

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05651

研究課題名(和文) Xkr8による細胞膜リン脂質のスクランブル機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of phospholipid scrambling on plasma membranes by Xkr8

研究代表者

鈴木 淳 (Suzuki, Jun)

京都大学・高等研究院・教授

研究者番号：30511894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてはアポトーシス時に活性化してホスファチジルセリン(PS)を細胞表面に露出するXkr8並びにそのファミリーメンバーについて解析を行った。その結果、Xkr8がアポトーシス時にCaspase3によってC末端を切断されることでダイマー化し活性化することが分かった。また、Xkr8はサブユニットとしてBSG/NPTNと結合しており、それらと結合することで細胞膜に輸送されることが分かった。またXkrファミリーメンバーにおいては、Xkr8とは異なるサブユニットがある可能性を示し、それを同定するためのスクリーニング系を樹立し、スクリーニングを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞がアポトーシスによって死んだ時には、"Eat-me signal"としてホスファチジルセリン(PS)を細胞表面に露出することでマクロファージ等の食細胞に貪食されることが知られている。本研究はPSを露出するXkr8について解析し、Xkr8がどのように活性化してPSが露出されるのかを明らかにした。これにより今後この過程を薬剤等で制御することで、生体にとって不必要なものを貪食させることができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated the mechanisms of phosphatidylserine (PS) exposure during apoptosis by Xkr8 and its family members. As a result, I found that Xkr8 is cleaved at its C-terminal region of Caspase3, which results in dimerization of the molecules to be activated. The subunit analysis of Xkr8 identified BSG and NPTN as binding partners of Xkr8. Without binding to them, Xkr8 cannot reach to the plasma membrane, indicating that they function as chaperones to take Xkr8 to the plasma membrane. I also found that other Xkr family members are not dependent on BSG or NPTN to localize to the plasma membrane, suggesting that other chaperones are required for other family members. Finally, the screening system to discover the chaperones were established.

研究分野：脂質生物学

キーワード：ホスファチジルセリン 貪食 スクランブラーゼ Xkr8 カスパーゼ ダイマー サブユニット Xkrファミリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成するリン脂質は非対称性を有しておりホスファチジルセリン (PS) は細胞膜の内側に存在している。しかしながら細胞がアポトーシスにより死んだ時にはこの非対称性は崩壊し、PS は細胞表面に露出する。PS を表面に露出する分子はスクランブラーゼとよばれ、脂質を区別なく双方に輸送すると考えられていたがその分子的实际体は分かっていなかった。我々は、10 回膜貫通タンパク質の Xkr8、並びにそのファミリータンパク質 Xkr4、Xkr9 をリン脂質スクランブルリングの実行因子として同定したが、その詳細な分子機構については分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究期においては、Xkr ファミリーの機能の分子の基盤を明らかにすることを目的として、その第一段階として Xkr8 に注目し以下の 2 点について解析を行うことにした。

複合体の構成タンパク質 アポトーシス時の活性化機構

またそこで得た知見をベースにファミリーメンバーの解析を行い、Xkr 全体の分子の基盤を記述することを目標とした。

3. 研究の方法

複合体の構成タンパク質

Xkr8 欠損細胞に Xkr8 の N 末端に V5、C 末端に FLAG を付加したものを発現させる。細胞を低張液中で Dounce Homgenizer を用いて破碎した後、800g, 10 min で遠心し核を除き、上清を 8,000 g, 10 min で遠心後ミトコンドリア画分を除く。その後、上清を 100,000 g で遠心して膜画分を取得後、様々な界面活性剤を用いて膜画分を可溶化する。可溶化した膜画分を Blue Native- (BN) PAGE で泳動し、Xkr8 複合体を壊さない界面活性剤を同定後、その界面活性剤を用いて可溶化した膜画分から Xkr8 複合体を免疫沈降し、複合体に含まれるサブユニットを同定する。

アポトーシス時の活性化機構

これまでの解析から Xkr8 はアポトーシス刺激によって C 末端の細胞内領域がカスパーゼ 3 によって切断されることで活性化することが分かっているがそれによりどのような変化が起こるのかは分かっていない。そこで、Xkr8 の野生型を発現する細胞、C 末端のカスパーゼ 3 認識配列に変異が導入された変異体を発現する細胞を 10 uM の Staurosporine (STS) により 2 時間半刺激後、膜画分を調製し可溶化後、BN-PAGE で泳動する。その後、N 末端側に付加した V5 に対する抗体を用いて複合体を検出する。また、密度勾配遠心を用いて同様に膜画分を可溶化したサンプルを分画し、Xkr8 複合体にどのような変化が起きるか観察する。

