

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790278

研究課題名(和文) TMEM16ファミリーの機能解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of TMEM16 family members

研究代表者

鈴木 淳 (Suzuki, Jun)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30511894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常細胞において細胞膜を構成するリン脂質は非対称的に分布している。しかしながらその非対称性は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によって崩壊する。本研究においては10個のメンバーより成るTMEM16ファミリーの機能解析を行い、TMEM16C,D,F,G,Jの5つのメンバーにカルシウム依存的なリン脂質スクランブル活性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Phospholipids are asymmetrically distributed in plasma membranes. However, its distribution is disrupted by phospholipid scramblases, which transport lipids bidirectionally and nonspecifically. In this study, I investigated molecular functions of TMEM16 family members, and found that TMEM16C, D, F, G, and J possessed phospholipid scrambling activity.

研究分野：膜脂質学

キーワード：TMEM16F TMEM16 Xkr8 Xkr Scramblase リン脂質スクランブリング ホスファチジルセリン アポトーシス

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) は主に細胞膜の内側に、ホスファチジルコリンは細胞膜の外側に位置している。しかしながらこの非対称性は生体内において様々な局面で崩壊し、PS は細胞表面に露出する。この過程にはリン脂質を区別なく双方向に輸送する (スクランブルする) スクランブラーゼが関わりとされていたがその分子の実体は長い間不明のままであった。我々は、リン脂質スクランブルに関与するタンパク質を同定することを目的として研究を進め、8 回膜貫通タンパク質の TMEM16F を同定した。TMEM16F はカルシウム依存的にリン脂質のスクランブルを行い、TMEM16F を欠損した細胞ではリン脂質のスクランブルが起らない。また、血小板においてリン脂質のスクランブルが起らないことにより血液凝固に異常をきたすスコット症候群の患者において、TMEM16F に変異があることを見つけた。

2. 研究の目的

TMEM16F は 10 個のメンバーより成る TMEM16 ファミリーに属している。2008 年に異なる 3 つのグループより、TMEM16A, 16B がカルシウムによって活性化されるクロライドチャンネルであると報告されている。しかしながら他のメンバーの機能についてはほとんど解析されていない。そこで本研究においては TMEM16 ファミリーメンバーの個々の機能を明らかにすることを目的とした。そしてその解析をもとに、TMEM16 ファミリーによるリン脂質スクランブルの活性制御を理解し、アポトーシス時のリン脂質スクランブルについても研究を進展させようと考えた。

3. 研究の方法

TMEM16 ファミリーにおいてクロライドチャンネル活性、リン脂質スクランブル活性の有無を調べる。クロライドチャンネル活性に関しては、カルシウムによって活性化されるクロライドチャンネル活性がほとんどみられない 293T 細胞に TMEM16 ファミリーを一過的に発現させ、パッチクランプ法により流れる電流を計測する。リン脂質スクランブル活性に関しては、スクランブル活性が無い TMEM16F ノックアウト細胞に TMEM16 ファミリーを安定的に発現させ、蛍光プローブを用いて脂質の動きを調べる。

4. 研究成果

A. TMEM16 ファミリーの解析

TMEM16 ファミリーのクロライドチャンネル活性に関して調べたところ、TMEM16A, 16B に関しては論文の報告通り強いチャンネル活性が確認できた。一方でリン脂質を動かす TMEM16F に関してはほとんど電流を確認することができなかった。他のファミリーメンバーについても同様で、クロライドチャンネル活性を確認することはできなかった。一方で、リン脂質スクランブル活性について調べたところ、クロライドチャンネル活性を有する TMEM16A, 16B に関してはリン脂質を動かすことはできなかった。一方で、TMEM16F 以外に TMEM16C, 16D, 16G, 16J の 4 つのメンバーにおいて活性を確認することができた。特に TMEM16C においては、顎部ジストニアの原因遺伝子であることが分かっており、今後リン脂質のスクランブルの神経系における機能に注目して研究を行う必要があるだろう。また TMEM16F と最も相同性の高い TMEM16E においては細胞膜上でのスクランブル活性が認められなかったが、細胞膜ではなく細胞内に局在すると報告されている。TMEM16E はヒトにおいて顎骨骨幹異形成症や筋ジストロフィーの原因遺伝子であることが知られており、TMEM16E にリン脂質スクランブル活性があるのか、またその場合生理的役割は何なのか明らかにする必要があると考えている。また、TMEM16E と同様に細胞内に局在すると考えられる TMEM16K に関しては小脳失調症の原因遺伝子であることが分かっており、今後スクランブル活性をもつのか検証する必要があるだろう。

