OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Functional expression of the P2X7 ATP receptor requires Eros
Author(s)	領田, 優太
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76635
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（領田優太）	
論文題名	Functional expression of the P2X7 ATP receptor requires Eros （ATP受容体P2X7の機能的な発現にはErosが必要である）

論文内容の要旨

P2X7は2個の膜貫通領域を持つ分子量約68,000のタンパク質であり、細胞膜に三量体として存在する。P2X7の細胞外領域に死細胞などから放出されたATPが結合すると、この分子はNa^+，K^+，Ca^{2+}等の無機カチオン及び分子量500以下の有機カチオンを非特異的に透過させるとともに、その下流でインフラマソームを活性化、IL-1βの放出を誘導する。一方、P2X7が活性化されると、細胞膜でリン脂質のスクランブリングが起こり、細胞表面にホスファチジルセリン（Phosphatidylserine，PS）が露出される。このようにP2X7は多彩な機能を持つタンパク質であるにも関わらず、その発現機構、作用機構及び生理作用は不明な点が多い。

今回、このATP刺激によるP2X7依存的なPS露出に必要な遺伝子群を同定することを目的としてゲノムワイドなCRISPR sgRNAスクリーニングを実施した。その結果、2個の膜貫通領域を持つEros （Essential for Reactive Oxygen Species）と呼ばれる膜タンパク質遺伝子が同定された。Erosをノックアウトしたマウス T細胞株 WR19Lでは、野生型細胞にてみられるATP刺激によるPS露出が著しく減弱した。

Eros遺伝子をノックアウトした細胞では、ATP刺激による細胞内カルシウム濃度上昇及び有機カチオンYO-PRO-1の取り込みも著しく減弱していた。さらにヒトマクロファージ細胞株 THP-1やマウス骨髄由来マクロファージ（BMDM）をLPSで処理した後、ATPで刺激するとIL-1βが放出されるが、この過程もEros遺伝子の欠損により顕著に減少した。

Eros遺伝子を欠損するWR19L細胞、THP-1細胞、BMDMではP2X7タンパク質の発現量が大幅に減少していた。2017年、Erosは、ERにおいてNADPH oxidaseのサブユニットに対するシャペロンとして機能することが報告されたが、同様に、ErosはERにてP2X7と一時的に相互作用してその発現を安定化させることを見出した。

以上、今回、ErosはNAPDH oxidaseだけでなくP2X7に対してもシャペロンとして機能し、自然免疫反応において多面的に作用することが明らかとなった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（ 領田 優太 ）			
	（職）		氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	長田 重一
	副 査	教授	山崎 晶
	副 査	教授	仲野 徹
	副 査	教授	木下 タロウ

論文審査の結果の要旨

リガンド依存性イオンチャネルP2X7は、細胞外領域にATPが結合すると、無機カチオン及び低分子量の有機カチオンを透過させるとともに、その下流でインフラマソームを活性化しIL-1 βの放出を誘導する。また、P2X7活性化時、細胞膜ではリン脂質のスクランブリングが起こることが知られる。

申請者は、この細胞膜スクランブリングに必要な遺伝子群の同定を目的として、CRISPR sgRNAスクリーニングを実施した。その結果、Erosと呼ばれるER膜タンパク質遺伝子が同定された。
Eros遺伝子を欠損した細胞では、P2X7活性化時の膜スクランブリングが著しく減弱したが、同時に、Ca^{2+}及び有機カチオンの細胞内流入やIL-1βの放出といった、P2X7下流で起こるその他の応答も広範に低下した。これらの細胞では、野生型と比してP2X7タンパク質の量が大幅に減少しており、ErosはERにてP2X7のシャペロンとして働くことが明らかとなった。

以上の研究は、P2X7発現機構の解明に寄与するものである。従って、申請者は学位を授与されるに値するものと認める。