

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20890109

研究課題名（和文） アポトーシス細胞のホスファチジルセリン露呈機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of phosphatidylserine exposure in apoptotic cells

研究代表者

鈴木 淳（Suzuki Jun）

京都大学・医学研究科・特定研究員（科学研究）

研究者番号：30511894

研究成果の概要（和文）：アポトーシス細胞のホスファチジルセリン（PS）露呈機構を研究目的として研究を進めた。結果、Ca²⁺をPS露呈のエフェクターとして絞り込み、Ca²⁺ ionophore A23187を用いることで、細胞が生きたままPSを露呈する実験系を樹立することができた。

研究成果の概要（英文）：I investigated the mechanisms of phosphatidylserine (PS) exposure in apoptotic cells. Ca²⁺ was found to be the effector for PS exposure. Using Ca²⁺ ionophore A23187, I designed the experimental system in which cells externalize PS without dying.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,040,000	312,000	1,352,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,380,000	714,000	3,094,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 生理学一般

キーワード：アポトーシス・ホスファチジルセリン・カルシウム

1. 研究開始当初の背景

生物の発生過程において、多くの細胞が増殖し分化するとともにアポトーシスにより死滅する。アポトーシスは、生体において不要になった細胞を除去するのに必要なプロセスであり、死細胞は速やかにマクロファージにより貪食され消化される。マクロファージは、アポトーシスを起こした細胞を貪食するが生きている細胞を貪食することはない。このことから、マクロファージはアポトーシ

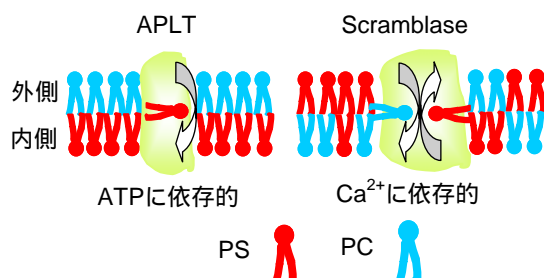
ス細胞の表面上にある“Eat-me-signal”を特異的に認識して貪食していると考えられる。

当研究室において、この貪食過程を阻害するモノクローナル抗体をスクリーニングしたところ、炎症時に腹腔に遊走される滲出マクロファージにおいてはMFG-E8という分子を、腹腔在住マクロファージにおいてはTIM4という異なった分子を用いてアポトーシス細胞を認識していることが分かった

(Hanayama et al., 2002 Nature; Miyanishi et al., 2007 Nature)。これら2つのタンパク質は、アポトーシス細胞表面に特異的に露呈されるリン脂質、ホスファチジルセリン (PS) を認識し、マクロファージによる貪食を促進していることから、少なくともこの場合、PSが”Eat-me-signal”として作用していると考えられた。

生きた細胞において、細胞二重膜を構成するリン脂質は、その内と外とで非対称性を保持しており、細胞膜の外側は主にホスファチジルコリン (PC)、内側はPSやホスファチジルエタノールアミンによって構成されている。この膜の非対称性に関して、これまでに国内外の多くのグループが研究に取り組み、以下の仮説を提唱している。

- ①PSは正常状態では、ATP依存のAminophospholipid translocase (APLT)によって膜の内側に保持されている。
- ②PSはアポトーシス時には、APLTが不活性化され、Ca²⁺依存的にランダムに脂質を交換するScramblaseという酵素によって膜の外側に露呈される。



APLT、Scramblase という仮定的な酵素についてはそれぞれ幾つかの候補分子が同定されているが、アポトーシス時におけるPSの露呈を説明できるものは未だ無い。そもそもPSの露呈が、膜にあると「仮定されている」酵素のみで制御されているのか、他の細胞内因子が関わっているのかということもほとんど分かっていない。更には、PSの非対称性の維持とアポトーシス時のその破綻にそれぞれ異なる酵素が必要であるという考え方を支持する確固たる実験証拠さえないとされる。

上記の問題点を解決するためにはまず、APLT、Scramblase、それぞれの候補分子の同定に至った実験を追試することから始めることが重要であると考えた。その中で実験の

妥当性、解釈の正しさを追究し、本当に解決すべき問題点を絞り込むことが必要であると思われた。問題点を絞り込んだあとは、その現象を正確に評価するためのアッセイ系を確立し分子同定に迫ろうと考えた。

2. 研究の目的

アポトーシス時におけるPS露呈機構を明らかにすることを研究目的とする。その第一段階として、PS露呈においてアプローチすべき問題を絞り込む。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス細胞でのCa²⁺

アポトーシス時には細胞内Ca²⁺が上昇することが知られている。そこで、マウス白血病細胞WR19LにFasを発現させた細胞 (W3細胞) を用いてアポトーシス時のPS露呈におけるCa²⁺の必要性を調べた。具体的には、Fas ligandによりアポトーシスを誘導し、細胞外Ca²⁺が存在しない、もしくは細胞内Ca²⁺をBAPTA-AMによりキレートした状態でPS露呈を調べた。

(2) 薬剤処理細胞でのCa²⁺

マウス白血病細胞を用いて薬剤処理時のPS露呈におけるCa²⁺の必要性を調べた。具体的には、速やかなPS露呈を誘導することが知られているシステイン残基修飾剤N-ethylmaleimide (NEM)、もしくはCa²⁺ ionophore A23187を用いて、細胞内Ca²⁺をBAPTA-AMによりキレートした状態でのPS露呈を調べた。

(3) 赤血球細胞膜でのCa²⁺

(過去の実験の追試)

