

Press Release

2023年9月13日

京都大学アイセムス（高等研究院 物質-細胞統合システム拠点）

細胞外カルシウムが不要細胞除去に重要！ 細胞膜貫通領域どうしを近づけるのりの働きの発見

- ・生体内からの不要細胞を除去する際に目印となるホスファチジルセリン（PS）を細胞表面に提示するスクランブラーゼ^{※1}の活性化機構を明らかに
- ・細胞外カルシウム^{※3}がスクランブラーゼの膜貫通領域のポケットに入り込み、膜貫通領域どうしを近づけることで活性化していることが明らかに
- ・カルシウムイオンに、細胞内への流入に伴うシグナルとしての役割、細胞外での細胞どうしを接着する以外の働きがあることが明らかに

京都大学アイセムス（高等研究院 物質-細胞統合システム拠点）の鈴木淳教授、チョウ・パンパン特定研究員、圓岡真宏特定助教、蚊谷光氏（大学院生）、童友氏（大学院生）、ダニエル・パックウッド講師等の研究グループは、アイセムス連携PIの田中求特任教授、鈴木量特定助教、徳島大学の小迫英尊教授と協力し、生体内において不要な細胞を除去する分子メカニズムを明らかにしました。この成果は、9月11日に英国科学雑誌ネイチャー・コミュニケーション誌に発表されました。

人の生体内では毎日10億-100億個の細胞が細胞死を起こします。細胞死を起こした細胞が生体内に残ると細胞内容物が漏れ出て炎症を引き起こすため、速やかにマクロファージ等の貪食^{※2}細胞に除去される必要があります。死細胞は、貪食細胞に見つけてもらうために、スクランブラーゼというタンパク質を用いて細胞膜を構成する脂質の一つホスファチジルセリン（PS）を“死んだ目印”として細胞表面に提示します。しかし、スクランブラーゼが死細胞で活性化する仕組みについては、完全には理解されていませんでした。

今回、研究グループは、スクランブラーゼの活性化には細胞外カルシウムが重要なことを発見しました。通常カルシウムは、細胞外から細胞内に流入することで様々なタンパク質を活性化することが知られています。しかし、スクランブラーゼの活性化には、細胞外から細胞内まで至らず、その途中の膜貫通領域へのカルシウムの流入が重要であることが分かりました。この際、カルシウムが“のり”として作用することで、2つの膜貫通領域を近づけることでスクランブラーゼが活性化することが示されました。

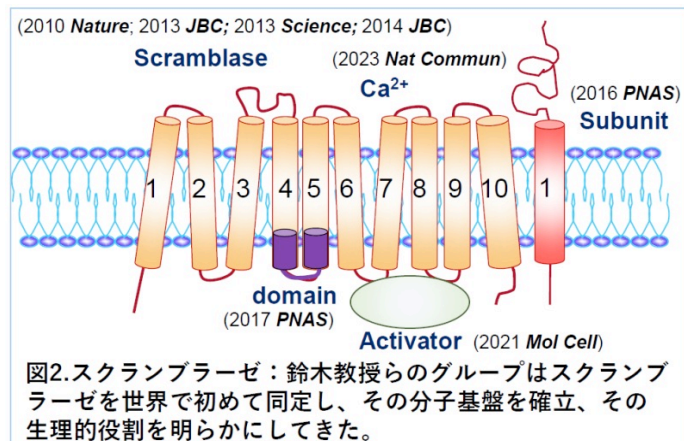
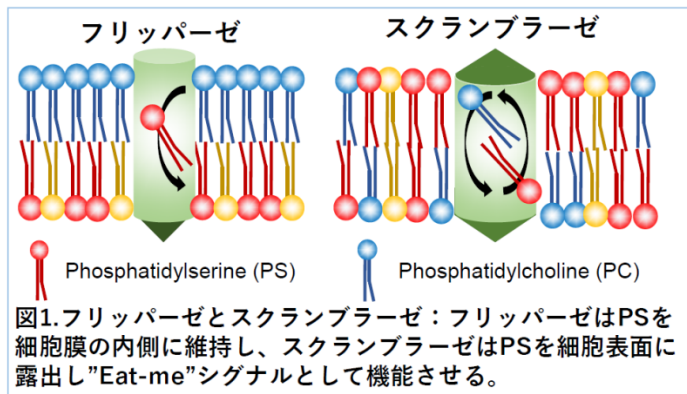
今回対象としたスクランブラーゼは脳の神経細胞に強く発現しており、不要な細胞の除去により脳の健康維持に関与していると考えられています。今後、見出された不要細胞除去システムの理解に基づき、それを人工的に操作することで、脳内における不要細胞を除去し脳内健康を維持する新しい技術の開発が期待されます。

