

京都大学	博士 (医学)	氏名	石原 健 司
論文題目	Role of Ca ²⁺ in the Stability and Function of TMEM16F and 16K (TMEM16F と 16K の安定化と機能における Ca ²⁺ の役割)		
(論文内容の要旨)			
<p>TMEM16 ファミリーは10回膜貫通型タンパク質であり、ヒトやマウスでは10個のメンバーが存在する。これらのメンバーのうち、TMEM16A と 16B はCa²⁺依存性Cl⁻チャネル活性を持っている。また、TMEM16C、16D、16F、16G、16J は細胞膜に存在し、Ca²⁺依存性リン脂質スクランブラーゼ活性に関与している。特に TMEM16F は活性化血小板でのフォスファチジルセリンの露出に必須である。一方、細胞内小胞体中存在する TMEM16E は小胞体でのリン脂質のスクランブルに関与する可能性が指摘されているが、TMEM16H、16K の機能は不明である。また、これら TMEM16 ファミリーのタンパク質が他のタンパク質と会合しているか、Ca²⁺がこれらメンバーに直接結合するかなど蛋白化学的な性質は殆ど不明である。</p> <p>そこで、本研究では TMEM16 ファミリーのメンバーの中で最も小さく、かつマウス細胞株で最もよく発現する TMEM16K を用いて、その蛋白化学的性質を明らかにした。まず、TMEM16K を発現するマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を界面活性剤用いて可溶化し、Blue-Native PAGE (BN-PAGE) と SDS PAGE を組み合わせた二次元泳動によって TMEM16K は二量体を形成すること、他のタンパク質は会合していないことを見出した。そして、BN-PAGE により泳動したタンパク質をゲル内で ⁴⁵Ca と反応させることにより、TMEM16K に Ca²⁺ が結合することを見出した。また、TMEM16K の二量体は Ca²⁺ が存在しない界面活性剤中では不安定で、凝集体を形成することを見出し、Ca²⁺ は TMEM16K に直接結合すると結論した。Ca²⁺ による二量体の安定化は TMEM16F でも観察された。</p> <p>ところで、Ca²⁺ は Glu や Asp などの酸性アミノ酸残基に結合することが知られている。そこで、TMEM16K における Ca²⁺ 結合部位を決めるため、TMEM16K の細胞内領域、膜貫通領域に存在する 56 個の Glu、Asp 残基を Gln、Asn に置換した変異体を作成し、MEF で発現、可溶化後、この変異体の性状を BN-PAGE で検討した。その結果、Ca²⁺ 存在下でも安定性を保てない 5 つの変異体を同定した。膜貫通領域 VI、VII、VII に存在するこれら 5 個の酸性アミノ酸残基が Ca²⁺ 結合部位を形成していると考えられる。これらの残基は TMEM16 ファミリーでよく保存されており、TMEM16F の対応するアミノ酸を置換した変異体は Ca²⁺ に依存したリン脂質スクランブル活性をほぼ完全に失っていた。</p> <p>以上の結果から、Ca²⁺ は TMEM16 ファミリーによく保存された Ca²⁺ 結合部位に結合することで、二量体の構造変化をもたらし、この構造変化がタンパク質の安定化、スクランブル活性の活性化を引き起こすと結論した。今後は Ca²⁺ 存在下・非存在下での TMEM16F の結晶構造を比較し、リン脂質スクランブル機構を明らかにする必要がある。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

10 個の膜貫通領域を持つ TMEM16 ファミリーには 10 個のメンバーが存在するが、そのメンバーには 16A などの Ca²⁺ 依存 Cl⁻チャネル活性をもつものと、16F などの Ca²⁺ 依存リン脂質スクランブラーゼ活性をもつものが存在する。本研究では TMEM16 ファミリーの一員である 16K がホモ二量体として存在すること、Ca²⁺ が 16K 二量体に直接結合することを見出した。また、界面活性剤で可溶化した 16F や 16K は、Ca²⁺ が存在しない溶液中では凝集体を形成することも見出した。そこで、16K の細胞質内及び膜貫通領域に存在する 57 個の酸性アミノ酸残基 (グルタミン酸、アスパラギン酸) に網羅的に変異を導入、変異体の可溶化状態での凝集体形成を指標に Ca²⁺ 結合に関わる残基 5 個を同定した。これらの残基は第 6, 7, 8 膜貫通領域に位置しており TMEM16 ファミリー内で保存されていた。そこで 16F の対応するアミノ酸残基に変異を導入、リン脂質スクランブル活性を測定した。その結果、これら変異体は Ca²⁺ に対する応答性を顕著に失っていた。以上の結果は、TMEM16 ファミリーの膜貫通領域に存在する 5 個の酸性アミノ酸残基が Ca²⁺ 結合部位を形成していること、Ca²⁺ が結合することで活性化に必要な構造変化がおこる可能性を示唆している。

以上の研究は TMEM16 ファミリー分子の作用機構の解明に貢献する。

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。

なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 8 月 26 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降