

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08270

研究課題名(和文)リン脂質フリッパーゼによる生体膜の局所的な動態制御がもたらす新たな生理機能の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of phospholipids flippase ATP11C in non-apoptotic cells

研究代表者

高津 宏之(Takatsu, Hiroyuki)

京都大学・薬学研究科・研究員

研究者番号：70360576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ATP11Cは、細胞膜でリン脂質二重層の外葉から内葉へとPSやPEを特異的にフリップすることで、細胞の外側にPSが露出しないように働いている。これまでの研究で用いられてきたATP11C(a)に対して、C末だけが異なるATP11C(b)はPKCの活性化に感受性を示さなかった。極性細胞では、ATP11C(a)が細胞膜全体に局在するのに対して、ATP11C(b)は極性を持った局在を示すことが明らかとなった。このATP11C(b)の局在化はC末領域の特定のアミノ酸残基に起因していることを突き止めた。すなわち、一つの細胞の中の局所によってPSの露出に対する異なる制御機構が働いている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホスファチジルセリン(PS)の露出制御は、アポトーシス細胞など死にゆく細胞では詳しく解明されてきたが、正常な細胞での可逆的かつ一過的なものに関してはよくわかっていなかった。その中で今般、ATP11Cが重要な役割を担うことが明らかとなり、その2種類のアイソフォームで明確に局在と制御機構が異なることが明らかとなった。このことは、一つの細胞の中でも、ATP11Cの2つのアイソフォームが作用することで局所によりPSの露出制御が異なっていることを示すものである。これまで明らかにされていなかった一過的なPS露出の生理作用を解明していく上で重要な発見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：ATP11C, a member of the P4-ATPase family, translocates phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine at the plasma membrane. Although there are two N-terminal and three C-terminal splicing variants in human ATP11C and only latter variants in mouse ATP11C, the functional differences between isoforms have been neglected. We previously showed that the C-terminus of ATP11C-a (C1-form) is critical for its endocytosis upon PKC activation. However, C2- and C3-forms of ATP11C were not endocytosed upon PKC activation. Importantly, we found that ATP11C-b (C2-form) localized to the limited region of the plasma membrane in polarized cells, such as migrating Pro B cells and invasive breast cancer cells although ATP11C-a (C1-form) localized to the plasma membrane uniformly in either polarized or non-polarized cells. These results suggest that ATP11C-b isoform regulates the PS distribution at the distinct place of the plasma membrane in polarized cells.

研究分野：分子細胞生物

キーワード：フリッパーゼ ホスファチジルセリン ATP11C 極性細胞 P4-ATPase

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私は、メンブレントラフィックの分子機構に関する研究を行ってきた中で、生体膜の動態に興味を持ち、ヒト P4-ATPase の研究に着手し、これまでに全 13 種類のフリッパーゼの細胞内局在を決定した。これまでは、高等生物のフリッパーゼの活性と基質特異性に関してはほとんど分かっていなかったため、次の段階として培養細胞を用いたフリッパーゼ活性測定系を立ち上げ、いくつかのヒト P4-ATPase のフリッパーゼとしての基質特異性を明らかにした。その中で、ATP11C が細胞膜における PS および PE の特異的なフリッパーゼであることを示した。こうした過程で新たな疑問として、フリッパーゼの活性の ON と OFF がどのように制御されているのかに興味を抱くようになった。ところが、偶然にも PKC の活性化で ATP11C のフリッパーゼ活性がエンドサイトーシスによりダウンレギュレーションされることを発見した。これに端を発し、PKC に対する感受性は ATP11C の C 末端の細胞質領域に起因することを見出した。その一方で、ATP11C (以降、アイソフォーム(a))にはその C 末端の 33 アミノ酸(全長 1132 アミノ酸)だけが異なるアイソフォーム ATP11C(b)が存在し、多くの組織で共に発現していることが分かった。両者の PKC に対する応答を比較したところ、ATP11C(b)の PKC に対する応答は明らかに異なり、エンドサイトーシスによるダウンレギュレーションを受けないことが分かってきた。つまり、ATP11C は PKC による制御を受けるものと受けないもの、2つの異なるアイソフォームとして存在することが分かった(発見その1)。さらに、ATP11C の2つのアイソフォームは、これまでは両者とも細胞膜に均一に局在するものと考えてきたが、極性を有する細胞で局在を調べたところ、ATP11C(a)は細胞膜全体に均一に局在した一方で、ATP11C(b)は明らかに極性を持った局在を示すことが分かった(発見その2)。これら2つの発見は、同じ細胞の中で、PKC による制御によって局所的に PS を露出しやすくなる所と、PKC の影響を受けずに PS の露出を持続的に抑制する所、2つの異なる膜ドメインが存在しうることを強く示唆するとともに、局所的な PS の露出がもたらす何らかの生理的意義が存在するのではないかとすることを想起させた。

