

図3 グルタミン・トランスアミドソームによる Gln-tRNA^{Gln} 生成過程のモデル図。分子内に存在する蝶番様構造を矢尻で示した。

とが可能となり、その結果、「アミド化型」となったトランスアミドソームは、最終産物である Gln-tRNA^{Gln} を生成する。このモデルはグルタミントランスアミドソームが、中間体の Glu-tRNA^{Gln} を細胞質中へ放つことなく、2段階の反応を効率よく進められることをうまく説明するものである。

おわりに

グルタミンとアスパラギンは、生物の進化の過程において、20種類のアミノ酸の中では比較的最近に取り込まれたものと考えられてきた。今回見出したトランスアミドソームによる Gln-tRNA^{Gln} の生成機構は、tRNAのCCA末端にGluRSがグルタミン酸を付加するシステムに、GluRSの働きを妨げないようにアミド基転移酵素GatCABが加わって成立しているシステムであることから、上述の仮説を支持するものである。過去ではなく未来へと目を向ければ、今回のトランスアミドソームの立体構造は、タンパク質工学において非天然型アミノ酸をタンパク質へ導入するための新たな戦略の可能性を示したともいえる。すなわち、aaRSの改変だけでは成し得なかった種類の非天然型アミノ酸の導入についても、トランスアミドソームに倣った2段階反応を用いることによって、現実のものとなるかも知れない。

- 1) Wilcox, M. & Nirenberg, M. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, 229-236.
- 2) Curnow, A.W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T.M., & Söll, D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11819-11826.
- 3) Ito, T. & Yokoyama, S. (2010) *Nature*, 467, 612-616.
- 4) Sekine, S., Nureki, O., Dubois, D.Y., Bernier, S., Chênevert, R., Lapointe, J., Vassilyev, D.G., & Yokoyama, S. (2003) *EMBO J.*, 22, 676-688.

- 5) Ito, T., Kiyasu, N., Matsunaga, R., Takahashi, S., & Yokoyama, S. (2010) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 66, 813-820.

伊藤 拓宏, 横山 茂之

(東京大学大学院理学系研究科構造生物学講座,
理化学研究所生命分子システム基盤研究領域)

Structural basis of the glutamyl-tRNA synthesis in bacteria
Takuhiro Ito and Shigeyuki Yokoyama (Laboratory of
Structural Biology, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; RIKEN Systems and Structural Biology Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama City, Kanagawa 230-0045, Japan)

TMEM16F による細胞膜リン脂質のスクランブル

1. はじめに

真核生物において、細胞膜を構成するリン脂質は非対称性を有しており、ホスファチジルセリン (PS) は細胞膜内側に、ホスファチジルコリンは細胞膜外側に位置している。PSの細胞膜内側への移行にはフリッパーゼという酵素が関わっており、ATP依存的にPSを内側に保っている¹⁾(図1)。一方、リン脂質の非対称性は生体内において様々な局面で崩壊する。例えば、血小板が活性化するとPSが細胞表面に露出され、血液凝固因子が働く足場として作用する。また、アポトーシス時においてもPSが細胞表面に露出され、マクロファージによって認識、貪食され

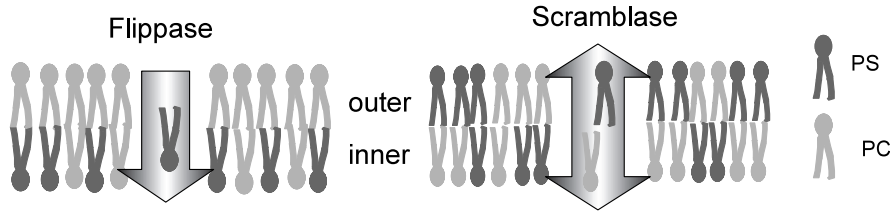


図1 Flippase と Scramblase

Flippase は ATP のエネルギーを消費して、PS を細胞膜内側に留めておくのに対し、Scramblase は、エネルギーを必要とせず、 Ca^{2+} 依存的に PS, PC を双方向に輸送する。

るための“Eat-me-signal”として機能する。これらの PS の細胞表面への露出にはカルシウム依存的にリン脂質を区別なく内側と外側でスクランブルさせるスクランブラーゼが関わりと仮定されていたが(図1)、その実体については分かっていなかった。本稿では、最近の筆者達の研究によって明らかとなったリン脂質のスクランブル機構について概説する²⁾。

