

核内タンパク質によるスクランブラーゼの活性制御

圓岡 真宏, Panpan Zhang, 鈴木 淳

1. はじめに

細胞膜を構成するリン脂質は非対称性を有しており、さまざまな生理的条件下においてこの非対称性は崩壊する。ホスファチジルセリン (PS) は通常細胞膜の内側に存在しているが、アポトーシス時に細胞表面に提示されることで、マクロファージ等の貪食細胞に認識・貪食されるための“Eat-me”シグナルとして機能する^{1,2)}。PSの露出は、リン脂質を区別なく双方向に輸送するスクランブラーゼにより制御されると考えられていたが、その分子の実体は長らく不明であった。我々はスクランブラーゼを同定することを目的として研究を進め、カルシウム依存的スクランブラーゼTMEM16F³⁾、カスパーゼ依存的スクランブラーゼXkr4⁴⁾を同定し、そのファミリーメンバーにもスクランブラーゼ活性があることを示してきた⁵⁻⁸⁾。また、Xkr8には細胞膜に局在するためのサブユニットとしてBasiginが必要なことも示している⁹⁾。Xkrファミリーが活性化するためには、C末端の細胞内領域がカスパーゼにより切断される必要がある。Xkrファミリーの中でXkr4は神経特異的に発現しカスパーゼで切断されるスクランブラーゼであるが、カスパーゼ切断型のXkr4 (Xkr4ΔC)を細胞に発現させてもスクランブル活性は示さなかった。したがって、Xkr4の活性化にはカスパーゼによる切断だけでは不十分であり、未知の活性化因子を必要とすることが示唆された。本稿では、Xkr4の活性化因子の同定およびその制御メカニズムについて概説し、生体における役割について議論したい。

2. Xkr4活性化細胞の樹立によるXkr4の活性化因子同定の試み

Xkr4の活性化にはアポトーシス刺激を必要とするが、細胞はそれ以上増えることなく死滅するため、リン脂質スクランブルに関わる分子を同定することは困難である。以前の研究で我々は、スクランブル活性の高い生きた細胞を繰り返しソーティングすることで、アポトーシス刺激なしでもスクランブル活性を示す細胞を得ることに成功した。次いでその細胞よりcDNAライブラリーを作製し、発現クローニングによりTMEM16Fの活性化型変異体を得ることに成功した³⁾。これは、複数回のソーティングを繰り返すうちにTMEM16Fに偶発的に変異が起こり、通常死にゆく細胞のみで示されるスクランブル現象を生きた細胞で起こすことが可能であることを示している。同様にしてXkr4の活性化に関わる分子に活性化型の変異が起こることを期待して、Xkr4が生きたまま恒常的にスクランブル活性を示す細胞の樹立を試みた。具体的には、Xkr4ΔC発現細胞と蛍光標識したホスファチジルコリン (NBD-PC)を反応させ、自発的なスクランブル活性によりNBD-PCを細胞内に取り込んだ細胞 (1%以下)をフローサイトメーターによりソーティングした (図1A)。この操作を合計6回繰り返すと、生きた細胞でも恒常的にリン脂質スクランブル活性を示す細胞 (PC6)が樹立できた。この細胞のXkr4の発現をCRISPR/Cas9システムにより破壊するとスクランブル活性が消失したことから、Xkr4依存的なスクランブル活性であると考えられた。

次に、PC6細胞にどのような変異が起こっているのかを解析する目的で、PC6細胞よりmRNAを調製しcDNAライブラリーを作製した。このライブラリーをXkr4ΔC発現細胞に導入し、前述のようにスクランブル活性の高い細胞を繰り返しソーティングしたところ、3回のソーティングののち恒常的なスクランブル活性を示す細胞を得た (PC3)。このスクランブル活性を誘導する責任遺伝子を同定した結果、期待に反して得られた配列はXkr4ΔCそのものであった。全長配列を確認したところ、332位のグルタミンがグルタミン酸 (Q332E)に置き換わった変異体や、322位のイソロイシンがセリン (I322S)に置き換わった変異体、331位のロイシンがフェニルアラニン (L331F)に置き換わった変異体が得られ、これらの変異により恒常的なスク