1. 背景

人の生体においては、毎日 10~100 億個程度の不要細胞が細胞死を起こし、同時にそれを補うために細胞増殖が起こることで、臓器の恒常性が動的に維持されています。このバランスが崩れた状況が病気の状態であるともいえます。細胞死を起こした細胞は、細胞膜を構成する脂質二重膜の内側に局在するリン脂質のホスファチジルセリン (PS) を”死んだ目印”として細胞表面に提示し、貪食細胞は PS に対する

受容体によって PS を認識し、死細胞を貪食しています (図 1)。PS が”死んだ目印”として機能することは 1980 年代より示唆され、PS を細胞表面に露出させるタンパク質、スクランブラーゼの存在が仮定されていましたが、その分子の実体は長らく分かっていませんでした。鈴木教授らのグループは、これまで世界に先駆けて TMEM16 ファミリー、Xkr ファミリーといった PS を露出するスクランブラーゼのファミリーを同定し、その機能解析を進めてきました (2010 *Nature*,

2013 *J Biol Chem*, 2013 *Science*, 2014 *J Biol Chem*)。また、スクランブラーゼの細胞膜への局在に必要なサブユニット、活性化に必要なドメイン、活性化因子も同定しています (2016 *PNAS*, 2017 *PNAS*, 2021 *Mol Cell*)。一方でスクランブラーゼがどのように活性化するのかという謎は残されていました。今回、細胞外カルシウムがスクランブラーゼの活性化に必須であることが分かりました (2023 *Nat Commun*) (図 2)。



2. 研究内容と成果

研究グループは、神経細胞に強く発現している Xkr4 に注目して研究を進める中で、細胞外カルシウムが無い場合、Xkr4 が活性化できないことを発見しました。カルシウムは、細胞内に流入し様々なタンパク質を活性化させることが知られています。そこで、人工的に細胞内にカルシウムを流入させるカルシウムイオノフォアを用いたところ、Xkr4 の活性は変化せず、細胞外のカルシウムが Xkr4 活性化に重要なことが分かりました。次に、Xkr4 においてカルシウムが結合するサイトを探索したところ、驚くことに、細胞外領域ではなく、細胞膜貫通領域にカルシウム結合サイトの候補部位があることが示唆されました。つまり、細胞膜に埋まっている箇所候補が見つかったということです。実際に、1つ目の膜貫通領域 (TM1) に存在する 123 番目のアスパラギン酸、と 127 番目のアスパラギン酸、3つ目の膜貫通領域 (TM3) に存在する 310 番目のグルタミン酸に変異を導入する (他のアミノ酸に変える) と Xkr4 が活性化できないことが分かりました。カルシウムイオンは正電荷を持つことから、これら3つの負電荷をもつアミノ酸と相互作用する

ことで、TM1 と TM3 を接着させる“のり”として機能することが示唆されました。ではこれをどのように証明すれば良いのでしょうか？

これを示すために研究グループは1つのアイデアを思いつき実験を行いました。具体的には、123番目のアスパラギン酸と127番目のアスパラギン酸の中央に位置する125番目のグリシンをシステインに変換し、同様に310番目のグルタミン酸もシステインに変換しました。この変異体 (G125C/E310C) はそれ自身では活性化しませんが、酸化剤で処理すると2つのシステインがジスルフィド結合^{※4}を形成し活性化することが分かりました。また、310番目のグルタミン酸を、正電荷をもつリジンに変換すると、123番目のアスパラギン酸と127番目のアスパラギン酸と塩橋^{※5}を形成し活性化することが示されました (図3)。以上の結果は、TM1 と TM3 を近づけることでXkr4が活性化することを示しています。最後に分子動力学シミュレーションを行い、カルシウム結合サイトにカルシウムが結合すると、TM1 と TM3 が近づくことに伴い、タンパク質の構造変化が誘導されることを見出しました (図4)。

これまで細胞外カルシウムは、細胞外空間で接着分子に結合することや、細胞内に流入することで様々なタンパク質を活性化することは良く知られていましたが、タンパク質の膜貫通領域に入り込み“のり”として機能することは予想外の発見であり、研究分野に対して大きなインパクトがあると考えられます。

