

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03209

研究課題名(和文) 脂質フリッパーゼによる生体膜非対称性の維持と破綻の生理的意義

研究課題名(英文) Physiological roles of lipid asymmetry in biological membranes mediated by lipid flippases

研究代表者

申 惠媛 (Shin, Hye-Won)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：10345598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体やエンドソームに局在するP4-ATPaseのATP9AとATP9Bに着目し、タンパク質分泌経路におけるこれらのフリッパーゼの機能解析を行った。ATP9AとATP9BがVSVGタンパク質の細胞膜への輸送経路にリダンダントに機能することが明らかになった。さらにVSVGの輸送経路にはATP9A/Bのフリップ活性が必要であることを明らかにした。興味深いことに、ATP9AとATP9Bがホモおよびヘテロの複合体を形成していることを発見した。また、その複合体形成を介してATP9BがATP9Aの局在に寄与することを示唆した。ATP9A/Bのフリップ活性による小胞形成のメカニズムは今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵母のすべてのP4-ATPaseがメンブレントラフィックに関与することが報告されているが、ヒトの14種類のP4-ATPaseとメンブレントラフィックの関連はよくわかっていなかった。本研究では、特定のP4-ATPaseのフリップ活性がタンパク質の分泌経路に機能することを明らかにし、その分子メカニズムの一部を示唆示唆した。また、生体膜の生合成や伸長が必要なオートファゴソーム形成においても特定のP4-ATPaseのフリップ活性が必要であることを示した。本研究により、生体膜の非対称性の調節・維持のみならず様々な膜ダイナミクスが必要な細胞機能において脂質のフリップ活性が寄与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of ATP9A and ATP9B, P4-ATPases localized in the Golgi apparatus and endosomes, in the protein secretory pathway. We demonstrated that ATP9A and ATP9B redundantly play a critical role in the transport VSVG from the Golgi to the plasma membrane. We further discovered that the flippase activities of ATP9A and ATP9B are required for the VSVG transport pathway. Notably, we found that ATP9A and ATP9B can form a homo- or hetero-complexes. In addition, our findings suggest that the Golgi localization of ATP9A is partially attributed to the interaction with ATP9B. The involvement of complex formation in their enzymatic activities and the contribution of flippase activity in the formation of transport carriers from the Golgi complex remain to be determined.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：生体膜 脂質二重層 P4-ATPase フリッパーゼ メンブレントラフィック

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜は脂質二重層で構成されており、その内葉と外葉においてリン脂質組成の非対称性を保持している。細胞膜において、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンは外葉(細胞外側)に富んでおり、ホスファチジルセリンやホスファチジルエタノールアミンはほぼ内葉(細胞質側)にしか存在しない。この内葉と外葉のリン脂質組成の非対称性はリン脂質の flip-flop によって調節されている。P4-ATPase (フリッパーゼ) は、生体膜非対称性を調節しているが、P4-ATPase の調節メカニズムやその生理機能については良く分かっていない。酵母の遺伝学的研究から、P4-ATPase がメンブレントラフィックに関与することが報告されているが、ヒトの 14 種類の P4-ATPase とメンブレントラフィックの関連はよくわかっていない。その中で私たちは、これまでに細胞膜における P4-ATPase のフリップ活性の亢進が細胞膜を内側に変形させることを示し、この膜変形が細胞の形態変化およびエンドサイトーシスを促進することを示した^{1, 2}。さらに、エンドソームに局在する ATP9A がトランスフェリン受容体のエンドソームから細胞膜へのリサイクリングに関与することを示した。一方で、タンパク質の分泌経路における P4-ATPase の関与は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質分泌経路における P4-ATPase 機能およびその分子メカニズムの解明を目指した。特にゴルジ体やエンドソームに局在する P4-ATPase の ATP9A と ATP9B に着目した。

3. 研究の方法

1) ATP9A および ATP9B のノックアウト (KO) およびダブル KO (DKO) 細胞株の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて ATP9A あるいは ATP9B のノックアウト (KO) 細胞株および DKO 細胞株を樹立し、シークエンス解析によってゲノム編集を確認した。

2) VSVG-ts045 の細胞膜輸送

それぞれの KO 細胞および DKO 細胞において、EGFP-VSVG(ts045)タンパク質を発現させ、非許容温度の 40 °C で 16hr 以上インキュベートし、EGFP-VSVG(ts045)を小胞体に蓄積させた。その後、これらの細胞を許容温度の 32 °C で一定時間インキュベートした後、固定した。固定した細胞には、界面活性剤を処理せず、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行うことで、細胞膜に輸送された EGFP-VSVG の量を比較検討した。

