

Press Release

2024 年 9 月 3 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）

細胞膜脂質の分布を制御する新しい仕組みの発見

- ・カルシウムによって活性化される新しい脂質スクランブル経路の発見
- ・2つの異なるタンパク質の複合体による脂質スクランブル誘導
- ・発達性およびてんかん性脳症の発症機構の理解につながる成果

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：WPI-iCeMS）の鈴木淳教授、Han Niu 大学院生、圓岡真宏特定講師、野口勇貴元研究員（現カリフォルニア大学バークレー校 研究員）、徳島大学の小迫英尊教授らの研究グループは、細胞膜脂質の分布を変化させる（スクランブルさせる）新しい仕組みを発見しました。この成果は、8 月 31 日付の Nature Communications 誌で発表されました。

<概要>

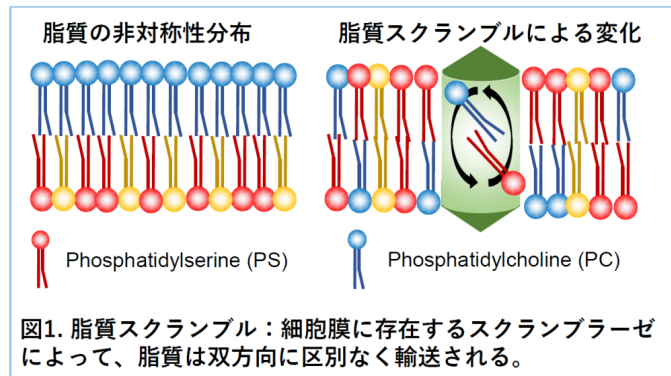
細胞膜を構成する脂質は、細胞膜の外側と内側で非対称的に分布しており、膜の外側と内側で構成する脂質の種類が異なっています。例えば、膜の外側にはホスファチジルコリンが多く、内側にはホスファチジルセリンが多く分布しています。しかしながら、細胞内外の環境変化が起こると、その変化に柔軟かつ速やかに適応するために、この非対称性は変化します。この脂質の非対称性分布を変化させる現象を脂質スクランブルといい、それを実行する膜タンパク質をスクランブラーゼとよびます。鈴木教授等のグループはこれまで、TMEM16 ファミリーや Xkr ファミリーといった細胞膜スクランブラーゼを同定していましたが、これら2つのファミリー以外に脂質をスクランブルするタンパク質が細胞膜上で存在するかは不明でした。

本研究において鈴木教授の研究グループは、TMEM16 ファミリーや Xkr ファミリーといった2つのファミリーがなくても、カルシウム刺激によって細胞膜で脂質がスクランブルすることを見出しました。そこでこの過程に関わる脂質スクランブラーゼを同定するために、CRISPR sgRNA ライブラリーを用いたリバイバルスクリーニングを行い、イオンチャネル TMEM63B、ビタミン B1 トランスポーター SLC19A2 を同定しました。驚くことに、これら2つのタンパク質は複合体を形成しており、この複合体形成が脂質スクランブルを誘導するために必須なことも分かりました。さらに、発達性およびてんかん性脳症（Developmental and epileptic encephalopathy, DEE）の遺伝病では、TMEM63B に変異が挿入されていることが知られていましたが、この変異体では、脂質スクランブル活性が恒常的に起こることが分かりました。これにより、DEE では恒常的な脂質スクランブル活性により病気が引き起こされることが示唆されました。また、カルシウム刺激によって活性化されるカリウムチャネルである KCNN 4 もリバイバルスクリーニングによって同定され、カリウムの細胞外への流出が、TMEM63B/SLC19A2 の複合体を活性化するために重要なことも分かりました。