2. スクランブラーゼ

PS の露出は、活性化された血小板において観察され、血液凝固に重要であることが示唆された³⁾。その約 10 年後にアポトーシス細胞においても PS が露出されることが分かり、PS の liposome を添加すると貪食が抑えられたことから、PS の露出はマクロファージによる貪食に必要なことと考えられた⁴⁾。両者において、PS の露出にはカルシウム依存的な経路が必要であると考えられている。一方、PS の露出と同時に通常は外側に存在するホスファチジルコリンが内側に取りこまれることから、リン脂質を細胞膜の内外でスクランブルさせるスクランブラーゼの存在が示唆された。1996 年に赤血球膜から精製したタンパク質を liposome に埋め込むという手法により phospholipid scramblase1 (PLSCR1) と呼ばれる分子が単離されたが⁵⁾、この分子のスクランブラーゼとしての機能は現在までに否定されている⁶⁾。また、ABCA1 が PS の露出に関わるという報告もなされたが、ABCA1 のノックアウトは PS を正常に露出することから、ABCA1 のスクランプリング過程への関与についても疑問が持たれている⁷⁾。そのような混沌とした状況の中で筆者達は、PS 露出にカルシウム依存的な経路が本当に必要なのかということから検討した。

3. カルシウムと PS 露出

マウス T リンパ球 WR19L 細胞に Fas を発現させた細胞を Fas ligand により刺激すると細胞は 1 時間でアポトーシ

スにより死滅する。この時、細胞内カルシウムをカルシウムインディケーター Fluo4-AM で検出するとアポトーシスの進行に伴いカルシウムレベルが上昇することが分かった。そこで、アポトーシス時の PS 露出にカルシウムの上昇が必要かどうかを調べるために、細胞外カルシウムを EGTA により、細胞内カルシウムを BAPTA-AM でキレートした条件においてアポトーシスを誘導した。すると、カルシウムをキレートしても正常に Caspase-3 が活性化し細胞はアポトーシスにより死滅した。しかしながら PS の露出を PS 結合タンパク質 AnnexinV により調べると、カルシウムのキレートにより露出が顕著に抑制されることが分かった。これによりアポトーシス時の PS 露出におけるカルシウムの必要性が確認できた。

そこで、PS 露出におけるカルシウムの一般性を調べるために、システイン残基修飾剤である N-ethylmaleimide (NEM) により誘導される PS 露出を調べた⁸⁾。その結果、NEM 処理による 10 分程度での速やかな PS 露出は細胞内カルシウムを BAPTA-AM によりキレートすることで抑制された。ゆえにアポトーシス以外の系においても PS 露出にカルシウムが必要なことが分かった。しかしながらこの時、細胞内 ATP レベルを調べてみると NEM 処理により激減していた。そこで、PS 露出に ATP の減少も必要なかを確認するために、カルシウムイオノフォア A23187 を用いてカルシウムの流入のみで PS 露出が起こるか調べた。その結果、細胞外カルシウムが存在する条件で A23187 を処理した細胞は速やかに PS を露出したが 15 分程度で破裂し死滅した。一方、細胞外カルシウムが存在しない状況で A23187 を処理すると PS は速やかに露出されたが細胞は破裂しなかった。この反応は細胞内カルシウムを BAPTA-AM によりキレートすることでほぼ完全に抑えられることからカルシウム依存的であり、小胞体などに貯蓄されたカルシウムが利用されたと考えられる。またこの時、細胞内 ATP レベルは変わらなかったことから、ATP

の減少がなくとも、カルシウムが直接的に PS 露出に関与していると結論した。一方、驚くことに、細胞外カルシウムが存在しない状況で A23187 処理により PS を露出した細胞を一晩カルシウムフリー培地で培養すると、露出した PS が元通り膜の内側に戻り、細胞増殖できることが分かった。つまり、A23187 処理時に細胞外カルシウムを一時的に除くことで、細胞を生かしたまま一過的に PS を露出させる実験系を構築できた。

4. PS 露出感受性細胞の樹立

そこで「細胞が生きたまま一過的に PS を露出する」という特徴をいかにせば PS 露出に感受性を獲得した細胞が得られるのではないかと考えた。Ba/F3 細胞に細胞外カルシウムが存在しない条件で A23187 を $1\mu\text{M}$ 処理し、PS を速やかに露出した細胞 (上位 1-5%) を FACS Aria によりソーティングした (図 2A)。カルシウムフリー培地で一晩培養し PS を内側に戻させた後、カルシウムを含む通常培地で細胞を 1 週間程度増殖させ、再び A23187 刺激とソーティングを行った。すると A23187 に感受性を獲得した細胞がソーティングを重ねることで濃縮されてきたことから、このアプローチがうまくいくことを確信した。そこで、