### 2. 研究の目的

ATP11C(b)の基本的な性質を明らかにし、ATP11C(a)との相違点を明確に示す。PS のフリッパーゼとしては同じ機能を持ちながらも異なる制御を受ける2つのアイソフォームが、細胞の局所での PS 露出をいかに制御しているのかを明らかにし、細胞接着、運動、シグナル伝達など、どのような生命現象に関係しているのかを突き止める。

### 3. 研究の方法

(1)ATP11C(a)および(b)の基本的性質の相違の明示。ATP11C(a)と(b)、両者は C 末端のバリエーションであり、わずか 30 アミノ酸前後が異なるだけである(全長(a) 1132 アミノ酸、(b) 1119 アミノ酸)。そこで、両者を識別可能なプライマーを作製し、様々な細胞株またはマウスの各組織由来の RNA から RT-PCR を行い、ATP11C の2つのアイソフォームの発現分布を調べる。また、様々な極性細胞での ATP11C(a)および(b)の細胞内局在を調べる。

(2)ATP11C(a)の C 末領域における PKC 感受性の要因の究明。ATP11C(a)の C 末領域に存在する 9 つのセリン・トレオニン残基をアラニンに置換した変異体を作製し、PKC に対する応答の変化を調べる。

(3)ATP11C(b)の極性に関する研究。ATP11C(b)の C 末端の 20 アミノ酸を 2 残基ずつアラニンに置換した変異体を作製し、その局在を調べることで極性のシグナル配列を同定する。

(4)ATP11C の2つのアイソフォームに起因した局所でのホスファチジルセリン(PS)露出の実証。蛍光標識した Annexin V などの PS に対するプローブを用いて、細胞表面での PS の局所的な露出の有無を蛍光顕微鏡で調べる。

(5)ATP11C の2つのアイソフォームのバランス操作がもたらす PS 露出の生理作用の解明。最新のゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 system を用いることで、ATP11C(a)と(b)、いずれか一方だけが発現する細胞を創出し、コントロール細胞と比較する。

#### 4. 研究成果

生体膜におけるホスファチジルセリン(PS)の露出の制御は、細胞死(アポトーシス)や細胞凝固などと密接に関わっており、生命を維持していく上で重要な機構である。リン脂質フリッパーゼ ATP11Cは、生体膜の外層から内層へとPSをフリップすることで定常時のPSの露出を抑制する膜タンパク質であり、C末端の細胞質領域の異なる2つのアイソフォームが存在する。

今般、(1)各組織や様々な細胞においてATP11Cの各アイソフォームの発現分布をRT-PCRおよび quantitative PCRにより明らかにした。その結果(図1)、ATP11C(a)、(b)ともほぼ普遍的に発現が見られたが、いずれも肝臓で特に高発現していることが明らかとなった。また、運動性の高いMDA-MB-231細胞や血球系の細胞では特にアイソフォーム(b)が高発現していることが分かった。さらに、意外にも第3の

