

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分  
平成30年3月12日現在

マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食と細胞膜の非対称性  
Engulfment of apoptotic cells and asymmetry of plasma membranes

課題番号：15H05785

長田 重一（NAGATA SHIGEKAZU）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門教授



研究の概要

動物の生体内では数多くの細胞が死滅し、その表面にフォスファチジルセリン(PtdSer)を“eat me”シグナルとして暴露、マクロファージがこれを認識、死細胞を貪食する。本研究は PtdSer の暴露機構を解明するとともに、マクロファージによる死細胞貪食の分子機構、生理作用を明らかにする。そして、その異常が自己免疫疾患などの疾病をおこす分子機構を明らかにする。

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：アポトーシス、マクロファージ、ホスファチジルセリン、フリッパーゼ、スクランブラーゼ

1. 研究開始当初の背景

マクロファージはフォスファチジルセリン(PtdSer)に結合する分子を用いてアポトーシス細胞を貪食する。この貪食過程が進行しないと自己免疫疾患などの疾患を引き起こす。細胞膜は2層から成り立ち、PtdSerは内膜に存在し、アポトーシスがおこると表面に暴露される。私達は PtdSer を外膜から内膜へ移動させるフリッパーゼ(ATP11AとCDC50A)、アポトーシス時に PtdSer を内外の膜の間でスクランブルさせるスクランブラーゼ(Xkr8)を同定した。また、PtdSerは活性化された細胞でもCa<sup>2+</sup>の作用により一過的に暴露されるが、この作用をおこすスクランブラーゼとしてTMEM16Fを同定した。

2. 研究の目的

(1)ATP11Cが属するP4-ATPase familyの発現分布、フリッパーゼ活性を明らかにするとともにその作用機構を解析する。(2)TMEM16Fの作用機構を明らかにする。(3)マクロファージによるアポトーシス細胞貪食の分子機構を明らかにする。(4)Xkr8及びXkr8に類似したスクランブラーゼとして作用するXkr4、Xkr9の生理作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)14個のP4-タイプATPaseの細胞内局在部位にフリッパーゼ活性が存在するか、アポトーシス時に切断されるかどうか明らかにする。(2)TMEM16FのCa<sup>2+</sup>結合能を検討するとともに、様々な変異を導入、Ca<sup>2+</sup>結合部位、

スクランブラーゼ活性に必要な部位を同定する。(3)腹腔常在マクロファージはPtdSer受容体Tim-4を用いて死細胞を集束し、MerTKを用いて貪食する。MerTKはTAM family(MerTK, Axl, Tyro3)に属し、Protein S(ProS)、Gas6が死細胞とTAMを仲立ちする。TAM familyの細胞外領域を調製し、ProS、Gas6との相互作用を解析する。またその発現細胞の貪食能を調べる。(4)Xkr4、Xkr8、Xkr9の発現細胞を同定するとともに、これら分子の生理作用を解明するため、ノックアウトマウスを作成する。

4. これまでの成果

(1)ATP11C欠損細胞にP4-ATPase cDNAをシヤペロンとして作用するCDC50A cDNAとともに導入、ATP11C以外に8A2、11Aにフリッパーゼ活性を認めた。ATP11A、11Cは普遍的に発現されているのに対し、8A2は脳でのみ発現していた。また、アポトーシス時にATP11A、11Cは切断されたが、8A2は切断されなかった。一方、CDC50Aに網羅的に変異を導入し、CDC50AはATP11Cのsubunitとしてフリッパーゼ活性にも寄与することを見出した。(2)TMEM16はCa<sup>2+</sup>存在下では2量体を形成するがCa<sup>2+</sup>非存在下では凝集した。このことを用いてTMEM16のCa<sup>2+</sup>結合部位を同定した。また、小胞体に存在する16E、16Kの膜貫通領域に存在する35個のアミノ酸をCl<sup>-</sup>チャネルである16Aに導入し、これらが小胞体でスクランブラーゼとして作用する可能性を指摘した。また、スクランブラーゼの“stepping

stone”モデルをサポートする結果を得るとともに、東大・渡邊力也氏との共同研究で一分子レベルで16Fのスクランブラーゼ活性を確認した。(3) TAM受容体の細胞外領域をIgFcと融合させ精製した。これらとProS, Gas6の相互作用を生化学的に解析し、Ax1はGas6と強い親和性を持つがProSとは結合しないことをみいだした。一方、死細胞貪食に宿主細胞として使われているNIH3T3はAx1を構成的に発現しており、これを欠損させるとその貪食能は完全に失われた。TAM受容体のどれかを発現する細胞は死細胞貪食能を獲得し、その活性はTIM4の共発現で飛躍的に増大した。実際、貪食能の強いマクロファージはTAM受容体とともにTim4を発現していた。(4) リンパ球や好中球はXkr8を発現しており、Xkr8の欠損マウスではアポトーシスに陥ったリンパ球、老化した好中球がPtdSerを暴露できず、マクロファージに貪食されなかった。Xkr8ノックアウトマウスはSLE様自己免疫疾患を発症した。貪食を免れたアポトーシス細胞はネクローシスに陥り、露出した細胞成分が免疫系を活性化したと考えられる。