A23187 処理とソーティングを A23187 の濃度を段階的に下げながら 19 回繰り返すことで PS19 細胞を得た。すると親細胞 (PS0) では PS を露出できない 125 nM の A23187 で刺激した時に、PS19 細胞は速やかに PS を露出できることが分かった (図 2B)。それではこの細胞にどのような変化が起こったのであろうか？ フリッパーゼ活性が弱くなっている可能性とスクランブラーゼ活性が強くなっている可能性が考えられた。この二つの可能性を検証するために、PS0 細胞と PS19 細胞のどちらの形質が強いのか細胞融合法により確かめた。すると、融合細胞は PS 露出への感受性を獲得したことから、PS19 細胞の形質が強い、すなわち PS19 細胞はスクランブラーゼ活性が強くなっていると考えられた。

5. PS 露出因子の同定

PS19 細胞から PS 露出に関わる分子を同定するためにマイクロアレイ法による RNA の発現や二次元電気泳動法によるタンパク質の発現量の変化を解析したが、目的とする分子の同定には至らなかった。そこで、変異などの質的な変化が起こっている可能性も考え、PS19 細胞から cDNA ライブラリーを作成し、レトロウイルスベクターを用いて

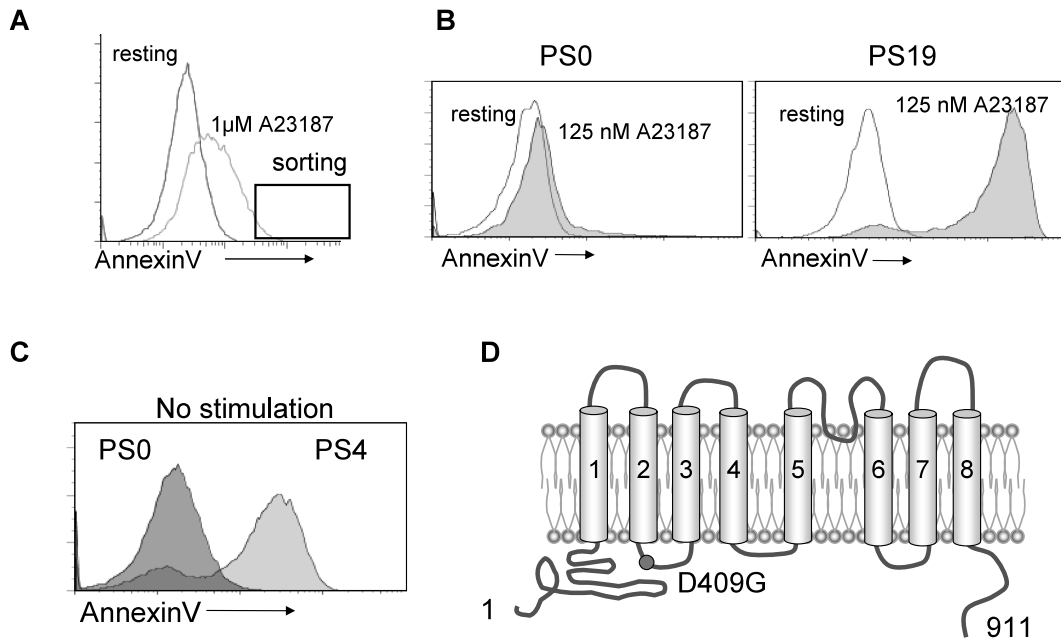


図 2 TMEM16F の同定

A. カルシウム非存在下で A23187 による刺激において PS を強く露出した細胞のソーティング。B. A23187 刺激とソーティングを 19 回繰り返した細胞の PS 露出。C. PS19 細胞から調製した cDNA library を親細胞 (PS0) に導入し、4 回ソーティングを行った細胞 (PS4) の PS 露出。D. PS4 から同定された TMEM16F は 2 番目の細胞内領域にアミノ酸置換を起こす変異 (D409G) が導入されていた。