京都大学高等研究院物質・細胞統合システム拠点 (iCeMS) (〒606-8501 京都市左京区吉田本町)

Regulatory mechanism of scramblase activity by nuclear protein
Masahiro Maruoka, Panpan Zhang and Jun Suzuki (Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)
本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940288

© 2022 公益社団法人日本生化学会

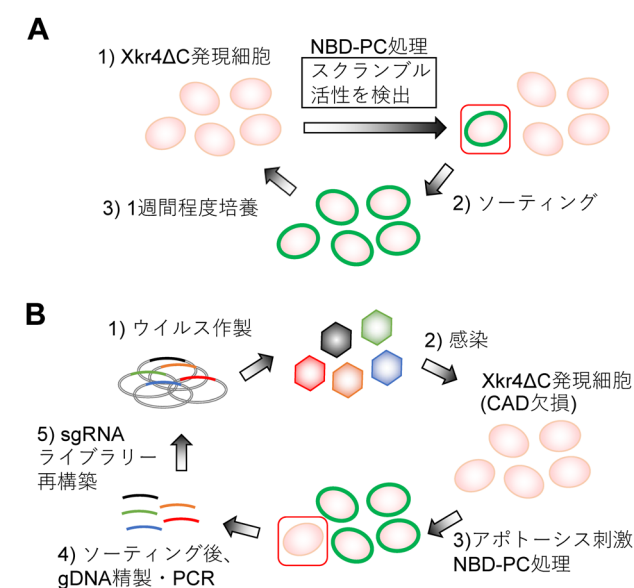


図1 Xkr4活性化因子同定のためのスクリーニング法 (A) 発現クローニング. 1) Xkr4ΔCを発現するPLB985細胞を樹立し、蛍光標識されたホスファチジルコリン (NBD-PC) を処理する。スクランブル活性のある細胞はNBD-PCが内部に取り込まれる。2) セルソーターによりNBD-PCが取り込まれた細胞をソーティングする。3) 1週間程度培養し細胞が十分増えたのち、再びソーティングを行う。(B) リバイバルスクリーニング. 1) sgRNAライブラリーを用いてウイルスを作製し、2) CADが欠損したXkr4ΔC発現細胞に感染させる。3) 1週間培養ののち、アポトーシス刺激を行い、4) NBD-PCを取り込まない細胞をソーティング後、ゲノムDNA (gDNA) からPCRによりsgRNA配列を増幅し、5) sgRNAライブラリーを再構築する。

ランブル活性が示されることがわかった。最近明らかになったXkr8とXkr9の構造解析によると^{10, 11)}、これらの変異部位は3番目と4番目の膜貫通領域の間の細胞外領域に集中していたことから、活性化因子の結合により構造変化が起こる領域に変異が挿入されたと推測された。

3. リバイバルスクリーニング法の樹立によるXkr4活性化因子の同定

前述のアプローチでは、Xkr4に変異が挿入された細胞が優先的に濃縮されてくるため、Xkr4の活性化因子を同定するための別のアプローチを考える必要があると考えた。そこで、CRISPR sgRNAライブラリーを用いた新規のスクリーニング法を開発した。我々はソーティングによりアポトーシス細胞を回収した後、ゲノムDNAからsgRNA領域のみをPCRで増幅し、それをもとに新しいsgRNAライブラリーを作製するという方法を考えた (図1B)。これを実現するために、ユビキタスに発現するスクランブラーゼXkr8を欠損しているためアポトーシス刺激時においてもスクランブル活性を示さないPLB細胞を用いるこ