以上の結果より、TMEM16 ファミリーはクロライドチャンネル活性を持つグループとリン脂質スクランブル活性をもつグループに分けられることが分かった。

B. TMEM16A と TMEM16F の比較

次にクロライドチャンネル活性をもつ TMEM16A とリン脂質スクランブル活性をもつ TMEM16F を比較することでイオン、もしくは脂質を動かすのに特異的な領域、また相同性のある領域を同定しようと考えた。具体的には、両タンパク質共に 8 回膜貫通領域を有しているため、それぞれの膜貫通領域の部位でタンパク質を入れ替えて活性を計測することで、チャンネルもしくはスクランブル活性に必要な領域を絞り込もうと考えた。しかしながらそれぞれの膜貫通領域で入れ替えた変異体はいずれの活性も示さなかった。一方で N 末端、C 末端のそれぞれの細胞内領域を入れ替えた変異体においては活性を示したことから、細胞内領域においては共通の働きをもっていると結論付けた。またそれぞれの活性を抑える薬剤を調べたところ、EGCG においては TMEM16F の活性を特異的に抑制し、digallic acid に関しては TMEM16A の活性を特異的に抑制することが分かった。

C. Xkr8 の同定

TMEM16C, 16D, 16F, 16G, 16J においては、カルシウム刺激依存的なリン脂質のスクランブルに関わっていることが分かったが、アポトーシス時のリン脂質のスクランブルには関わっていなかった。つまりアポトーシス時には異なる別のタンパク質が関与することが示唆された。そこで、Ba/F3 細胞より調製した cDNA library を用いて発現クローニングを行ったところ、6 回膜貫通タンパク質の Xkr8 を同定することができた。Xkr8 を欠損した細胞は、アポトーシス刺激によるリン脂質のスクランブルが完全に抑制されたが、カルシウム刺激依存的なスクランブルには影響がなかった。つまり、カルシウム刺激依存的な時には TMEM16F、アポトーシス刺激依存的な時には Xkr8 と、それぞれの状況に応じてリン脂質をスクランブルするタンパク質を細胞が使い分けていることが分かった。

これまでの研究によって、Raji 細胞と PLB985 細胞という 2 つの白血病細胞において、アポトーシス時のリン脂質スクランブルに異常があることが分かっている。そこで、これらの細胞において Xkr8 の発現を調べたところほとんど発現していないことが分かった。そこでこれらの細胞に外から Xkr8 を導入してやると、アポトーシス時のリン脂質スクランブルが回復した。それではなぜこれらの細胞において Xkr8 がほとんど発現していないのだろうか？ Xkr8 のプロモーター領域を調べると CpG island が存在し、Raji 細胞と PLB985 細胞では高頻度でメチル化されていることが分かった。メチル化阻害剤で処理すると Xkr8 の発現が上昇し、リン脂質のスクランブルも回復した。

最後に Xkr8 の個体における機能を解析しようと考えた。マサチューセッツ工科大学の Robert Horvitz 研究室との共同研究で Xkr8 の線虫のホモログである CED8 を解析した。すると CED8 欠損個体においては死んだ細胞が食細胞によって貪食されないことが分かった。以上より線虫の CED8 からヒトの Xkr8 まで、アポトーシス時にリン脂質をスクランブルすることで PS を細胞表面に露出し、食細胞による貪食を促進していることが分かった。

D. Xkr ファミリーの解析

Xkr8 は 9 つのメンバーより成る Xkr ファミリーに属している。Xkr8 欠損細胞にそれぞれのファミリーメンバーを発現させアポトーシス時のリン脂質のスクランブルを解析したところ、Xkr8 以外に Xkr4, Xkr9 がリン脂質スクランブル活性をもつことが分かった。興味深いことに、これら 3 つのメンバーにおいては C 末端の細胞内領域にカスパーゼ切断部位を有しており、アポトーシス時に切断されることで活性化することが分かった。組織での

発現を調べてみると、Xkr8 はユビキタスに弱いレベルで発現しているが、Xkr4 は脳で発現が非常に強く Xkr9 は腸組織に限局して発現していることが分かった。今後、これらの組織において Xkr ファミリーがどのような生理的役割を担っているのか明らかにする必要があるだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, Horvitz HR, Nagata S. (2013) Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science*, 341:403-406.
2. Suzuki J, Fujii T, Imao T, Ishihara K, Kuba H, Nagata S. (2013) Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J Biol Chem*, 288:13305-13316.
3. 鈴木 淳, 長田重一 アポトーシスをおこした細胞における Xkr8 によるホスファチジルセリンの露出 **ライフサイエンス新着レビュー**
4. Suzuki J, Imanishi I, Nagata S. (2014) Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members. *J Biol Chem*, 289:30257-30267.
5. Segawa K, Suzuki J, Nagata S. (2014) Flippases and scramblases in the plasma membrane. *Cell Cycle*, 13:2990-2991.
6. Suzuki J, Nagata S. (2014) Phospholipid scrambling on the plasma membrane. *Methods Enzymol*, 544:381-393.
7. Suzuki T, Suzuki J, Nagata S. (2014) Functional swapping between TMEM16A and TMEM16F. *J Biol Chem*, 289:7438-7447.
8. 鈴木 淳, 長田重一 (2014) アポトーシス細胞のホスファチジルセリンの露出に関与する Xkr8 の同定 **実験医学** 32:74-77.
9. 鈴木 淳 (2014) 生命を支える脂質 - 最新の研究と臨床-(リン脂質スクランブラーゼの稿担当) **医学のあゆみ** 248:1137-1141.
10. Takatsu H, Tanaka G, Segawa K, Suzuki J, Nagata S, Nakayama K, Shin HW. (2014) Phospholipid Flippase Activities and Substrate Specificities of Human Type IV P-type ATPases Localized to the Plasma Membrane. *J Biol Chem*, 289:33543-33556.