#### 5. 今後の計画

本研究は、代表者がこれまでの成果をもとに「死細胞の貪食・分解」の分子機構・生理作用を明らかにしようとするものである。本年度の研究はほぼ順調に進捗した。フリッパーゼの活性にATP11CばかりでなくCDC50Aも直接関与しているとの結果は今後この分子の基質特異性を明らかにする上で重要である。今後はATP11A, ATP11Cのin vivoでの生理作用の解析を進める。また、一分子レベルでスクランブラーゼ活性測定に成功したことは、スクランブラーゼ候補分子に活性を同定する上で有用である。一方、MerTKには様々な細胞内標的分子が知られており、これらが貪食に関与しているかどうか解析する。さらにXkr4, Xkr9ノックアウトを作成し、これらの生理作用も検討する。

#### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Watanabe R, Sakuragi T, Noji H and Nagata S: Single-molecule analysis of phospholipid scrambling by TMEM16F. **PNAS**, in press
2. Nagata S: Apoptosis and clearance of apoptotic cells. **Annu Rev Immunol**, in press
3. Kawano M and Nagata S: Lupus-like autoimmune disease caused by a lack of Xkr8, a caspase-dependent phospholipid scramblase. **PNAS** 115: 2132-7, 2018
4. Segawa K, Kurata S and Nagata S: The CDC50A extracellular domain is required for forming a functional complex with and chaperoning phospholipid flippases to the plasma membrane. **JBC** 293:2172-82, 2018.
5. Yanagihashi Y, Segawa K, Maeda R, Nabeshima Y-i and Nagata S: Mouse

- macrophages show different requirements for phosphatidylserine receptor Tim4 in efferocytosis. **PNAS** 114: 8800-5, 2017
6. Gyobu S, Ishihara K, Suzuki J, Segawa K and Nagata S: Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. **PNAS** 114: 6274-79, 2017
  7. Nagata S and Tanaka M: Programmed cell death and the immune system. **Nat Rev Immunol** 17: 333-40, 2017
  8. Suzuki J, Imanishi E and Nagata S: The Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure. **PNAS** 113: 9509-14, 2016
  9. Nagata S: Killer enzymes tethered. **Nature** 533: 474-6, 2016
  10. Nagata S, Suzuki J, Segawa K and Fujii T: Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. **CDD** 23: 952-61, 2016
  11. Segawa K, and Kurata, S. and Nagata S: Human Type IV P-type ATPases that work as plasma membrane phospholipid flippases and their regulation by caspase and calcium. **JBC** 291: 762-2, 2016
  12. Gyobu S, Miyata H, Ikawa M, Yamazaki D, Takeshima H, Suzuki J and Nagata S: A role of TMEM16E carrying a scrambling domain in sperm motility. **MCB** 36: 645-59, 2015
  13. Fujii T, Sakata A, Nishimura S, Eto K and Nagata S: TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. **PNAS** 112: 12800-5, 2015
  14. Motani, K., Ito, S. and Nagata S: DNA-mediated cyclic GMP-AMP synthase-dependent and -independent regulation of innate immune responses. **J Immunol** 194: 4914-23, 2015

#### (招待講演)

1. Nagata S (Jan 2017) **Keynote address**, EMBO Workshop on "Cell death, inflammation, and cancer", Obergurgl, AUSTRIA
2. Nagata S (Nov 2015) **Keynote address**, Cell Symposia: Cell Death and Immunity, Berkeley, CA, USA
3. Nagata S (May 2015) **Keynote Lecture**, The 15th International TNF Conference, Ghent, BELGIUM

#### (受賞)

1. Shigekazu Nagata June 2017 CDD AWARD, Springer Nature, Italy
2. 瀬川勝盛 平成 29 年 4 月 文部科学大臣表彰 若手科学者賞
3. Shigekazu Nagata April 2016 Foreign Associate, National Academy of Sciences, USA
4. 長田重一 平成 28 年 1 月 日本癌学会名誉会員

ホームページ等

<http://biochemi.ifrec.osaka-u.ac.jp/>