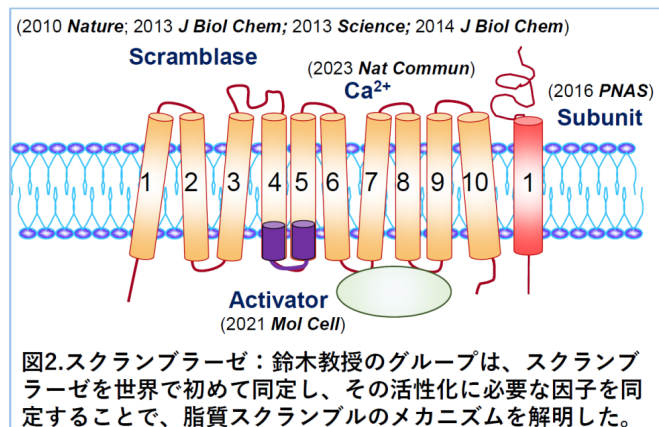
本研究により、異なる2つの膜タンパク質が複合体を形成することではじめて、単独のタンパク質が持つ機能とは異なる新しい機能発現（脂質スクランブル）が発揮されるということが示されました。TMEM63B の変異体は機能獲得によって DEE、SLC19A2 の変異は機能喪失により巨赤芽球性貧血（糖尿病と難聴を伴う）を誘発することより、TMEM63B/SLC19A2 の機能を制御する薬剤を開発することで、病気を治療する薬剤が開発されることが期待されます。

1. 背景

全ての細胞はイオンや脂質の非対称性分布を構築し、それを変化させることで環境変化に適応しています。非対称性分布の構築にはATP依存的なポンプ※¹による能動輸送が関わり、それを瞬時に変化させるために、イオンチャネル※²の開口や脂質スクランブル※³などの受動輸送が関わっています（図1）。これまで世界中の研究で、イオンチャネルによるイオン動態の制御に関しては精力的に研究が進められてきましたが、脂質スクランブルに関しては、まだ未解明な部分が多い状況です。



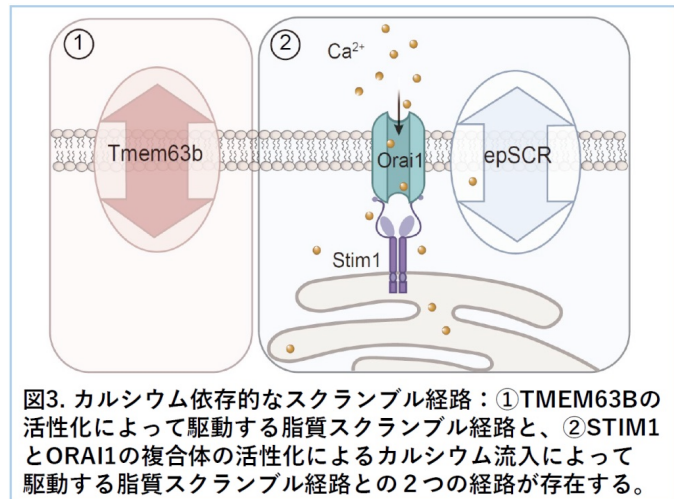
本研究グループは、細胞膜における脂質スクランブルの分子機構を解明することを目的として研究を進め、これまでにTMEM16ファミリー（2010 *Nature*, 2013 *J Biol Chem*）やXkrファミリー（2013 *Science*, 2014 *J Biol Chem*, 2016 *PNAS*, 2021 *Mol Cell*, 2023 *Nat Commun*）が脂質スクランブルを実行することを見出した（図2）。



