

京都大学	博士 (工学)	氏名	塩 見 晃 史
論文題目	Mechanism and function of cell deformability (細胞変形能の制御機構と生物機能)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>細胞の変形能は多くの生物機能にとって重要である。細胞の変形能は細胞骨格以外にも細胞膜を構成するリン脂質二重層によって制御されることが報告されているが、このリン脂質の組成と分布が細胞の変形能を制御する機構についてはよく理解されていない。本論文は哺乳類との比較対象として、昆虫と魚類に着目し、リン脂質二重層と変形能の関係を解明し、細胞の変形能の制御機構と生物学的役割の探索を行った結果をまとめたものであり、4章から成る。</p> <p>第1章では、ショウジョウバエ細胞の変形能とその制御機構を解析した。マイクロピペットを用いて細胞の変形能を示す指標である膜張力を測定した結果、由来の異なるショウジョウバエ培養細胞の膜張力は 20~30 pN/μm であり、いずれも哺乳類細胞の 1/10 であった。さらに、ショウジョウバエ細胞は哺乳類細胞と比較して Shear stress に対する高い耐性を示したことから、ショウジョウバエ細胞は非常に高い変形能と機械ストレスに対する耐性を有することが明らかとなった。次に、ショウジョウバエ細胞のリン脂質の組成と分布を解析した。哺乳類細胞の形質膜ではホスファチジルコリン(PC)が最も主要なリン脂質であり、脂質二重層の外層と内層でリン脂質が非対称に分布していることが知られている。しかし、ショウジョウバエ細胞では PC ではなくホスファチジルエタノールアミン(PE)が最も主要なリン脂質であり、リン脂質の非対称な分布が失われていることを発見した。最後に、二本鎖 RNA を用いてショウジョウバエのリン脂質輸送タンパク質の発現を抑制した時の変形能の変化を解析した結果、形質膜のリン脂質を双方向に輸送するスクランブラーゼ XKR の発現抑制により細胞の変形能が有意に低下することを見い出した。</p> <p>第2章では、第1章で見い出した XKR の機能の解析と XKR による細胞変形能の制御機構の解明を目指した。哺乳類のリン脂質スクランブラーゼ Xkr8 はアポトーシス時に C 末端がカスパーゼにより切断されることで活性化し、形質膜のリン脂質を外層・内層の双方向に輸送することが知られている。しかし、ショウジョウバエの XKR は末端にカスパーゼ認識配列が存在せず、アポトーシス時にも切断されなかった。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて <i>Xkr</i> 遺伝子を欠損させた <i>Kc167</i> 細胞株に対し、リン脂質プローブやリン脂質蛍光アナログを用いて形質膜におけるリン脂質の動態を解析した。その結果、XKR の欠損により外層の PE やホスファチジルセリン(PS)が減少し、形質膜におけるリン脂質の輸送活性が低下した。これらの結果から、ショウジョウバエの XKR は恒常的に活性化状態であり、常に形質膜のリン脂質を外層と内層間の双方向へ輸送することでショウジョウバエ細胞の形質膜におけるリン脂質対称分布に大きく寄与していることを明らかにした。次に、XKR が細胞の変形能を向上させる分子機構を探索した。共焦点顕微鏡によりアクチン骨格の動態を解析した結果、ショウジョウバエ細胞の形質膜直下にあるアクチン骨格は XKR の欠損により薄くなり、細胞変形時の再編成に異常が生じることが明らかとなった。さらに、その要因としてアクチン骨格と形質膜を繋ぐリンカータンパク質である Moesin が XKR を介した細胞骨格依存的な細胞の変形能の向上において極めて重要な役割を果たすことを明らかにした。次に、CytochalasinD を用いてアクチン骨格を破壊した時の細胞の変形能を測定した結果、アクチン骨格破壊時でも XKR の欠損により細胞の変形能が低下することを明らかにし</p>			

た。さらに、細胞骨格が存在しない巨大な形質膜小胞体である Giant Plasma Membrane Vesicles をショウジョウバエ細胞から単離し、Flicker spectroscopy を用いて膜の変形しやすさを示す指標である曲げ剛性を解析した。その結果、XKR の欠損によりリン脂質二層膜の曲げ剛性が 1.8 倍に増加したことから、XKR は細胞骨格非依存的にも細胞の変形能を向上させることが明らかとなった。