アイソフォームATP11C(c)が脳で特異的に高発現していることも判明した。これらの結果、生体内でのATP11Cの働きを考える上で重要な知見を提供することとなった。次に各アイソフォームの細胞内局在を調べたところ、HeLa細胞ではいずれも細胞膜全体に局在した。ところが、MDA-MB-231細胞やBa/F3細胞では、ATP11C(a)は細胞膜全体に局在する一方、ATP11C(b)は細胞膜の特定の場所に限局することが明らかとなった。また、HepG2細胞では、ATP11C(b)が管腔膜に限局する様子も観察された。つまり、ATP11C(a)はどんな細胞でも万遍なく細胞膜に局在するのに対して、

ATP11C(b)は極性を有するような細胞では局在が限局されることが明らかとなった(図2)。しかしながら、両アイソフォームのHeLa細胞でのPSに対するフリッパーゼ活性に明確な差異は見られなかった。ただし、PKC阻害剤であるPMA処理に対するアイソフォーム間の応答は異なり、その制御機構が明確に異なることを明らかにした。

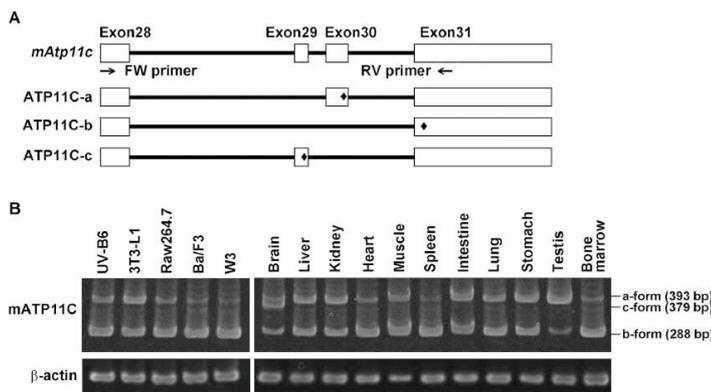


図1. ATP11C アイソフォームと発現レベル(RT-PCR)

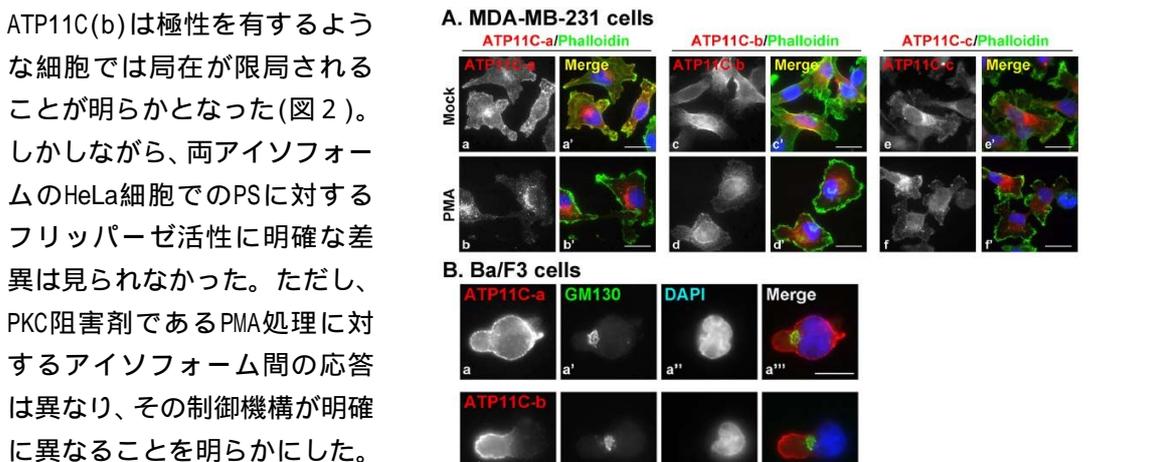


図2. ATP11C アイソフォームの細胞内局在

また、(2)ATP11C(a)のPMA感受性は、そのC末端に存在するジロイシン様モチーフが関与していることを明確に示した(図3)。



図3. ATP11C(a) & (b) のC末端のアミノ酸配列

一方、(3)ATP11C(b)の限局した局在が、そのC末端上のLLSYKHという6残基に依存していることを明らかにした(図4)。これらのことは一つの細胞内での局所的なPS露出の厳密な制御機構が存在することを意味するものである。