とにした。この細胞にXkr4ΔCを発現させることで、アポトーシス刺激でXkr4依存的なスクランブル活性を示す細胞を樹立し、スクランブル現象を再構築した。この細胞にCRISPR/Cas9を発現させ、レンチウイルスを用いてsgRNAライブラリーを導入後アポトーシス刺激し、スクランブル活性が消失した細胞をフローサイトメーターにより回収した。次に、回収した細胞よりゲノムDNAを精製する必要があるが、アポトーシス時に機能するDNaseであるcaspase-activated DNase (CAD) をあらかじめノックアウトしておくことで、アポトーシス刺激後も完全長のゲノムDNAが得られるよう細工した。そして、組み込まれたsgRNA領域をゲノムDNAからPCRにより増幅後、数百万クローンからなるレンチウイルスsgRNAライブラリーを再構築することで死にゆく細胞からsgRNA情報を取り戻すことを可能にした。一度使用したsgRNAを再度スクリーニングに利用することから、この手法をリバイバルスクリーニング法と名づけた。すると、ライブラリーの作製とソーティングを3回繰り返すことでスクランブル活性を失った細胞が濃縮された。その細胞からsgRNA配列を次世代シーケンサーにより調べ、マッピングを行ったところ、cytochrome C, Apaf1といったアポトーシス時にカスパーゼを活性化させるために重要な因子が得られた。また、その他にも多数の遺伝子が同定されたが、この中からXkr4を直接制御する活性化因子を絞り込む必要がある。Xkr4はアポトーシス刺激で活性化されるため、カスパーゼ3の下流に位置するはずである。そこで、“カスパーゼ3が活性化しているがスクランブル活性は喪失している”という条件を満たす因子の同定に着手した。候補因子が濃縮されたsgRNAライブラリーを一つの細胞に一つだけウイルスが感染する条件で細胞に感染させ、スクランブル活性が消失した細胞をまずソーティングした。その細胞をホルマリン固定した後に、活性化型カスパーゼ3を認識する抗体でカスパーゼ3が活性化した細胞を回収し、次世代シーケンサーにより解析した。その結果、これらの条件を満たす因子としてXRCC4だけが唯一のXkr4活性化因子の候補として同定された。

4. Xkr4活性化因子としてのXRCC4の同定

XRCC4はDNAリガーゼ4と複合体を形成し、DNA損傷に応答してDNA修復に関わる核内タンパク質である¹²⁾。XRCC4を欠損させた細胞でもアポトーシス刺激時にカスパーゼ3の活性化が起こることより、カスパーゼ3の下流で機能することが考えられる。一方で、Xkr4によるスクランブル活性はXRCC4の欠損により完全に抑制された。XRCC4がカスパーゼ3の下流で機能することから、カスパーゼ3によって切断される可能が考えられた。そこで

XRCC4の配列を確認するとカスパーゼ3で切断されうる配列が見いだされ、実際に切断を受けることも報告されていた¹³⁾。そこで、XRCC4欠損細胞に野生型のXRCC4とカスパーゼ非切断型変異体(2DA)を戻しスクランブル活性を調べると、野生型では活性が回復したが、2DAにおいてはその効果はなかった。これより、カスパーゼによりXRCC4が切断されることがXkr4の活性化に必須であることがわかった。また、XRCC4の切断はFasによる刺激やX線照射およびUV照射によるアポトーシス刺激下でも切断され、いずれの刺激でもXkr4の活性化に必須であった。では、核内のXRCC4はどのように細胞膜のXkr4を活性化するのだろうか？ 蛍光タンパク質をXRCC4のN末端およびC末端に付加して局在を解析した結果、XRCC4はカスパーゼにより切断された後、N末端側は核内にとどまるが、C末端側は細胞質内に放出されることがわかった。ではXRCC4のC末端だけ発現すればXkr4の活性化に十分なのだろうか？ カスパーゼ切断型のXRCC4のC末端のみを細胞に発現させたところ、アポトーシス刺激の有無にかかわらず、Xkr4の活性化はほとんど認められなかった。ところがXRCC4のカスパーゼ切断部位よりN末端側に10アミノ酸を付加して発現させると、アポトーシス刺激下でXkr4が効率よく活性化された。XRCC4が切断されると、切断部位においてイソロイシンが露出するが、C末端のみを発現させる場合にはイソロイシンの前にメチオニンを付加する必要があるため、このメチオニンが活性化を阻害している可能性が考えられた。さらにXkr4の活性化に必要な領域を解析したところ、カスパーゼ切断部位よりN末端側に10アミノ酸、C末端側に20アミノ酸を含む領域だけでXkr4の活性化に十分であることがわかった。そこで、カスパーゼ切断部位よりC末端側の20アミノ酸をペプチド合成し、電気穿孔法により直接細胞に導入すると、アポトーシス刺激なしでもカスパーゼ切断型Xkr4ΔCを活性化させることができた。また、このペプチドはカスパーゼ非切断型のXkr4を活性化しなかったことより、カスパーゼ3によって切断されたXRCC4のC末端は、カスパーゼで切断された二量体化型Xkr4を活性化させると結論づけた。