[学会発表](計 20 件)

1. Suzuki J. (2012/2/17) Phospholipid

- scrambling on plasma membrane. Kyoto University COE Course Meeting (Alleygy and Immunology area), Kyoto.
2. 鈴木 淳、長田重一 (2012/3/29) 細胞膜リン脂質のスクランブル 日本薬学会第132回年会、北海道
 3. 鈴木 淳、長田重一 (2012/5/9) 細胞膜リン脂質のスクランブル 日本膜学会第34回年会、東京
 4. 鈴木 淳、長田重一 (2012/6/8) 細胞膜リン脂質のスクランブル 第7回トランスポーター研究会、京都
 5. Suzuki J, Nagata S. (2012/10/5) Phospholipid scrambling on plasma membrane. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposim/Retreat. Plenary session. Hyogo.
 6. Suzuki J. (2013/5/24) Molecular Mechanism of Phospholipid Scrambling. Joint Seminar, Kyoto.
 7. 鈴木 淳 (2013/8/16) 細胞膜リン脂質のスクランブル機構 生命科学阿波踊りシンポジウム、徳島
 8. 鈴木 淳、長田重一 (2013/9/13) 細胞膜リン脂質のスクランブル機構 日本生化学会大会、横浜
 9. Suzuki J. (2013/10/4) Molecular Mechanism of Phosphatidylserine Exposure. Stanford University Seminar, USA.
 10. Suzuki J. (2013/10/7) Identification of membrane proteins regulating phosphatidylserine exposure in apoptotic cells and activated platelets. Yale University Seminar, USA.
 11. 鈴木 淳 (2013/10/22) 細胞膜リン脂質のスクランブル機構 奈良先端未来開拓コロキウム、奈良
 12. 鈴木 淳 (2013/11/15) Molecular Mechanism of Phosphatidylserine Exposure. 東京医学会、東京
 13. Suzuki J. (2013/11/29) How dead cells display "eat-me signal" Kyoto University COE Course Meeting, Kyoto.
 14. 鈴木 淳、長田重一 (2013/12/4) Mechanism of Phosphatidylserine Exposure in Apoptotic Cells. 日本分子生物学会年会、神戸
 15. 鈴木 淳 (2014/7/1) リン脂質のスクランブル機構 名古屋大学理学部生命理学科セミナー、名古屋
 16. Suzuki J. (2014/9/1) Molecular Mechanism of phosphatidylserine exposure. RIKEN BSI FORUM, Saitama.
 17. 鈴木 淳 (2014/10/15) 細胞膜リン脂質スクランブルの分子機構の解明 日本生化学会奨励賞 受賞講演 日本生化学会大会、京都
 18. 鈴木 淳、長田重一 (2014/10/16) 細胞膜リン脂質のスクランブル機構 日本生化学会大会、京都

19. Suzuki J. (2014/10/26) Identification of phosphatidylserine-exposing protein. International Meeting of the Advanced Cancer Biology in memory of Dr. Hidesaburo Hanafusa, Nagoya.
20. Suzuki J, Nagata S. (2015/2/12) Identification of phospholipid-scrambling proteins. 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Tokyo.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計2件)

名称: Methods for screening a modulator of a tmem16 family member.

発明者: Nagata S, Suzuki J

権利者: Kyoto University

種類:

番号: PCT/JP2013/061699,

出願年月日: 2013/10/24

国内外の別: 国際特許出願

名称: Method for screening substance controlling function of xkr8.

発明者: Nagata S, Suzuki J, Fujii T.

権利者: Kyoto University

種類:

番号: PCT/JP2013/080692,

出願年月日: 2013/11/13

国内外の別: 国際特許出願

○取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~nagata/>

6. 研究組織

研究代表者: 鈴木 淳

研究者番号: 30511894