4. 研究成果

複合体の構成タンパク質

BSG/NPTN の同定

Xkr8 発現細胞の膜画分を可溶化後、様々な界面活性剤で可溶化し解析した結果、例えば TritonX-100 や NP40 を用いた際には複合体が小さくなることが分かった。一方で、DDM や Digitonin を用いて可溶化した時には大きな複合体が保持されることが分かった。そこで、Xkr8 発現細胞より膜画分を調製後、さらにスクロースを用いた密度勾配遠心により Lgith 膜画分を調製し、Digitonin により可溶化した。その後、anti-FLAG 抗体が結合したビーズを用いて免疫沈降を行い、ビーズに TritonX-100 を加えて複合体を崩壊させた。遠心後、Triton による溶出物を SDS-PAGE で電気泳動し、銀染色によりタンパク質を検出したところ、50~60 kDa のところにスミアなパターンを示すバンドを得た。これを切り出し Mass spectrometry によって解析したところ 1 回膜貫通領域を持ち、同じファミリーに属する BSG と NPTN であることが分かった。

BSG/NPTN の機能解析

Xkr8 発現細胞において CRISPR/Cas9 を用いて BSG と NPTN の両方をノックアウトすると Xkr8 が細胞膜に局在できないことが分かった。この細胞に BSG と NPTN のどちらか一方を発現させてやると細胞膜への局在が回復した。この結果と同様に、BSG と NPTN の両方をノックアウトすると Xkr8 複合体が消失し、どちらかを戻すことで複合体が回復した。これらの結果より、Xkr8 は BSG もしくは NPTN のどちらか一方と複合体を形成することで細胞膜へ運ばれることが分かった。一方で、BSG と NPTN の両方を欠損させた細胞に Xkr ファミリーメンバーの Xkr4 と Xkr9 を発現させたときには細胞膜に局在することが分かった。これは、Xkr ファミリーメンバーにおいては異なるタンパク質をサブユニットとして用いている可能性を示している。

Xkr ファミリーのサブユニット

Xkr4 において複合体を解析すると Xkr4 以外のタンパク質は含まれていないことが分かった。ゆえに、細胞膜に移行させるサブユニットがあるとすると、Xkr4 を細胞膜に移行させた後、Xkr4 から解離していると考えられた。これは、Xkr4 を細胞膜に移行させるシャペロンを同定するためには、タンパク質間結合を指標とした生化学的なアプローチではなく、遺伝学的なアプローチが適していることを意味している。そこで、活性化型 Xkr4 に tagRFP を付加したも

のを細胞に発現させ、NBD-PC の取り込み活性をスクランブラーゼ活性の指標にした遺伝学的スクリーニングを行うことにした。すなわち、活性化型 Xkr4-tagRFP を発現している細胞に CRSPR/Cas9 sgRNA library を発現させ、Xkr4 の発現はあるものの (tagRFP positive)、NBD-PC の取り込み活性が無い細胞集団を Flow cytometer を用いてソーティングした。その結果、そのような細胞が濃縮されることが分かった。現在、この細胞よりゲノム DNA を調製し、組み込まれた sgRNA を PCR により増幅し、次世代シーケンサーを用いて解析している。

アポトーシス時の活性化機構

Xkr8 複合体の変化

Xkr8 発現細胞を 10 μ M の STS により 2 時間刺激後、膜画分を取得して界面活性剤で可溶化後 BN-PAGE により解析したところ、DDM や Digitonin を用いた場合には複合体が不安定になることが分かった。そこで再度界面活性剤について調べると LMNG を用いた時に複合体が安定になることが分かった。そこで LMNG を用いて解析を進めた結果、Xkr8 複合体は Xkr8 の C 末端がカスパーゼ 3 によって切断された後、ダイマー化することが分かった。Xkr8 のカスパーゼ 3 認識配列に変異が挿入された Xkr8 に関してはダイマー化しなかったことから、Xkr8 はカスパーゼ 3 によって切断されることでダイマー化して活性化すると結論付けた。次に、カスパーゼによる切断が活性化の十分条件であるか否かを調べるためにカスパーゼによって切断された形の Xkr8 を細胞に発現させたところ、ER exit signal を失うために細胞膜に移行することができなかった。これより、Xkr8 の活性化にカスパーゼ 3 による切断が十分であるかどうかは今後の課題とした。

