

京都大学	博士 (医学)	氏 名	鈴木 孝征
論文題目	Functional Swapping between Transmembrane Proteins TMEM16A and TMEM16F (膜蛋白質 TMEM16A と TMEM16F における機能的ドメイン交換)		
(論文内容の要旨)			
<p>生体膜を構成するリン脂質は内層と外層で非対称に分布しており、ホスファチジルセリン(PS)は内層に局在する。リン脂質の非対称性はカルシウム(Ca^{2+})依存リン脂質スクランブラーゼによって崩壊すると考えられていたが、スクランブラーゼの実体は不明であった。当研究室では、発現クローニングにより TMEM16F をスクランブラーゼとして同定した。8 回膜貫通型蛋白質の総称である TMEM16 は、10 個のメンバーによって構成されており、16A は Ca^{2+} 依存性クロライド(Cl^-)チャンネルとして機能することが報告されている。アミノ酸配列で相同性 35%、類似性 52%を示す 16A と 16F 分子が、いかなる機構でイオンチャンネル、リン脂質スクランブラーゼとして機能するのか明らかとなっていない。</p> <p>そこで、本研究は TMEM16A と 16F の構造と機能の関係を明らかにすることを目的とした。Cl^-チャンネル活性はヒト HEK293T を用いたパッチクランプ法、スクランブラーゼ活性は、TMEM16F 欠損マウス不活化胎仔胸腺細胞株を Ca^{2+}イオノフォアで処理し、露出される PS を評価した。まず、TMEM16A または 16F を発現させた各細胞の解析から、TMEM16A は Cl^-チャンネル活性を持つがスクランブラーゼ活性を持たないこと、TMEM16F はスクランブラーゼ活性を持つが Cl^-チャンネル活性を持たないことを確認した。また、クロスリンカー DSP(dithiobis succinimidylpropionate)を用いた解析から、TMEM16A および 16F がホモ二量体を形成していることも示された。</p> <p>次に、TMEM16A と 16F の細胞質内 N 末端領域(約 300 アミノ酸)、C 末端領域(約 80 アミノ酸)の機能を調べるため、エクソンを連続的に欠損させた変異体を作成した。その結果、N 末端領域(TMEM16A の 147 アミノ酸と 16F の 95 アミノ酸)は小胞体から細胞膜への移行に、また、C 末端領域(TMEM16A の 88 アミノ酸と 16F の 68 アミノ酸)は蛋白質の安定化に、それぞれ関与していることが示唆された。実際、対応するエクソンを入れ替えたキメラ変異体を解析したところ、N 末端領域(TMEM16A の 285 アミノ酸と 16F の 250 アミノ酸)と C 末端領域(TMEM16A の 88 アミノ酸と 16F の 68 アミノ酸)は機能的に交換可能であった。</p> <p>ところで、TMEM16A の第 5、第 6 番目の細胞膜貫通領域間はイオンを透過させるための孔(ポア)として作用すると考えられている。そこで、TMEM16F の対応する領域に点変異(R592E/K616E)を導入したところ、スクランブラーゼ活性は劇的に低下した。この領域は、両蛋白質間で高い相同性を示しており、TMEM16F のリン脂質スクランブルにおいても重要な役割を果たしていると考えられる。</p> <p>そこで、TMEM16A 阻害剤として知られる薬剤の、16F に対する効果を検討した。その結果、T16A_{inh}-A01 と digallic acid は効率よく TMEM16A の Cl^-チャンネル活性を抑制した($\text{IC}_{50} < 10\mu\text{M}$) が、TMEM16F のスクランブラーゼ活性への抑制効果は乏しかった($\text{IC}_{50} > 100\mu\text{M}$)。逆に、epigallocatechin-3-gallate は TMEM16A に対する抑制効果が乏しく($\text{IC}_{50} > 100\mu\text{M}$)、TMEM16F を強く抑制した($\text{IC}_{50} < 1\mu\text{M}$)。また、tannic acid は TMEM16A と TMEM16F の両方に強い抑制効果を示した($\text{IC}_{50} < 10\mu\text{M}$)。</p> <p>以上、本研究により、TMEM16A と TMEM16F は、細胞膜への移行と蛋白質の安定化に関して同じ機構を用いているが、Cl^-チャンネル活性とスクランブラーゼ活性の分子機構は異なっていると結論した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
<p>TMEM16A と 16F は、TMEM16 ファミリーに属する 8 回膜貫通型蛋白質である。TMEM16A はカルシウム依存的クロライドチャンネルとして、TMEM16F はカルシウム依存的リン脂質スクランブラーゼとして機能するが、その詳しい分子機構は明らかとなっていない。そこで、本研究では、TMEM16A と 16F の構造と機能の関係について解析した。</p> <p>まず、両蛋白質に共通する性質として、ホモ二量体を形成していること、細胞質内 N 末端領域が細胞膜への蛋白質輸送に必要であること、細胞質内 C 末端領域が蛋白質の安定化に必要であることを示した。また、細胞質内 N 末端領域と C 末端領域は、16A と 16F との間で機能的に交換が可能であることを示した。TMEM16A でイオンを透過させるためのポア(孔)として作用するとされる、第五、第六番目の細胞膜貫通領域間は、TMEM16F のスクランブラーゼ活性においても重要な役割を果たしていた。</p> <p>ついで、種々の化合物の TMEM16A, 16F に対する作用を検討し、T16A_{inh}-A01 と digallic acid が 16A を選択的に抑制するのに対し、epigallocatechin-3-gallate は 16F を選択的に抑制すること、また、tannic acid は 16A と 16F の両方を効果的に抑制することを示した。</p> <p>以上の研究は、TMEM16A と 16F の機能的領域の解明に貢献し、クロライドチャンネルとリン脂質スクランブラーゼの研究の発展、および、TMEM16 ファミリーの研究の発展に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 26 年 3 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降