

研究題目 脂質動態を制御するタンパク質の同定

研究組織

研究代表者：鈴木 淳（京都大学高等研究院 物質 - 細胞統合システム拠点）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

細胞膜を構成するリン脂質は非対称性を有しており、生体内における様々な条件下においてその非対称性は崩壊し、これにより細胞外へ種々のシグナルを伝達していると考えられている。我々はこれまでにこの脂質動態を制御するタンパク質を複数同定してきた (Suzuki et al., 2010 Nature, Suzuki et al., 2013 JBC, Suzuki et al., 2014 JBC, Suzuki et al., 2016 PNAS)。2017年に鈴木が京都大学で研究室を主宰してからは、cDNA library screening や CRISPR/Cas9 sgRNA library screening を組み合わせることで世界に先駆けて新しい脂質動態制御タンパク質を同定することに成功している (Maruoka et al., 2021 Mol Cell)。これらの新しいタンパク質のサブユニット、活性化因子を同定する過程で小迫英尊教授との共同研究を開始した。本研究では、脂質動態制御タンパク質に対してプロテオーム解析を行うことで、細胞膜構成脂質の動態を起点としたシグナル機構を解明し、生物学・医学の発展に寄与することを目的とする。

[1-2]研究の方法・経過

恒常的活性化型 Xkr4 は細胞外カルシウムの無い状況では活性がなくなるを見出した。ゆえに、各種変異体の作製、並びに Cross link-Mass を行うことにより Xkr4 のカルシウム結合サイトを同定する。

【2】研究成果

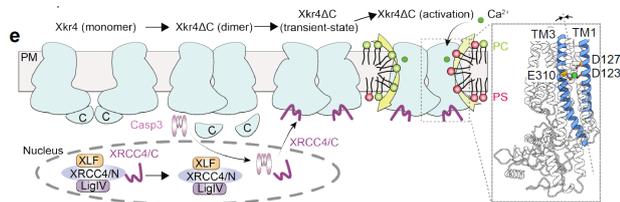
[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

まず、細胞外カルシウムの濃度依存性を調べ 125 μ M では、半分の活性になることを見出した。この時、イオノフォアを用いて細胞内にカルシウムを導入しても活性は変わらなかったことから、細胞外でカルシウムが必要と結論付けた。また、他の Xkr ファミリーもカルシウムを必要とすることを見出し、アミノ酸配列の比較から膜貫通領域にカルシウム結合サイトの候補アミノ酸を見つけた。実際に変異体を作製することで TM1 の D123, D127、並びに TM3 の E310 の重要性が確認できた。次に、それらのアミノ酸によるカルシウム結合が十分であることを確認するために、カルシウムの存在しない条件でクロスリンクを行った。その結果、G125C/E310C 変異体をクロスリンクした時にスクランブル活性が確認された。このクロスリンクを質量分析による解析を行ったが、その断片自体を捉えることは困難であった。一方で、クロスリンクのあるなしで、解析される断片が異なることは分かった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究により、Xkr4 の活性化機構の全貌が明らかとなった。Xkr4 は自身のカスパーゼの切断によるダイマー化とカスパーゼによって切断された XRCC4 が結合することで活性化することをこれまでに見出していた。これは最終的な活性化の前段階であると考えられる。最終的には、細胞外からカルシウムが TM1 と TM3 によって構成される膜貫通領域に結合することで活性化することが分かった。これまでに、異なるスクランブラーゼの TMEM16F は細胞内からの膜貫通領域へのカルシウムの結合が重要であること

を見出していたが、本研究により、細胞外からの膜貫通領域へのカルシウム結合という、新しい制御機構が明らかとなった。今後、他の多重膜タンパク質においても同様の制御があるかもしれない。



【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

Extracellular calcium functions as a molecular glue for transmembrane helices to activate the scramblase Xkr4.

Panpan Zhang, Masahiro Maruoka, Ryo Suzuki, Hikaru Katani, Hidetaka Kosako, Motomu Tanaka, and Jun Suzuki (in Revision)

[3-2] 学会発表

19th International Student Seminar (ISS):
Extracellular calcium functions as a molecular glue for transmembrane helices to activate the scramblase Xkr4

Panpan Zhang (Best presentation award)

【4】 今後の課題等

今後の課題、その他等

現在、異なるスクランブラーゼの活性化因子、調節因子のスクリーニングも進め、既にいくつかの興味深い因子を同定している。今後、それらのタンパク質の複合体の解析を質量分析解析で進めることで、どのようにスクランブラーゼの活性化が制御されているのかを明らかにしたい。