5. 質量分析によるXkr4結合タンパク質の同定

それでは、XRCC4のC末側の断片はどのようにXkr4を活性化するのであろうか？ 研究を進めると、C末端側20アミノ酸の中の核内移行シグナルに存在する最初のアルギニン(R270)をアラニンに置換した変異(R270A)を導入すると、Xkr4を活性化できないことがわかった。そこで、XRCC4の野生型、R270Aを発現する細胞においてXkr4に結合するタンパク質を調べた。アポトーシス刺激後および未刺激の細胞より膜画分を調製し、Xkr4を免疫沈降して、

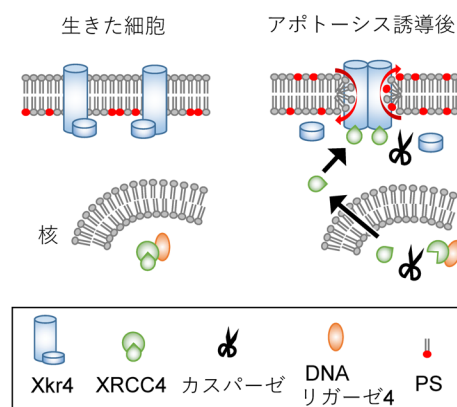


図2 Xkr4の活性化機構

Xkr4は生きた細胞では単量体として細胞膜に局在する。アポトーシス刺激に伴いカスパーゼが活性化し、Xkr4のC末端が切断され、二量体化する。また、核内ではXkr4の活性化因子XRCC4もまたカスパーゼにより切断されると、そのC末端の切断断片が細胞質に放出され、細胞膜の二量体化型Xkr4と相互作用し活性化する。

Xkr4結合タンパク質を質量分析により解析した。すると、アポトーシス刺激依存的にXRCC4の野生型のC末端をコードするペプチドのみが結合タンパク質として同定された。実際に、同じ細胞を用いてXkr4の免疫沈降後にウェスタンブロッティングを行ったところ、Xkr4とXRCC4のカスパーゼで切断されたC末端領域が相互作用することが確認できた。以上より、XRCC4のC末端は、カスパーゼにより切断されることで細胞質に放出され、細胞膜スクランブラーゼXkr4に結合し活性化すると結論づけた(図2)¹⁴⁾。

6. おわりに

本研究により、細胞膜スクランブラーゼXkr4は、自身のカスパーゼによる切断ののち形成される二量体化の後に、XRCC4のカスパーゼ切断断片が結合することで活性化することが明らかになった。核内タンパク質の断片が細胞膜タンパク質を活性化する現象を見いだしたことは、これまでにない新しい概念を提示したと考える。Xkr4は神経細胞に特異的に発現するスクランブラーゼであり、今後ノックアウトマウスを用いてその生理的役割を調べる必要がある。また、神経細胞では、シナプスや細胞の老化した一部等の細胞内コンパートメントの食食が知られており、その過程に関わる可能性が考えられる¹⁵⁾。またXRCC4の他にもDNA修復に関わるタンパク質の多くがカスパーゼによって切断されることが知られている。それらの作用は機能喪失であると考えられていたが、切断後の断片が新たな役割を持つ可能性を今後検証する必要があるだろう。また本研究で樹立されたリバイバルスクリーニング法は、死にゆく細胞だけでなく、神経などの増殖が停止した細胞

