

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08266

研究課題名(和文)細胞膜の非対称性の分子機構とその生理・病態的意義の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for the plasma membrane phospholipid asymmetry and its physiological and pathological roles

研究代表者

瀬川 勝盛 (Segawa, Katsumori)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門准教授

研究者番号：20542971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜におけるリン脂質の非対称的な分布は、真核細胞で見られる普遍的な現象である。すなわち、ホスファチジルセリンなどのアミノ基を持つリン脂質は、細胞膜の内層に限局し、細胞膜の外層には分布しない。細胞膜におけるリン脂質の非対称的分布の分子機構は不明であり、細胞膜リン脂質の物性における大きな謎である。本研究では、細胞膜の網のリン脂質を移層する酵素、リン脂質フリッパーゼとしてP4型ATPaseであるATP11AとATP11Cを同定し、その生化学的特性を解析した。また、P4型ATPaseのベータサブユニットであるCDC50Aの機能に必須なアミノ酸を同定した。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, phospholipids such as phosphatidylserine (PtdSer) is distributed asymmetrically, being localized in the inner leaflet of plasma membranes but not in the outer leaflet facing the extracellular milieu. Mechanisms for the plasma membrane phospholipid asymmetry have been elusive and an open question. In the present study, we identified ATP11A and ATP11C that belong to P4-ATPase family as plasma membrane phospholipid flippases. In addition, we biochemically investigated functions of CDC50A and identified essential amino acid residues responsible for a flippase's functions of P4-ATPase/CDC50A complex.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：リン脂質 細胞膜 フリッパーゼ P4-ATPase

1. 研究開始当初の背景

細胞膜におけるリン脂質の非対称的な分布は、真核細胞で見られる普遍的な現象である。すなわち、ホスファチジルセリン(PtdSer)やホスファチジルエタノールアミンなどのアミノ基を持つリン脂質は、細胞膜の内層に限局し、細胞膜の外層には分布しない。細胞膜におけるリン脂質の非対称性分布の分子機構は不明であり、細胞膜の物性における大きな謎である。さらに、「なぜ全ての細胞は細胞膜を非対称にする必要があるのか」という点、すなわち、細胞膜の非対称性の生物学的意義も完全な理解には至っていない。本研究では、哺乳類細胞における細胞膜リン脂質の非対称的分布の分子機構とその生理・病態的意義の解明を目的とする。

2. 研究の目的

細胞膜リン脂質の非対称的分布の分子機構とその生理・病態的意義の解明

3. 研究の方法

以前の研究により、哺乳類細胞の細胞膜上で PtdSer を内層へと輸送する酵素(フリッパーゼ)として P4-ATPase ファミリーに属する ATP11C と、P4-ATPase のファミリーメンバーの大部分に共通のβサブユニットである CDC50A を同定した (Segawa K et al., *Science*, 2014)。ATP11C は CDC50A 依存的に細胞膜に局在し、ATP11C 欠損細胞は、PtdSer-フリッパーゼ活性が親株の 20%程度に減少した。一方、CDC50A を欠損した細胞はフリッパーゼ活性

が消失し、細胞膜の外層に PS を露出した。この結果から、ATP11C 以外に、CDC50A 依存的に細胞膜で機能するフリッパーゼが存在すると考えられた。そこで、ATP11C 欠損細胞に P4 型 ATPase ファミリーメンバーを発現させ、どのメンバーが細胞膜におけるフリッパーゼ活性を回復させるかを検討した。また、同定された細胞膜フリッパーゼ複合体を精製し、その生化学的特性を検討した。次いで、βサブユニットである CDC50A の生化学的な解析を行った。

4. 研究成果

ATP11C 欠損細胞にヒト P4 型 ATPase のファミリーメンバーを発現させ、どのメンバーが細胞膜における PtdSer-フリッパーゼ活性を回復させるかを解析した結果、ATP11C 以外に、ATP11A と ATP8A2 が細胞膜におけるフリッパーゼ活性を回復させた (Segawa K et al., *J. Biol. Chem*, 2016)。ATP11A および ATP8A2 も CDC50A 依存的に細胞膜に局在することから、CDC50A 依存的な細胞膜フリッパーゼであると結論した。組織分布を検討した結果、ATP11A と ATP11C がヒト・マウスの組織に全身性に発現する一方、ATP8A2 はヒト、マウスともに神経細胞や精子など限られた細胞に発現した。次いで、これら細胞膜フリッパーゼの生化学的な解析を行った。HEK293T 細胞に FLAG タグを付加させた ATP8A2、ATP11A と ATP11C を CDC50A と共に発現、精製し、試験管内でリン脂質依存的な ATPase 活性を解析した。その結果、これらのメンバーは PtdSer とホスファチジルエタノールアミンに特異的に反応

