

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	ZHANG, Panpan
論文題目	Activation mechanisms of the scramblase Xkr4		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞膜を構成するリン脂質の中でホスファチジルセリンは、通常は細胞膜の内側に位置しており、リン脂質スクランブリング (PLS) により死細胞の細胞表面に露出し、"Eat-me"シグナルとして機能する。この PLS は、スクランブラーゼと呼ばれる膜タンパク質により制御されることが知られている。これまでの鈴木グループの研究で、カスパーゼによる切断で生成された XRCC4 の C 末断片の存在下で、スクランブラーゼ Xkr4 の二量体を形成したものが活性化されることがわかっていた。しかし、XRCC4 の C 末断片がどのように Xkr4 を活性化するのかは不明であった。本研究では、Xkr4 の活性化メカニズムを解明することを目的として研究が進められた。まず、免疫沈降と質量分析を用いたタンパク質間相互作用スクリーニングを適用し、XRCC4 の C 末断片が Xkr4 のダイマーに直接結合することで Xkr4 を活性化し PLS を誘導することを示した。この解析の過程で本論文著者は、細胞外の二価陽イオンを除去すると、Xkr4 を発現する死細胞が PLS を誘導できなくなることに気づいた。生きた細胞においても恒常的に活性化する Xkr4 変異体 (aXkr4) 発現細胞も、PLS を誘導するために二価陽イオンを必要としたことから、Xkr4 の活性化に二価陽イオンが必要であると考えられた。そこで、細胞外溶液中に含まれる金属イオンをスクリーニングすることにより、Ca²⁺、Sr²⁺、Mn²⁺、Tb³⁺などの金属イオンが、異なるアフィニティで aXkr4 を介した PLS に関与することがわかった。これらのイオンの中で、Ca²⁺が最も高い親和性により Xkr4 を活性化した。また、細胞内 Ca²⁺を上昇させても aXkr4 の活性化に変化がないことから、細胞外 Ca²⁺が Xkr4 の活性化に重要であることがわかった。次いで、他の Xkr ファミリーメンバーである Xkr8 と Xkr9 の活性化における細胞外 Ca²⁺の必要性を調べると、これらのメンバーも Xkr4 と同様に Ca²⁺を必要とすることがわかった。そこで、Ca²⁺結合部位を同定するため、Xkr4、Xkr8、Xkr9 のアミノ酸配列をアラインメントした。その結果、細胞外領域に Ca²⁺結合領域はなく、予想に反して膜貫通領域 (TM) に Ca²⁺結合ポケットが形成されていることが分かった。アラニン変異を作製することにより、細胞外の Ca²⁺が膜貫通領域に流入し、TM1 の D123 と D127、TM3 の E310 と相互作用し、TM1 と TM3 をつなぐ分子接着剤として機能していることが確認された。TM1 と TM3 をつなぐ Ca²⁺の効果を証明するために、Ca²⁺結合部位にシステイン変異を導入し、人工的にジスルフィド結合を形成させた。その結果、E310C/G125C 二重変異体は、細胞外 Ca²⁺がなくても PLS を促進することができた。さらに、塩橋を生成するためにリジン、アルギニン変異を TM1 と TM3 の負電荷アミノ酸に導入した。その結果、E310K 変異体は細胞外 Ca²⁺の非存在下でも aXkr4 を活性化した。これらの結果は、Xkr4 活性化のために Ca²⁺が TM1 と TM3 をつなぐ分子接着剤として機能していることを強く示している。以上のことから、Xkr4 の活性化には XRCC4 の C 末断片が Xkr4 に結合し、さらに細胞外 Ca²⁺が Xkr4 の膜貫通領域に結合することが重要であることがわかった。核内分子と細胞外分子が連動して作用することにより、細胞膜上のリン脂質スクランブル活性が制御されていることが明らかにされた点において意義があると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、スクランブラーゼ Xkr4 の活性化に関してその分子機構を明らかにした。論文ではまず、核内に存在する XRCC4 による Xkr4 の活性化機構に関して論じられた。カスパーゼで切断されることにより生成された核内の XRCC4 断片に関して、N 末断片は他のタンパク質と相互作用していることもあり核内に留まり、天然変性領域からなる小さい C 末断片は核膜孔を通り細胞質に拡散すると考えられた。また、カスパーゼで切断された C 末断片はイソロイシンを露出するが、グリシンやアラニンに置換すると活性が消失すること、またイソロイシンの前にメチオニンを付加すると活性が消失することから、露出したイソロイシンは Xkr4 の疎水性アミノ酸と相互作用することで Xkr4 の活性化に寄与すると考えられた。また、XRCC4 の C 末断片を大腸菌で精製し Xkr4 の二量体発現細胞に導入すると、生きた細胞でも Xkr4 が活性化することから C 末断片の Xkr4 活性化への寄与は十分に示された。XRCC4 の C 末断片と Xkr4 の結合様式に関しては、今後、構造解析で明らかになることが期待される。

次に細胞外 Ca^{2+} による Xkr4 の活性化機構に関して論じられた。 Ca^{2+} の Xkr4 に対する熱安定性の実験から、単量体 Xkr4 や二量体化した Xkr4 に Ca^{2+} は結合せずに、XRCC4 の C 末断片が結合した Xkr4 二量体に Ca^{2+} は結合すると考えられた。Xkr4 の TM1 と TM3 においてジスルフィド結合を人工的に形成させる実験においても、二量体化したのみでは Xkr4 は活性化せず、XRCC4 の C 末断片の導入時のみ活性化したこと、XRCC4 の C 末断片が Xkr4 に結合することで、細胞外 Ca^{2+} が膜貫通領域に流入しやすくなると考えられた。細胞外 Ca^{2+} が膜貫通領域において 2 つの膜貫通領域を近づける“のり”としての作用をもつことを、ジスルフィド結合や塩橋の形成を用いて証明した点は評価できる。

最後に細胞外 Ca^{2+} の生理的な重要性が論じられた。細胞外には Ca^{2+} が絶えず存在するため、その有無がタンパク質の活性を変化せる意義は不明である。しかし、Xkr4 の発現する神経細胞では、シナプスの活性化時に 0.3 mM 程度まで細胞外 Ca^{2+} レベルが低下することが報告されており、ホスファチジルセリンに結合する食食因子も Ca^{2+} 依存性であることを考えると、Xkr4 の活性不全と食食因子の作用不全により重要な神経細胞 (シナプス) を食食させない役割があるのではないかと考えられた。細胞外 Ca^{2+} が膜タンパク質の活性を最終調節する分子スイッチの役割を持つ可能性を提示した点は高く評価できる。

以上のように本論文著者は、これまで未知であった Xkr4 の活性化機構を、核内で生成された XRCC4 の C 末断片の Xkr4 への結合と、細胞外 Ca^{2+} の膜貫通領域への結合という点から示し、Xkr4 の活性化機構を深く議論した

本論文は優れた論理構成によって記載されており、申請者の生命科学に対する広範かつ高度な学識、及び専攻分野における研究能力の高さを示す内容となっている。以上のことから、本論文を博士 (生命科学) の学位論文として高い価値があるものと認めた。更に、令和 5 年 11 月 16 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日