク質として同定された(C)。実際に、同じ細胞を用いて Xkr4 の免疫沈降後にウエスタンブロッティングを行ったところ、Xkr4 と XRCC4 のカスパーゼで切断された C 末端領域が相互作用することが確認できた(D)。以上より、XRCC4 の C 末端は、カスパーゼにより切断されることで細胞質に放出され、細胞膜スクランブラーゼ Xkr4 に結合し活性化すると結論づけた

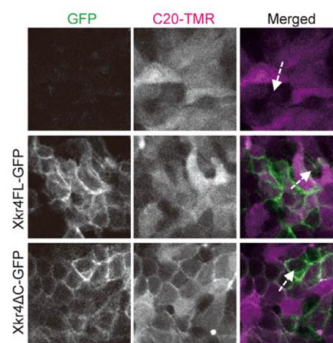


Xkr4の活性化にはNLSのR270が必須である

- A C末端側20アミノ酸の中の核内移行シグナルに存在する最初のア르기ニン (R270) をアラニンに置換した変異 (R270A) を導入すると、Xkr4を活性化できない。
- B 質量分析によりXkr4結合タンパク質としてXRCC4を同定した。
- C 同定されたXRCC4は、ともにXRCC4のC末端領域の断片であった
- D ウエスタンブロットによる XRCC4とXkr4の相互作用 R270A変異を含むXRCC4断片はXkr4と共沈しなかった。

③Xkr4 と XRCC4 の C 末端領域との相互作用の細胞生物学的手法による解析

次に、生きた細胞内でこの相互作用を確認するために、XRCC4 の C 末端ペプチドを蛍光テトラメチルローダミン(C20-TMR)と結合させ、HCT116 細胞に Xkr4FL-GFP もしくは Xkr4 Δ C-GFP を発現する細胞に電気穿孔法により導入した。エレクトロポレーション後、C20-TMR は Xkr4 Δ C-GFP では細胞膜に保持され、GFP のシグナルと共局在したが、Xkr4FL 発現細胞では保持されなかった。これらの結果は、核タンパク質 XRCC4 のカスパーゼ切断断片が、細胞死時に細胞膜上の脂質スクランブルと直接結合することにより、Xkr4 二量体を活性化することを示す。



XRCC4ペプチドの局在
C20-TMRをHCT116細胞にエレクトロポレーションし、Xkr4FL-GFPまたはXkr4 Δ C-GFPの局在を観察した。
Bar, 20 μ m

④Xkr4 の生理的役割の解析

これまでに、Xkr4 のノックアウトマウスを用いて行動解析を行ったところ幾つかの表現型が認められたが、音に対する驚愕反応の低下が特に顕著であった。このことから Xkr4 ノックアウトマウスが難聴の表現型を示す可能性が考えられた。そこで、これを確認するため聴性脳幹反応テストを実施したが、野生型と同様に Xkr4KO マウスも遜色なく音を聞き取れることが分かった。このことから Xkr4KO マウスは音に対する反応が鈍くなっていると考えている。これまでの行動解析の結果をふまえると、Xkr4KO マウスは何らかの発達障害を呈する可能性が考えられる。

今回の研究で、研究代表者は Xkr4 の制御因子である XRCC4 のカスパーゼで切断できない変異を Crispr/Cas9 システムにより導入したマウス XRCC4mut を作製し、Xkr4KO マウスと同様の表現型がおこるかを解析した。しかしながら、XRCC4mut マウスは Xkr4KO マウスで認められた体重増加や、音に対する反応低下については認められなかった。以上のことから、XRCC4 は Xkr4 の活性化において少なくともこれらの表現型には関与せず、これらの表現型については XRCC4 以外の活性化因子があると結論した。これらの結果は今後の研究を進めるうえで重要な新たな方策を検討する機会となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 圓岡 真宏、Zhang Panpan、鈴木 淳	4. 巻 94
2. 論文標題 核内タンパク質によるスクランブラーゼの活性制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 288 ~ 291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940288	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi Makio、Ishiyama Kenichi、Maruoka Masahiro、Kanamori Ryosuke、Takaori-Kondo Akifumi、Watanabe Naoki	4. 巻 34
2. 論文標題 Paradoxical activation of c-Src as a drug-resistant mechanism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108876 ~ 108876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.108876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masahiro Maruoka、Jun Suzuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulation of phospholipid dynamics in brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.01.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Masahiro Maruoka、Panpan Zhang、Hiromi Mori、Eiichi Imanishi、Daniel M Packwood、Hiroshi Harada、Hidetaka Kosako、Jun Suzuki	4. 巻 81 (7)
2. 論文標題 Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell	6. 最初と最後の頁 1397-1410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2021.02.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 圓岡 真宏, Zhang Panpan, 鈴木 淳
2. 発表標題 スクランブラーゼXkr4の活性制御と機構
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 圓岡 真宏, Zhang Panpan, 鈴木 淳
2. 発表標題 スクランブラーゼXkr4の生体内における役割
3. 学会等名 第3回 細胞死コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 圓岡 真宏, 下村真由, Zhang Panpan, 鈴木 淳
2. 発表標題 オルガネラとの相互作用による細胞膜スクランブラーゼXkr4の制御
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Maruoka
2. 発表標題 Molecular basis of developmental disorders based on the failure of unwanted cell removal
3. 学会等名 Minisymposium-Kyoto University & Academia Sinica（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiro Maruoka
2. 発表標題 Molecular basis of developmental disorders based on the failure of unwanted cell removal
3. 学会等名 Frontier in life science -next generation- National Taiwan University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 圓岡 真宏
2. 発表標題 スクランブラーゼXkr4の活性制御機構
3. 学会等名 日本Cell Death学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 圓岡 真宏
2. 発表標題 Role of scramblase Xkr4 in the brain
3. 学会等名 iCeMS-ASHBi exchange gathering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 圓岡真宏, Panpan Zhang, 鈴木 淳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 131
3. 書名 実験医学	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Xkr4ポリペプチド、XRCC4ポリペプチド、および目的とする表現型に対応する遺伝子を特定する方法	発明者 鈴木淳、圓岡真宏、 Panpan Zhang	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、178281	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

DNA修復タンパク質XRCC4によるスクランブラーゼ制御 http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2021/08/RBC169-0827-2.pdf 細胞死の目印の動態を解明 https://www.icems.kyoto-u.ac.jp/people/fai/4347/ 不要な細胞の除去機構の発見 -核内因子が直接細胞膜に作用する！ - https://www.icems.kyoto-u.ac.jp/news/3946/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------