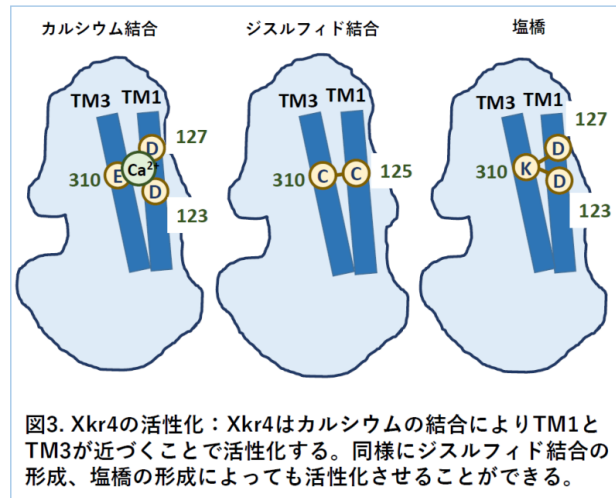


図3. Xkr4の活性化：Xkr4はカルシウムの結合によりTM1とTM3が近づくことで活性化する。同様にジスルフィド結合の形成、塩橋の形成によっても活性化させることができる。

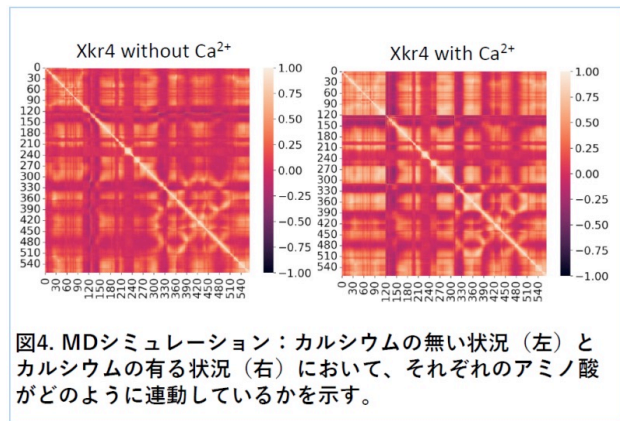


図4. MDシミュレーション：カルシウムの無い状況 (左) とカルシウムの有る状況 (右) において、それぞれのアミノ酸がどのように連動しているかを示す。

3. 今後の展開

今後、同様の分子機構で活性化する様々なタンパク質の存在が明らかになることが予想される点において、本研究は大きな意義をもっています。また、スクランブラーゼ Xkr4 は神経細胞において不要な細胞だけでなく、生きた細胞の不要な領域を部分的に除去する際にも機能すると考えられています。今後、神経変性疾患や精神疾患がどのように発症するのか、そのメカニズムを理解するうえにおいても、本研究は重要な知見をもたらすと考えられます。

4. 用語解説

- ※1 スクランブラーゼ：細胞膜のリン脂質を双方向に輸送することで、“死んだ目印”となるホスファチジルセリン (PS) を細胞表面に露出する。
- ※2 貪食：マクロファージなどの貪食細胞は、死んだ細胞を速やかに貪食することで炎症を防ぐと考えられている。
- ※3 カルシウム：細胞外空間において接着分子に結合することで機能を制御し、細胞内に流入す

ることで様々なタンパク質を活性化することが知られている。

- ※4 ジスルフィド結合：2つのシステイン残基が共有結合することで形成される結合。
- ※5 塩橋：タンパク質のなかで正電荷をもつアミノ酸（アルギニンやリジン）と負電荷をもつアミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）の側鎖間に働く弱いイオン性相互作用。

5. 研究プロジェクトについて

鈴木 淳

1. JST-CREST (1199566)
2. AMED-FORCE (19191470),
3. AMED-PRIME (15665392),
4. Grants-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas “Dynamic regulation of brain function by Scrap & Build system” (KAKENHI 16H06456),
5. Joint Usage and Joint Research Programs of the Institute of Advanced Medical Sciences of Tokushima University,
6. Takeda Science Foundation
7. WPI-iCeMS

圓岡真宏

1. MEXT Grants-in-Aid for Scientific Research (C) (KAKENHI 20K06486)

6. 論文タイトル・著者

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

（細胞外カルシウムはスクランブラーゼXkr4を活性化するための膜貫通領域の分子接着剤として機能する）

著者：Panpan Zhang, Masahiro Maruoka, Ryo Suzuki, Hikaru Katani, Yu Dou, Daniel M. Packwood, Hidetaka Kosako, Motomu Tanaka, and Jun Suzuki
Nature Communications | DOI: 10.1038/s41467-023-40934-2