し、ATPase 活性を増大させた。この反応は、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンなど他の脂質では見られなかった。ところで、アポトーシス細胞が表面に PtdSer を露出する際、フリッパーゼ活性が低下することが報告されている。そこで、全身性に発現する細胞膜フリッパーゼである ATP11A と ATP11C がアポトーシス時にどのような制御を受けるかを調べたところ、ATP11A と ATP11C がカスパーゼにより切断されることが分かった。実際、精製した ATP11A と ATP11C タンパク質をカスパーゼと反応させると、すみやかに分子中央部で切断され、PtdSer 依存的な ATPase 活性が消失する。この結果と一致して、カスパーゼ認識配列に変異を導入した ATP11A および ATP11C を発現した細胞は、アポトーシス時に PS を露出しない。以上より、カスパーゼによる細胞膜 PS-フリッパーゼの切断・不活性化が、アポトーシス細胞の PS 露出に必須であることが明らかとなった。細胞は、細胞内カルシウムの上昇によっても PtdSer を露出する。この過程においても、フリッパーゼ活性が減少すると想定されていたが、実際、精製した ATP11A と ATP11C による PS 依存的な ATPase 活性は、カルシウムの濃度依存的に阻害された。続いて、CDC50A を生化学的に解析した。ヒト CDC50A の cDNA 配列に error-prone PCR 法を用いてランダムに変異を導入し、約 10^7 クローンの変異体ライブラリーを作製した。このライブラリーを CDC50A 欠損 T-リンホーマ細胞株にレトロウイルスを用いて導入し、細胞膜上のフリッ

パーゼ活性を回復させない細胞をフローサイトメトリーを用いて回収した。回収した細胞に組み込まれた CDC50A cDNA 配列を増幅し、次世代シーケンサーで解析することで、CDC50A の機能を回復させない 14 箇所の変異を同定した。同定した 14 箇所のアミノ酸は全て CDC50A の細胞外ループに存在した。これらのアミノ酸に同定したアミノ酸置換を導入すると、多くの変異体は ATP11A や ATP11C と安定な複合体を形成できず、結果として ER に凝集していた。一方、260 番目のトリプトファン残基(W260)のアルギニンへの変異は、ATP11A や ATP11C と安定的な複合体を形成し、細胞膜に局在した。しかしながら、この変異をもつ CDC50A と結合した ATP11C は細胞膜上での PtdSer-フリッパーゼ活性が著しく減弱し、実際、精製した複合体は安定的に精製できるにもかかわらず、PtdSer 応答性の ATPase 活性が強く阻害されていた。従って、CDC50A は単に ATP11A や ATP11C の β サブユニットとして構造を安定化するだけでなく、W260 周辺の領域を介して直接 P4-ATPase の酵素活性を制御する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Segawa K, Kurata S, Nagata S.

The CDC50A extracellular region is required for forming a functional complex

with and chaperoning phospholipid flippases to the plasma membrane.

J. Biol. Chem., vol. 293, p.2172-2182, (2018). (査読有)

2. Yanagihashi Y, Segawa K, Maeda R, Nabeshima YI, Nagata S.

Mouse macrophages show different requirements for phosphatidylserine receptor Tim4 in efferocytosis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., vol. 114, p.8800-8805, (2017). (査読有)

3. Gyobu S, Ishihara K, Suzuki J, Segawa K, Nagata S.

Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., vol. 114, p.6274-6279, (2017). (査読有)

4. Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T.

Exposure of phosphatidylserine on the cell surface.

Cell Death Differ., vol. 23, p.952-61, (2016)

(査読有)

5. Segawa K, Kurata S, Nagata S.

Human type IV P-type ATPases that work as plasma membrane phospholipid flippases, and their regulation by caspase and calcium.

J. Biol. Chem., vol. 291, p.762-772, (2016).

(査読有)

6. Segawa K, Nagata S.

An apoptotic “eat me” signal: Phosphatidylserine exposure.

Trends Cell Biol., vol. 25, p.639-650, (2015). (査読有)

7. Toda S, Nishi C, Yanagihashi Y,

Segawa K, Nagata S.

Clearance of apoptotic cells and pyrenocytes.

Curr Top Dev Biol., vol. 114, p.267-295, (2015) (査読有)

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Segawa K and Nagata S.

Function and regulation of plasma membrane flippases.

The 15th international conference on Na,K-ATPase and related transport ATPases. Otsu, Shiga, Japan. (Sep 24-30, 2017).

2. 柳橋祐一・瀬川勝盛・長田重一
ホスファチジルセリン受容体 Tim4 による TAM レセプター依存的貪食の促進
ConBio2017 [3AW15-6]

3. 瀬川勝盛・長田重一
カスパーゼによるリン脂質フリッパーゼの切断とホスファチジルセリンの露出
BMB2015 [2W7-4]

〔図書〕（計 1 件）

1. 瀬川勝盛・長田重一

リン脂質フリッパーゼとアポトーシス細胞の認識

実験医学 vol. 34. No. 7 (増刊)

p.74-80. (2016)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
研究室ホームページ:
<http://biochemi.ifrec.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川 勝盛 (SEGAWA, Katsumori)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・
寄付研究部門准教授

研究者番号：20542971

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()