2. 研究内容と成果

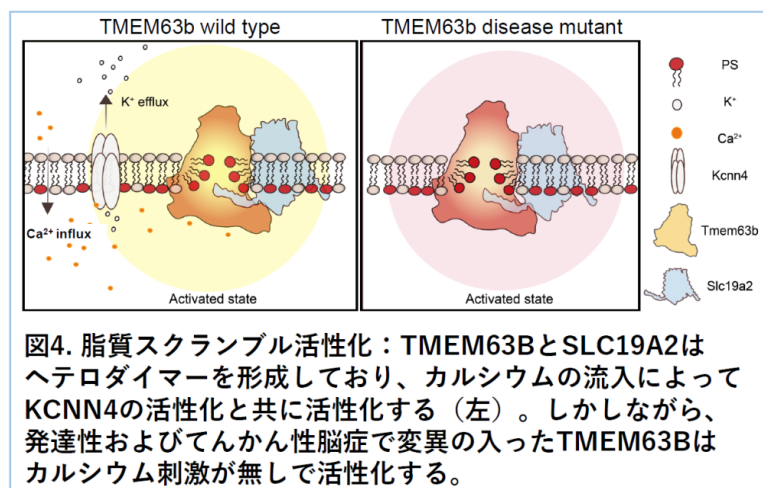
本研究グループは、TMEM16ファミリーやXkrファミリーがなくてもカルシウム刺激によって細胞膜で脂質スクランブルが誘導されることを見出しました。そこで未知の脂質スクランブル因子を同定するために、リバイバルスクリーニング※⁴を行いました（2024 *Ann Rev Genom Hum Genet* に手法の丁寧な解説）。具体的には、TMEM16FとXkr8の両方を欠損する細胞（BDKO細胞）に、CRISPR/Cas9※⁵を発現させ、レンチウイルスを用いてsgRNAライブラリー※⁶を導入して遺伝子をランダムに欠損させました。その後、カルシウム刺激を行い、脂質スクランブルを誘導し、脂質スクランブルが起こらない細胞を、フローサイトメトリー※⁷を用いて集めました（ソーティングしました）。その後、集めた細胞よりゲノムDNAを精製し、DNAに組み込まれたsgRNA領域をPCRにより増幅、レンチウイルスベクターに再度組み込み、重要なsgRNAに対して濃縮のかかったsgRNAライブラリーを作製しました。この過程（ウイルス感染とソーティング）を繰り返した後、次世代シーケンサーで解析を行い、脂質スクランブルに関与する因子を同定しました。その結果、STIM1とTMEM63Bが同定されました。

調べると、一つの経路で制御されていると考えていたカルシウム依存的な脂質スクランブルにおいて、2つの経路が存在することが分かりました。1つ目は小胞体タンパク質 STIM1 と細胞膜タンパク質 ORAI1 の経路で活性化されるスクランブラーゼで、今後の研究によって同定されることが期待されます。2つ目は TMEM63B の経路で、この過程には STIM1/ORAI1 は関与していないことが分かりました（図3）。調べると、TMEM63B においては、発達性およびてんかん性脳症が報告されていることがわかりました（2023 Am J Hum Genet）。そこで、患者さんで報告されている TMEM63B の変異体を発現させると、カルシウム刺激なしで脂質スクランブルが恒常的に引き起こされることが分かりました。また、脂質スクランブル活性が強いほど患者さんの病状も重症となり（貧血状態も悪化します）、通常の制御ができなくなった脂質スクランブル活性が発達性およびてんかん性脳症に関与することが示されました。



次に、TMEM63B がどのように活性化されるのかを調べるために、TMEM63B を過剰発現する細胞を用いてリバイバルスクリーニングを行いました。その結果、ビタミンB1のトランスポーターである SLC19A2 とカルシウム依存的なカリウムチャネルである KCNN4 が同定されました。実際にそれぞれの因子を細胞から欠損させると脂質スクランブル活性が減弱することも分かりました。また、SLC19A2 の変異は糖尿病と難聴を伴う巨赤芽球性貧血を引き起こしますが（1999 Nat Genet）、患者さん由来の変異体においては、脂質スクランブル誘導活性が大きく減少していることも分かりました。また、発達性およびてんかん性脳症の TMEM63B の変異体は SLC19A2 をその活性に必要としますが、KCNN4 の必要性が無くなっていました。

そこで、TMEM63B、SLC19A2、KCNN4 の3つの分子の関係を調べるために、TMEM63B の結合タンパク質を免疫沈降と質量分析により解析したところ、予想外にも、SLC19A2 が TMEM63B に直接結合することが分かりました。実際に Blue Native (BN)-PAGE の解析において、この2つの分子がヘテロダイマー※8を形成し、KCNN4 はこの複合体に含まれないことも分かりました。また、発達性およびてんかん性脳症の TMEM63B の変異体では、このヘテロダイマーの量が上昇していることが見出されました。以上の結果は、TMEM63B と SLC19A2 がヘテロダイマーを形成し、カルシウムの流入下において、KCNN4 によるカリウムの放出を伴い、活性化することを示しています（図4）。