Xkr4 複合体の変化

一方で、Xkr4 に関しては、C 末端を欠損させた変異体 (C) を発現させると細胞膜に移行した。しかしながら NBD-PC の取り込み活性を調べてみると全く無いことが分かった。そこで、カスパーゼ 3 による切断のみでは活性化にとって不十分であると考え、Xkr4 C を発現させた細胞において自発的に活性を獲得した細胞を Flow cytometer を用いてソーティングし、活性化細胞を取得した。次いでこの細胞より cDNA Library を作製し丁寧に調べたところ、Xkr4 C に変異が挿入された恒常活性化型変異体を複数得た。この変異体を用いて、上述した Xkr4 のサブユニットの同定を試みた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Gyobu S, Miyata H, Ikawa M, Yamazaki D, Takeshima H, Suzuki J, Nagata S. A Role of TMEM16E Carrying a Scrambling Domain in Sperm Motility. *Mol Cell Biol*. 2015 Dec 14;36(4):645-59.
2. 鈴木 淳, アポトーシス、生体の科学、2015、518-519
3. 鈴木 淳, 膜リン脂質の非対称性を崩壊させる分子機構、実験医学、2015、57-61
4. 鈴木 淳, 細胞膜リン脂質のスクランブル機構、生化学、2015、422-427
5. Ishihara K, Suzuki J, Nagata S. Role of Ca(2+) in the Stability and Function of TMEM16F and 16K. *Biochemistry*. 2016 Jun 14;55(23):3180-8.
6. Suzuki J, Imanishi E, Nagata S. Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 23;113(34):9509-14.
7. Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ*. 2016 Jun;23(6):952-61.
8. 鈴木 淳, スクランブラーゼによる細胞膜リン脂質非対称性の崩壊、生体の科学、2016、208-213
9. Gyobu S, Ishihara K, Suzuki J, Segawa K, Nagata S. Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jun 13;114(24):6274-6279.
10. 鈴木 淳, リン脂質スクランブルによる細胞膜非対称性の崩壊、臨床免疫・アレルギー科、2018
11. 瀬川勝盛、鈴木 淳, フリッパーゼとスクランブラーゼによる細胞膜リン脂質の分布制御、2018

[学会発表](計 23 件)

1. 鈴木 淳, 細胞膜リン脂質のスクランブルを担うタンパク質の同定、微生物研究所セミナー、2015
2. 鈴木 淳, 長田重一、細胞膜リン脂質のスクランブル機構、BMB2015、2015

3. 鈴木 淳、細胞膜リン脂質スクランプリングの分子機構、生理学研究所研究会、2015
4. Jun Suzuki, Identification of phospholipid-scrambling proteins, KIST Seminar, 2015
5. Jun Suzuki, Identification of phospholipid-scrambling proteins, International conference on proteoglycans, 2015
6. 鈴木 淳、リン脂質スクランブラーゼの同定と今後の課題、阿波踊りシンポジウム、2015
7. 鈴木 淳、長田 重一、アポトーシス時のリン脂質のスクランブル機構、蛋白質学会年会、2015
8. 鈴木 淳、細胞膜におけるリン脂質スクランブル 分子同定から機能解析まで、Advanced Seminar, 2016
9. Jun Suzuki, Phospholipid-scrambling proteins on the plasma membranes, Bangarol Life Science cluster-iCeMS Joint Meeting, 2016.
10. 鈴木 淳、"Eat-me signal"-mediated Scrap & Build、新学術「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」キックオフシンポジウム、2016
11. 鈴木 淳、長田重一、Mechanism of phospholipid scrambling during apoptosis、日本生化学会大会、2016
12. Jun Suzuki, Phospholipid-scrambling proteins on the plasma membranes, 21st iCeMS International Symposium, 2016
13. Jun Suzuki, Shigekazu Nagata, Phospholipid scrambling on the plasma membranes, Korea-Japan Bioactive Lipid Joint Symposium, 2016
14. 鈴木 淳、スクランブラーゼによるホスファチジルセリン露出の分子メカニズム、Brain Club, 2016
15. Jun Suzuki, Phospholipid scrambling on the plasma membranes, The SPIRITS Symposium: Multi-disciplinary approaches for cell control, 2017.
16. 鈴木 淳、Phospholipid scrambling –lesson from mutants- CONBIO2017, 2017
17. 鈴木 淳、アポトーシス時のリン脂質スクランブル、Cell Death 学会、2017
18. 鈴木 淳、Molecular Mechanisms of exposing "Eat-me" signal on the cell surface, 日本細胞生物学会、2017
19. Jun Suzuki, Phospholipid scrambling on the plasma membranes, Japan-Korea lipid joint symposium, 2018
20. 鈴木 淳、細胞膜におけるリン脂質スクランプリングの制御機構、生化学会大会、2018
21. 鈴木 淳、Phospholipid scrambling on the plasma membranes、生命科学シンポジウム、2018
22. Jun Suzuki, Phospholipid scrambling on the plasma membranes, iCeMS-iTHEMS joint workshop on interdisciplinary biology, 2018
23. Jun Suzuki, Mechanisms of phospholipid scrambling on the plasma membranes, The SPIRITS Symposium: Regulation of cell fate and disease treatment, 2019.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.suzuki.icems.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。