4. 研究成果

1. VSVG の細胞膜への輸送経路において ATP9A と ATP9B がリダグダントに機能する

私たちは ATP9A のノックダウンにより、トランスフェリン受容体がエンドソームから細胞膜へのリサイクリングが遅延することを見出した³。一方で、ATP9A および ATP9B が共通してゴルジ体に局在することから、これらがゴルジ体から細胞膜への輸送経路に関与する可能性を考えて検討した。そのために、ATP9A および ATP9B をそれぞれノックアウト (KO) およびダブルノックアウト (DKO) 細胞株を樹立した。まず、これらのノックアウト細胞を用いて細胞内オルガネラの分布を調べたところ、エンドソーム、ゴルジ体、リソソームに局在するオルガネラマーカータンパク質の局在には顕著な異常が認められなかった。したが

って、ATP9A および ATP9B の KO によってオルガネラの分布には影響を与えないことが考えられた。

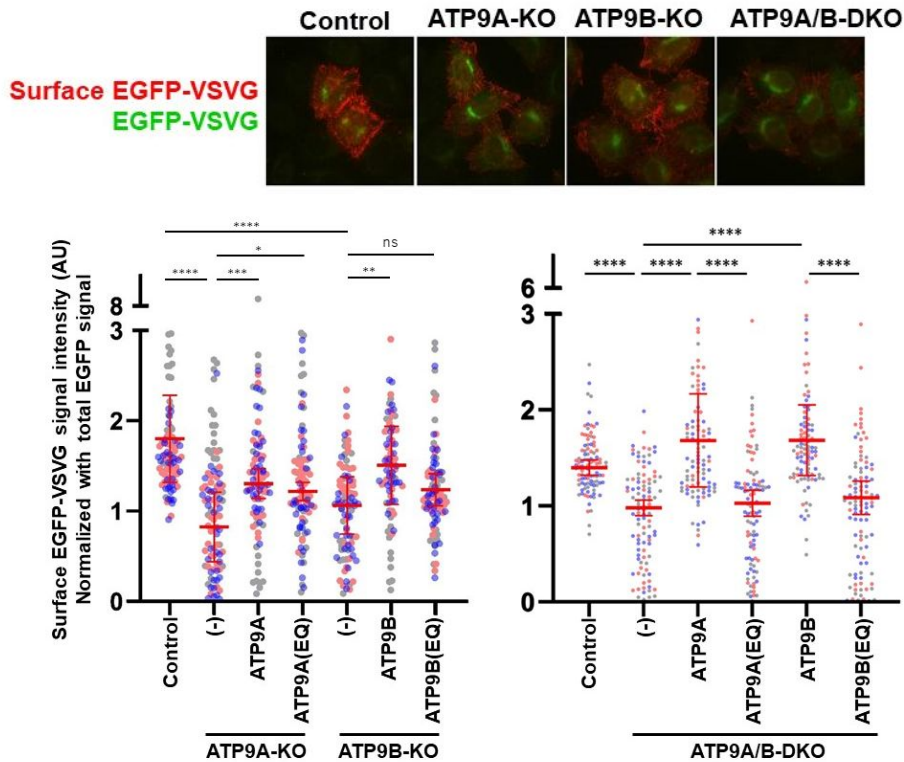


図 1 . ATP9A・9B のノックアウト細胞における膜タンパク質の細胞膜への輸送

次に、ATP9A および ATP9B の KO によるタンパク質分泌経路を調べた。そのために、これらの KO 細胞にウイルス由来の膜タンパク質 VSVG の温度感受性変異体 (ts045) を発現させその細胞膜への輸送を調べた。VSVG (ts045) タンパク質は、非許容温度の 40 °C では、フォールディングがうまく行かず小胞体に留まるが、許容温度の 32 °C では小胞体からゴルジ体を経て細胞膜へと輸送される。EGFP-VSVG (ts045) をそれぞれの KO 細胞に発現させ、40 °C から 32 °C にシフトしてから 1 時間インキュベートした後細胞表面に到達した EGFP-VSVG を観察した。細胞を固定してから透過処理をせずに抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行うことで、細胞表面の EGFP-VSVG のシグナルを調べた。その結果、ATP9A と ATP9B の KO 細胞および DKO 細胞においては細胞表面に露出した EGFP-VSVG の量が有意に低下していることが分かった (図 1 上段)。したがって、ATP9A や ATP9B はともに VSVG のゴルジ体から細胞膜への輸送経路に必要であることが明らかになった。また、これらの輸送経路に ATP9A や ATP9B のフリップアーゼ活性が必要であるかどうかを調べるため、KO 細胞に ATP9A と ATP9B の野生型および ATPase 活性欠損変異体をそれぞれの KO 細胞に発現させ、VSVG 輸送の回復を調べた。それぞれの KO 細胞に WT を発現させることで VSVG の細胞膜への輸送が回復した。面白いことに ATPase 活性欠損変異体を発現させたところ一部回復が見られた (図 1 下段左)。そこで、ATP9A や ATP9B がヘテロ複合体を形成して機能する可能性を考え、DKO 細胞でのレスキュー実験を行った。DKO 細胞においては、野生型 ATP9A あるいは ATP9B を発現させた場合は VSVG の輸送が回復したのに対して、それぞれの変異体の発現では回復しなかった (図 1 下段右)。このことから、シングル KO の場合は、内在性の ATP9A や ATP9B が存在することで変異体と複合体を形成し、一部回復が見られたと考えられた。