第 3 章では、ショウジョウバエの生体内において XKR による細胞変形能の制御機構が持つ生物学的役割について解析した。始めに、GAL4-UAS システムを用いてショウジョウバエの血球細胞であるヘモサイト特異的に XKR の発現を抑制した結果、ヘモサイトの変形能が有意に低下しており、体内を循環するヘモサイトの数が減少し、心臓弁周辺での凝集が観察された。次に、ショウジョウバエの精幹細胞特異的に XKR の発現を抑制した結果、精子形成過程の異常による精子形成不全が誘導されており雄不妊となった。これらの結果から、XKR を介した細胞変形が血球細胞の循環や精子形成等の生物機能において重要な役割を果たすことを明らかにした。またショウジョウバエ以外の昆虫種における XKR の比較解析を行った。様々な生物種における XKR のアミノ酸配列の比較を行った結果、脊椎動物の Xkr8 ではいずれも C 末端にカスパーゼの認識配列が保存されているのに対し、無脊椎動物の Xkr8 ホモログである XKR は N 末端にカスパーゼの認識配列を有していた。さらに、いくつかの小型昆虫の XKR はショウジョウバエ XKR と同様にカスパーゼ認識配列を有していなかった。そこで、ショウジョウバエと同様の小型昆虫であるヒトスジシマカ *Aedes albopictus* 由来の培養細胞 C6/36 から XKR ホモログである AaXKR を単離し、その機能を解析した。AaXKR をショウジョウバエ培養細胞 Kc167 の XKR 欠損株に発現させた結果、変形能の低下が完全に回復した。さらに、AaXKR を発現した哺乳類培養細胞 CHO-K1 は膜張力・Young' s 率が共に減少した。これらの結果から、ショウジョウバエ以外の昆虫種の XKR も細胞の変形能を向上させる機能を有することを明らかにした。

第 4 章では、魚類細胞の変形能とリン脂質組成を解析した。魚類は多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を多く含んでおり、複製老化の兆候を示さないという哺乳類とは異なる脂質組成と細胞特性を有することが報告されているが、魚類細胞の物理化学的特性についてはこれまで殆ど報告されていなかった。6 種の由来の異なる魚類細胞のリン脂質組成と変形能を解析した結果、いずれも哺乳類細胞と同様に PC が最も主要なリン脂質であったのに対し、膜張力は 26.4~92.0 pN/ μm であり、いずれも哺乳類細胞と比較して高度に変形可能な細胞膜を有していた。次に、DNA の脱メチル化剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) をコイ科魚類細胞 EPC に添加することで細胞老化を誘導した結果、EPC 細胞の膜張力は 5-Aza-dC の添加により 2.7 倍に増加し、C20:2 や C20:3 等の PUFA を含む PE が増加した。これらの結果から、魚類細胞の変形能は哺乳類細胞と比較して高く、5-Aza-dC 処理によって誘導される細胞老化によって変形能が低下することを見出した。また、魚類細胞が細胞老化における細胞膜の物理化学的特性を分析するための有用なモデルシステムであることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞の変形能と膜脂質の関係に着目し、細胞変形能の制御機構と生物機能を探索することを目的とした研究であり、得られた主な成果は次の通りである。

1. ショウジョウバエ細胞は、哺乳類細胞と比較して高度に変形可能な形質膜を有していることを見出した。さらに、ショウジョウバエ細胞の形質膜は、哺乳類とは異なるリン脂質組成をしており、かつリン脂質が対称的に分布しているという特異な膜構築と変形能を有しているということを明らかにした。
2. ショウジョウバエの XKR は哺乳類とは異なり構造的に活性化状態であり、ショウジョウバエ細胞の形質膜においてリン脂質を内層と外層の双方向に輸送していることを見いだした。さらに、XKR は細胞骨格依存的に細胞の変形能を向上させるだけでなく、リン脂質二重層自体の変形能を向上させていることを明らかにした。
3. XKR によって付与される高い細胞変形能が、ショウジョウバエ個体における血球細胞の循環や精子形成において不可欠な役割を果たすことを明らかにした。さらに、他の小型昆虫の XKR の機能解析により、スクランブラーゼ XKR による細胞の変形能を向上させる機能が小型昆虫種間で保存されている可能性を見い出した。
4. 淡水魚や海水魚由来の 6 種類の魚類細胞株は、哺乳類の細胞株と比較して膜張力が低く、高度に変形可能な細胞膜を有していることを見出した。また、DNA 脱メチル化剤による細胞老化の促進により PUFA を含む PE が増加し、細胞の変形能が顕著に低下することを見い出した。

以上のように、本論文は細胞の変形能の分子機構における新規な知見を多く含むものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年2月12日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限に当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 令和 2年 3月31日以降