

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域： 画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明
2. 研究開発課題名： 細胞膜における脂質動態の制御機構の解明とその応用
3. 研究開発代表者： 鈴木淳 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター
4. 研究開発の成果

我々はこれまでに、アポトーシス時にホスファチジルセリン (PS) を細胞表面に露出する膜タンパク質 Xkr8 を同定している (Suzuki et al., 2013 Science)。その活性化機構について研究を進める中で、Xkr8 はC末端の細胞内領域がカスパーゼ 3 によって切断されることで活性化することを示した。また 9 つのファミリーメンバーより構成される Xkr ファミリーの中で Xkr4 と Xkr9 が同様にカスパーゼ 3 によって C 末端の細胞内領域を切断されることで活性化することを示している (Suzuki et al., 2014 J Biol Chem)。本年度は、Xkr のカスパーゼによる活性化機構について更に詳細な研究を進めた。

Xkr8 が形成する複合体を Blue-Native PAGE(BN-PAGE)によって調べたところ、240kDa の複合体を形成することが分かった。この複合体の状態は細胞膜から可溶化する時に用いる界面活性剤の種類に依存しており、Digitonin や DDM で可溶化した時には捉えることができるが、NP-40 や TritonX-100 で可溶化した時には 140kDa に分子量が減少し複合体が崩壊していると考えられた。次にアポトーシス時の複合体を観察するために Xkr8 の N 末端に付加する Tag について検討した。その結果、FLAG や HA などの Tag においてはカスパーゼで Tag 自身が切断をうけ Xkr8 を検出できないが、V5 を用いると検出が可能になることが分かった。そこで N 末端に V5 を付加した Xkr8 を細胞に発現させアポトーシス刺激後、Xkr8 を DDM によって可溶化した但複合体を全く検出できないことが分かった。これは活性化した Xkr8 が DDM による可溶化条件においては不安定なためだと考え、様々な界面活性剤を再検討し直した結果、非イオン性界面活性剤の LMNG を用いるとアポトーシス刺激前、刺激後の両方の複合体を安定的に可溶化できることが分かった。

BN-PAGE により複合体を解析すると、アポトーシス刺激前には 240kDa の Xkr8 複合体がアポトーシス刺激による C 末端領域の切断後、600kDa の複合体を形成することが分かった。C 末端の細胞内領域がカスパーゼ 3 によって切断されない変異体 (2 つのアスパラギン酸をアラニンに置換したもの) を用いるとアポトーシス刺激した後でも大きい複合体は検出されないことから、Xkr8 の活性化にはカスパーゼ 3 によって切断されることでオリゴマー化することが重要であると考えられた。この変化が異なる実験系においてもみられるのか確認するために、グリセロール密度勾配遠心法により可溶化した Xkr8 複合体を解析したところ、アポトーシス刺激後には刺激前と比較して Xkr8 複合体が重くなっていること、すなわち大きくなっていることが確認された。

以上より本研究開発の目的の一つである Xkr8 の活性化機構の解析において、カスパーゼ 3 によって切断されることの意義を示すことが出来た点で成果があげられたと考える。