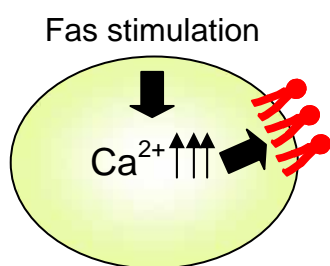
マウス赤血球を低張液で破碎し繰り返し洗浄することで純化した細胞膜を得た後、低イオン濃度かつ塩非存在下の溶液中でインキュベートすることで膜の表裏が反転したInside-out (IO) vesicleを得た。このIO vesicleの外側膜を蛍光付加したPS、NBD-PSを用いて標識し、Ca²⁺刺激後のNBD-PSの動きをモニタリングした。

4. 研究成果

(1) アポトーシス細胞でのCa²⁺

上記W3細胞をFas ligandによりアポトーシス誘導した。その結果、細胞外Ca²⁺が存在しない状態ではPS露呈が著しく阻害された。また、細胞内Ca²⁺をBAPTA-AMによりキレートすると、PS露呈はほぼ完全に抑えられた。

そこで、Ca²⁺のキレートがアポトーシスのシグナル伝達そのものに影響を与えている可能性を考え、アポトーシスの指標であるCaspase-3の活性化やDNAの断片化などを調べた。すると、それらのアポトーシスの形質には全く影響が無かったことから、アポトーシス細胞のPS露呈にCa²⁺がより直接的に関与していると結論した。



アポトーシス時のCa²⁺レベルの上昇により、PSは細胞膜外側に露呈される。

(2) 薬剤処理細胞でのCa²⁺

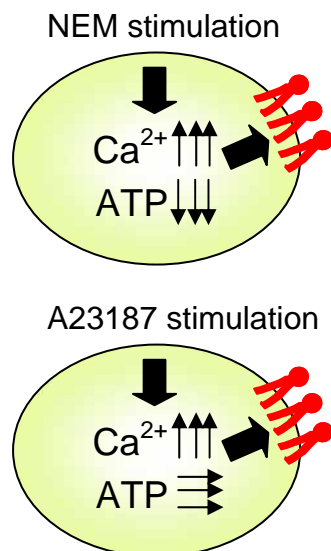
上記WR19L細胞を用いてシステイン残基修飾剤NEM処理時のPS露呈におけるCa²⁺の必要性を調べた。その結果、NEM処理による10分程度での速やかなPS露呈は細胞内Ca²⁺をBAPTA-AMによりキレートすることでほぼ完全に抑えられた。

NEMはAPLTを阻害することでPS露呈を促進すると考えられていたが (Zachowski et al., 1989 Nature)、アポトーシス細胞と同じくCa²⁺を用いていることが分かった。

この時、細胞内ATPレベルを調べてみるとNEM処理により激減していた。そこで、PS露呈にATPの減少が必要であるかを調べるために、Ca²⁺ ionophore A23187を用いてCa²⁺の流入のみでPS露呈が起こるか調べた。その結果、細胞外Ca²⁺が存在しない状況でもA23187により、速やかにPSが露呈した。この反応は、細胞内Ca²⁺をBAPTA-AMによりキレートすることでほぼ完全に抑えられることからCa²⁺に依存적であり、小胞体などに貯蓄されたCa²⁺が利用されたと考えられる。またこの時、細胞内ATPレベルは変わらないことから、ATPの減少

よりも、Ca²⁺がより直接的にPS露呈に関与していると結論した。

一方、驚くことに、A23187処理でPS露呈した細胞は、時間が経過(約12時間)するとA23187が失活し、PSが元通り膜の内側に戻り、細胞増殖することが分かった。つまり、A23187処理時に細胞外Ca²⁺を一時的に除くことで、細胞を生かさせたままPSを露呈させる実験系を構築できた。



NEM刺激においては、細胞はCa²⁺レベルの上昇とATPレベルの減少を伴いPSを露呈するが、A23187刺激では、ATPレベルの減少を伴わずにPSを生きたまま露呈する・

(3) 赤血球細胞膜でのCa²⁺ (過去の実験の追試)

Bassé等 (1996, J Biol Chem) は、上述した10 vesicleの系を用いて細胞膜からCa²⁺依存的酵素Scramblaseを同定した。そこで、同様の結果が再現されるか追試を行ったが再現が非常に困難であった。更に、彼等が同論文においてScramblaseとして同定したPLSCR-1は、ノックアウトマウスで何ら症状を示さず (Zhou et al., 2002 Blood)、タンパク質は核に局在するとの報告もあり (Wiedmer et al., 2003 Biochemistry)、分野は混沌としている。

以上の結果から、Ca²⁺がPS露呈のエフェクターであることが強く示された。また、A23187を用いることで、細胞が生きたままCa²⁺依存的にPSを露呈する系を構築できた。Ca²⁺のターゲットに関しては、細胞膜タンパ

ク質に限定せず、細胞質タンパク質なども頭に入れて分子同定に迫る必要があると考えられた。

[特色と独創的な点]

本研究は、アポトーシス時の PS の露呈について、既存の考え方に至った過去の実験の追試から始めていることが特色であると言える。その中で、PS露呈のエフェクターを Ca^{2+} に絞り込み、本来死細胞が露呈する PS を細胞が生きた状態で露呈できる実験系を構築したところに独創性があると考えられる。

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 1 件)

- ① Hanayama R, Miyanishi M, Yamaguchi H, Suzuki J, Nagata S. Engulfment of Apoptotic Cells and its Physiological Roles (Review) Encyclopedia of Life Science (Cell Death): 165-175, 2010.
査読有り

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 淳 (Suzuki Jun)

京都大学・医学研究科・

特定研究員 (科学研究)

研究者番号：30511894