発現クローニングを行った。低濃度 (125 nM) の A23187 による刺激と PS を強く露出した細胞のソーティングを 4 回繰り返すと、ほとんどの細胞が何も刺激をしなくても PS を露出するようになった (図 2C)。最初、ソーティングによるストレスにより細胞が死んでしまったのではないかと疑ったが、これらの細胞は問題なく増殖していた。そこで細胞に組み込まれた遺伝子を PCR により増幅し配列を読むと 8 回膜貫通タンパク質の TMEM16F であることが分かった。またクローニングされた PS19 細胞由来の TMEM16F には 2 回膜貫通と 3 回膜貫通領域の間の細胞内領域にアスパラギン酸からグリシンへのアミノ酸置換 (D409G) が起こっていた (図 2D)。そこで、野生型、D409G 変異型の TMEM16F をそれぞれ Ba/F3 細胞に発現させたところ、変異型を発現させた細胞のみで PS が恒常的に露出した。一方、野生型を発現させた細胞は、そのみでは PS を露出しないが A23187 により刺激するとコントロールよりも速やかに PS を露出した。また内在性の TMEM16F を shRNA によりノックダウンすると PS 露出は抑制された。以上のことから TMEM16F はカルシウムの上昇に応答して PS を露出する分子であることが分かった。

スクランブラーゼはカルシウム依存的にリン脂質を区別なく内側と外側でスクランブルさせる能力を持っているとされている。そこで、PS と同じく通常は細胞膜内側に存在するホスファチジルエタノールアミン (PE) の露出を京都大学工学研究科の梅田真郷博士から提供頂いた PE 結合ペプチド、Ro09-0198⁹⁾を用いて調べた。すると

TMEM16F の D409G 変異型を発現した細胞では PE が恒常的に露出し、野生型発現細胞においては、A23187 により刺激するとコントロールよりも速やかに PE が露出された。次に、通常は細胞膜外側に存在するホスファチジルコリン (PC) やスフィンゴミエリン (SM) が細胞内に取り込まれるのかを調べた。すると TMEM16F の D409G 変異型を発現した細胞では PC, SM を恒常的に取り込み、野生型発現細胞においては、A23187 刺激によりコントロールよりも速やかに取り込んだ。以上のことから TMEM16F はリン脂質を双方向に区別なく輸送するスクランブラーゼそのもの、あるいはそのコンポーネントであると結論した。

6. スコット症候群

血小板が活性化すると PS が細胞表面に露出され、血液凝固因子が働く足場として作用することが知られている。しかしながら、スコット症候群の患者では血小板において PS を露出できないため、血液凝固に異常があることが知られている。またこの病気の患者はリンパ球でも PS を露出できないことが確認されている。小島寛博士 (現茨城県中央病院) が留学時代に Rochester 大学の Peter J. Sims 博士の研究室でスコット症候群の患者の細胞株を樹立していたことを知り¹⁰⁾、Sims 博士から、患者、両親、そして健常者の不死化した B 細胞を送って頂いた。これらの細胞より RNA を調製後 TMEM16F の cDNA を調べると、患者において両親より cDNA のサイズが短いことが分かった。そこで、cDNA の配列を読むと患者では Exon13 がスキップされていた。次に Exon13 の近傍でゲノムの配列を読む

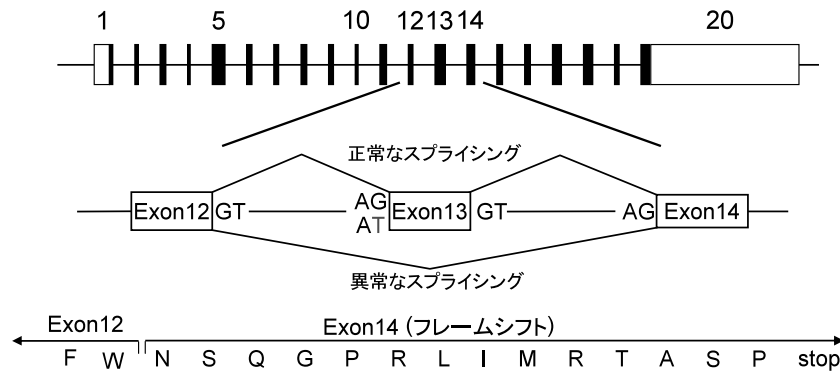


図3 スコット症候群における TMEM16F の変異

スコット症候群の患者においては、イントロン 12 のスプライシング受容部位において、AG から AT へ塩基置換があり、それにより Exon13 がスキップされ、フレームシフトを起こした結果、終止コドンが生まれ、全長のタンパク質を作ることができない。