や、生体内での数が限られた細胞を標的とした *in vivo* スクリーニングにおいても活用可能であると考える。

謝辞

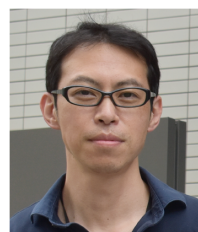
本研究を遂行するにあたり、京都大学高等研究院物質-細胞統合システム拠点 Daniel Packwood 博士、京都大学放射線生物学センター原田浩博士、徳島大学藤井節郎記念医学科学センター小迫英尊博士に多大なご支援をいただきました。この場を借りて深く感謝いたします。

文 献

- 1) Bevers, E.M. & Williamson, P.L. (2016) Getting to the outer leaflet: Physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol. Rev.*, **96**, 605–645.
- 2) Nagata, S. (2018) Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **36**, 489–517.
- 3) Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., & Nagata, S. (2010) Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, **468**, 834–838.
- 4) Suzuki, J., Denning, D.P., Imanishi, E., Horvitz, H.R., & Nagata, S. (2013) Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science*, **341**, 403–406.
- 5) Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., & Nagata, S. (2013) Calcium-dependent phospholipid scrambling activity of TMEM16 protein family members. *J. Biol. Chem.*, **288**, 13305–13316.
- 6) Suzuki, J., Imanishi, E., & Nagata, S. (2014) Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **289**, 30257–30267.
- 7) Gyobu, S., Miyata, H., Ikawa, M., Yamazaki, D., Takeshima, H., Suzuki, J., & Nagata, S. (2016) A Role of TMEM16E carrying a scrambling domain in sperm motility. *Mol. Cell. Biol.*, **36**, 645–659.
- 8) Gyobu, S., Ishihara, K., Suzuki, J., Segawa, K., & Nagata, S. (2017) Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 6274–6279.
- 9) Suzuki, J., Imanishi, E., & Nagata, S. (2016) Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 9509–9514.
- 10) Sakuragi, T., Kanai, R., Tsutsumi, A., Narita, H., Onishi, E., Nishino, K., Miyazaki, T., Baba, T., Kosako, H., Nakagawa, A., et al. (2021) The tertiary structure of the human Xkr8-Basigin complex that scrambles phospholipids at plasma membranes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**, 825–834.
- 11) Straub, M.S., Alvadia, C., Sawicka, M., & Dutzler, R. (2021) Cryo-EM structures of the caspase-activated protein XKR9 involved in apoptotic lipid scrambling. *eLife*, **10**, e69800.
- 12) Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., & Lieber, M.R. (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, **388**, 492–495.
- 13) Matsumoto, Y., Suzuki, N., Namba, N., Umeda, N., Ma, X.J., Morita, A., Tomita, M., Enomoto, A., Serizawa, S., Hirano, K., et al. (2000) Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett.*, **478**, 67–71.
- 14) Maruoka, M., Zhang, P., Mori, H., Imanishi, E., Packwood, D.M., Harada, H., Kosako, H., & Suzuki, J. (2021) Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane. *Mol. Cell*, **81**, 1397–1410.e9.
- 15) Maruoka, M. & Suzuki, J. (2021) Regulation of phospholipid dynamics in brain. *Neurosci. Res.*, **167**, 30–37.

著者寸描

● 圓岡 真宏 (まるおか まさひろ)



京都大学高等研究院物質-細胞統合システム拠点特定助教。博士 (バイオサイエンス)。

■略歴 1980年鳥取県に生る。奈良先端科学技術大学院大学 (竹家達夫研究室) にて学位取得後、東北大学生命科学研究科 (渡邊直樹研究室) にて博士研究員、神戸大学医学研究科 (高井義美研究室) にて特命助教を経て現職。

■研究テーマと抱負 教科書に残るような大切な仕事ができることを目標に、毎日反省を繰り返しながら研究に向きあっています。

■ウェブサイト <http://www.suzuki.icems.kyoto-u.ac.jp/>

■趣味 お弁当作り。