そこで、(5)CRISPR-Cas9システムを用いてATP11Cノックアウト細胞を作製し、そこからアイソフォーム(a)または(b)のいずれか一方のみを発現する細胞を樹立した。これによりATP11Cアイソフォーム(a)と(b)の機能的な違いを明確にしたいという目的であったが、残念ながら細胞運動をはじめとした特定の差異の検出には至らなかった。また、(4)カルシウム応答に応じた局所的かつ一過的なPSの露出が見られるのではないかという予想も、期待通りには行かなかった。

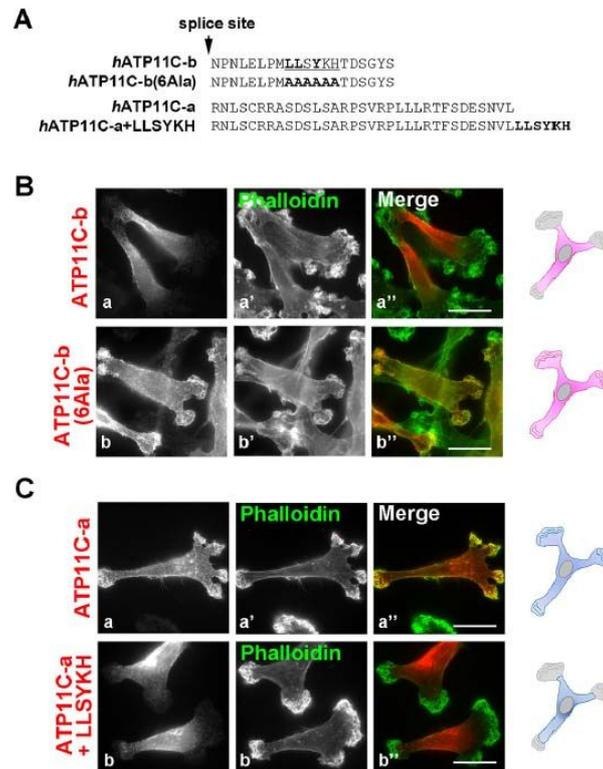


図4. 極性局在に重要なLLSYKH配列の同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takada N, Naito T, Inoue T, Nakayama K, Takatsu H, Shin HW.	4. 巻 May 2;37(9)
2. 論文標題 Phospholipid-flipping activity of P4-ATPase drives membrane curvature.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e97705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.15252/embj.201797705.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Roland BP, Naito T, Best JT, Arnaiz-Yeppez C, Takatsu H, Yu RJ, Shin HW, Graham TR.	4. 巻 Feb 8;294(6)
2. 論文標題 Yeast and human P4-ATPases transport glycosphingolipids using conserved structural motifs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 1794-1806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1074/jbc.RA118.005876.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takatsu H, Takayama M, Naito T, Takada N, Tsumagari K, Ishihama Y, Nakayama K, Shin HW.	4. 巻 Nov 10;8(1)
2. 論文標題 Phospholipid flippase ATP11C is endocytosed and downregulated following Ca <sup>2+</sup> -mediated protein kinase C activation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-01338-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高津宏之、高山真裕、井上寛己、中山和久、申 恵媛
2. 発表標題 リン脂質フリッパーゼATP11CのC末バリエーションの特性
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上寛己、高津宏之、高山真裕、中山和久、申 惠媛
2. 発表標題 リン脂質フリッパーゼATP11Cとezrinの相互作用
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高津宏之、高山真裕、中山和久、申 惠媛
2. 発表標題 非アポトーシス細胞におけるリン脂質フリッパーゼATP11Cの制御機構
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Masahiro Takayama, Hiroyuki Takatsu, Kazuhisa Nakayama and Hye-Won Shin
2. 発表標題 Functional differences between splicing variants of phospholipids flippase ATP11C
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考