と患者においては Intron12 と Exon13 のジャンクション、つまりはスプライシングアクセプターに AG から AT への変異が挿入されていた。これにより Exon13 がスキップされ、Exon12 から Exon14 に連結、Exon14 内で終止コドンができることで全長のタンパク質ができないことも分かった (図 3)。以上より TMEM16F はスコット症候群の原因遺伝子であると結論した。実際、最近ヨーロッパのグループがスコット症候群の別の患者において、TMEM16F の別部位に変異を見つけている¹¹⁾。また連鎖解析により犬のスコット症候群の原因遺伝子が 27 番染色体の狭い領域に絞り込まれているが¹²⁾、その領域には TMEM16F が位置しており、犬においても TMEM16F の変異がスコット症候群を引き起こしていると考えられる。

7. おわりに

本研究により長年疑問とされていたリン脂質のスクランブルにおいて重要な分子が見つかった。現在の段階では、TMEM16F がスクランブラーゼそのものとして直接リン脂質を動かす可能性と、何らかのイオンを通すことで膜上でのリン脂質の動きを間接的に調節している可能性がある。精製した TMEM16F を用いて試験管内でスクランブラーゼ活性を再構成すること、あるいは TMEM16F の構造解析等によりどちらの可能性が正しいか明らかにする必要がある。また、TMEM16F がアポトーシス時の PS 露出に関わっているのかどうかは、ノックアウトマウス由来の細胞を用いてあきらかになるであろう。高等生物において TMEM16 は、10 個のファミリーメンバーによって構成されており、最初に calcium-activated chloride channel として同定された TMEM16A、16B には PS を露出する能力はない (鈴木ら未発表)。10 個のファミリーメンバーの中で TMEM16F 以外にリン脂質をスクランブルさせるメンバーがあるか今後検討する予定である。最後に、PS の露出はアポトーシス時や血小板の活性化時だけでなく、筋肉・骨の成熟時、リンパ球の活性化時などにおいても見られると報告されている。TMEM16F をはじめ TMEM16 のファミリーメンバーがこれらの現象に関わっているのかも興味深い。

- 1) Daleke, D.L. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 821–825.
- 2) Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., & Nagata, S. (2010) *Nature*, 468, 834–838.
- 3) Bevers, E.M., Comfurius, P., & Zwaal, R.F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 736, 57–66.
- 4) Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Brat-

- ton, D.L., & Henson, P.M. (1992) *J. Immunol.*, 148, 2207–2216.
- 5) Bassé, F., Stout, J.G., Sims, P.J., & Wiedmer, T. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 17205–17210.
- 6) Bevers, E.M. & Williamson, P.L. (2010) *FEBS Lett.*, 584, 2724–2730.
- 7) Williamson, P., Halleck, M.S., Malowitz, J., Ng, S., Fan, X., Krahling, S., Remaley, A.T., & Schlegel, R.A. (2007) *PLoS One*, 2, e729.
- 8) Fadeel, B., Gleiss, B., Högstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P.J., Henter, J.I., Orrenius, S., & Samali, A. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 504–511.
- 9) Emoto, K., Toyama-Sorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K., & Umeda, M. (1997) *Exp. Cell Res.*, 232, 430–434.
- 10) Kojima, H., Newton-Nash, D., Weiss, H.J., Zhao, J., Sims, P.J., & Wiedmer, T. (1994) *J. Clin. Invest.*, 94, 2237–2244.
- 11) Castoldi, E., Collins, P.W., Williamson, P.L., & Bevers, E.M. (2011) *Blood*, 117, 4399–4400.
- 12) Brooks, M., Etter, K., Catalfamo, J., Brisbin, A., Bustamante, C., & Mezey, J. (2010) *Gene*, 450, 70–75.

鈴木 淳, 長田 重一

(京都大学大学院医学研究科医化学教室)

Phospholipid scrambling by TMEM16F

Jun Suzuki and Shigekazu Nagata (Department of Medical Chemistry, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

Src ファミリーチロシンキナーゼによる脳機能制御機構

1. はじめに

タンパク質チロシンリン酸化反応は、特に多細胞生物で発達しており、厳密な細胞間コミュニケーションの制御を必要とする発生・分化・代謝などのプロセスを制御することが知られている¹⁾。神経系は細胞間コミュニケーションが特に発達した組織であるが、その発生過程はもちろん、成熟後の脳の高次機能制御においても、チロシンリン酸化シグナルは重要な役割を果たす。

タンパク質チロシンリン酸化を担う多様なチロシンキナーゼの中で、非受容体型チロシンキナーゼ Src は歴史的に最初に発見されたチロシンキナーゼである。この Src と構造的な類似性を示す一群のチロシンキナーゼは、Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) と呼ばれ、Src を筆頭に、現在九つのメンバーが知られており、哺乳類の神経