これまで、TMEM16 ファミリーや Xkr ファミリーにおいては、ホモダイマー※9の形成が重要でしたが、全く異なる性質の2つの分子がダイマーを形成し、今までにない新しい機能発現をするという概念を提唱したことに本研究は大きな意義があると考えられます。ヒトにおいて遺伝子はおおよそ 22,000 個程度存在しますが、複合体の形成により、個々の因子がもつ本来の機能を越えた

新しい機能発現がある可能性を考えて研究を進めることで、細胞内外の機能分子の役割解明は今後ますます進むと思われます。

3. 今後の展開

本研究において、TMEM63B と SLC19A2 のヘテロダイマーが脂質スクランブルを誘導することが分かりました。しかしながら、両タンパク質共に全てがダイマー形成をするわけではなく、どのような刺激によりヘテロダイマーの形成が促進されるのか解明することは今後の課題です。また、TMEM63B と SLC19A2 にはそれぞれファミリータンパク質が存在しますが、同様の制御機構をもつか調べることは興味深いと思われます。

さらに TMEM63B の変異においては恒常的な脂質スクランブル活性が見出されたため、活性を抑制する薬剤^{※10}を開発することで、発達性およびてんかん性脳症の治療が可能になるかもしれません。さらに、糖尿病と難聴を伴う巨赤芽球性貧血の原因である SLC19A2 においては活性が完全に抑制されているわけではないため、活性化させる薬剤を開発することにより新しい治療法を提案できるかもしれません。このように、細胞で起こる脂質スクランブルの分子メカニズムを解明することにより、分子を標的とした治療開発が可能になる点においても、本研究は重要であるといえます。

4. 用語解説

- ※1 ポンプ：ATPの結合と加水分解を用いて構造変化をすることで、濃度勾配に逆らい物質を能動輸送する膜タンパク質。
- ※2 イオンチャネル：濃度勾配に従いイオンを受動輸送する膜タンパク質。カルシウムイオンやナトリウムイオン、カリウムイオンなど個々のイオンに対するチャネルが存在する。
- ※3 脂質スクランブル：細胞膜を構成する脂質を外側の内側に双方向に区別なく輸送する膜タンパク質。
- ※4 リバイバルスクリーニング：死にゆく細胞や増殖しない細胞、ある因子の欠損でそのような表現型を示す細胞を用いても、ライブラリーの再構成により重要な因子を濃縮するスクリーニング方法（2021 Mol Cellで発表）。
- ※5 CRISPR/Cas9：バクテリア由来のタンパク質で、任意の場所でDNAを切断する酵素。ゲノム編集に用いられる。
- ※6 sgRNAライブラリー：任意の場所にCRISPR/Cas9をもってくるRNA配列をsgRNAといい、細胞内の各遺伝子に対するsgRNAを有するものをsgRNAライブラリーという。
- ※7 フローサイトメトリー：細胞の大きさや内部構造、特異的なタンパク質やプローブにより蛍光を発する細胞を解析、またその中で、注目する集団を集めることができる機器。
- ※8 ヘテロダイマー：2つの異なる種類のタンパク質が結合した状態。
- ※9 ホモダイマー：2つの同じ種類のタンパク質が結合した状態。
- ※10 薬剤：標的とするタンパク質に結合することで活性を抑制したり、活性を促進したりすることができる化学物質。

5. 研究プロジェクトについて

Grants-in-Aid for Scientific Research B (KAKENHI 22H02572),
Grant-in-Aid for Challenging Research (Exploratory, KAKENHI 21K19261),
JST-CREST (1199566),
Joint Usage and Joint Research Programs of the Institute of Advanced Medical Sciences
of Tokushima University,
WPI-iCeMS,
Takeda Science Foundation

6. 論文タイトル・著者

“Phospholipid scrambling induced by an ion channel/metabolite transporter complex”
(参考訳：イオンチャネルと代謝物トランスポーターの複合体による脂質スクランブル)
著者：Han Niu, Masahiro Maruoka, Yuki Noguchi, Hidetaka Kosako, Jun Suzuki
Nature Communications 15, 7566 | DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51939-w>