2. ATP9A と ATP9B はホモおよびヘテロ複合体を形成する。

ATP9A と ATP9B のホモおよびヘテロ複合体形成を検討するために、ATP9A-HA を安定発現している HeLa 細胞に FLAG タグを融合した ATP9A や ATP9B およびそれぞれの変異体を安定に発現させて、抗 HA 抗体で免疫沈降を行った後、抗 FLAG 抗体を用いてイムノプロットを行った。その結果、ATP9A は野生型と ATP9A および ATP9B とも相互作用することが分かった。さらに野生型のみならず ATPase 活性欠損変異体とも結合することが分かった（図 2 上段）。したがって、ATP9A と ATP9B はホモおよびヘテロダイマーあるいは複合体を形成して機能することが示唆された。

P4-ATPase は 10 回膜貫通型タンパク質であり、14 種類の P4-ATPase はそれぞれ固有の細胞内局在を示す⁴。この局在には、P4-ATPase の N 末端および C 末端の細胞質領域が重要な役割を果たしている⁵⁻⁸。ATP9A はエンドソームやゴルジ体に局在するのに対して、ATP9B はゴルジ体だけに局在し、ATP9B のゴルジ体限定の局在はその N 末端のサイトゾル領域が必要である⁴。興味深いことに、それぞれの KO 細胞に ATP9A-HA を安定発現させ局在を調べたところ、ATP9B-KO あるいは ATP9A/9B-DKO 細胞では、ATP9A のエンドソーム様の局在がより顕著になることが分かった（図 2 下段）。したがって、ATP9A のゴルジ体局在は ATP9B と相互作用が寄与していることが示唆された。これは ATP9A や ATP9B がヘテロダイマーあるいはオリゴマーを形成する可能性をサポートする結果である。

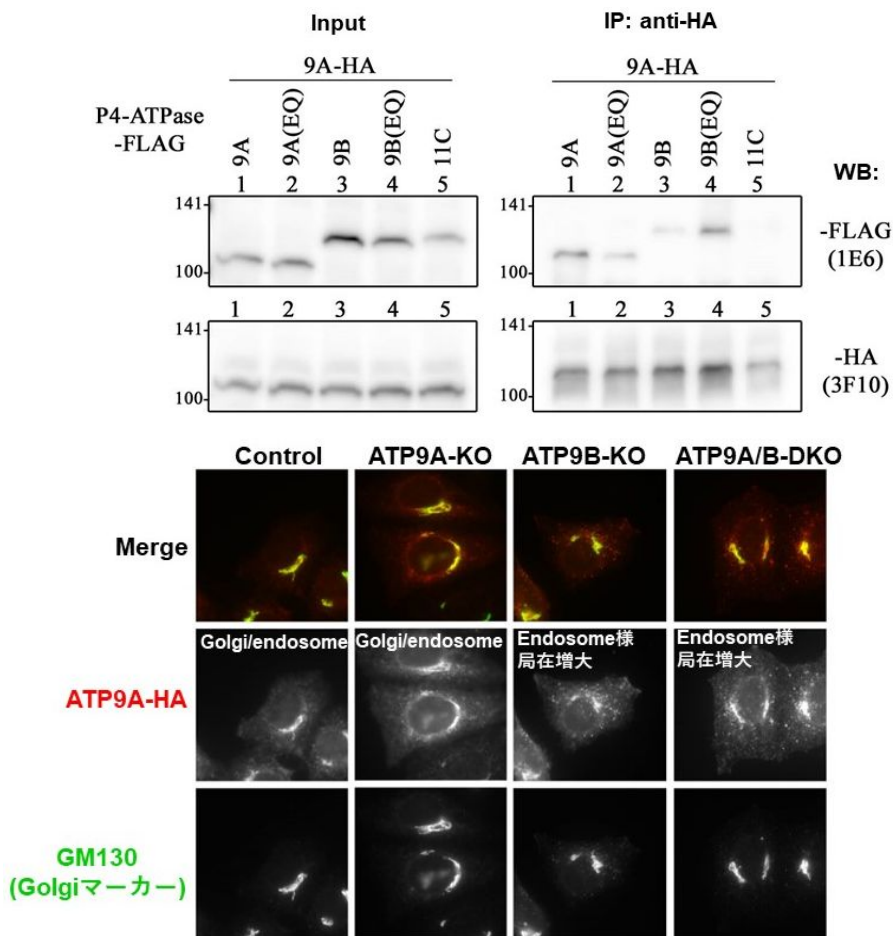


図2. ATP9A・9Bのホモ・ヘテロ複合体の形成

3. ATP9A および ATP9B の結合タンパク質 (Mon2)

ATP9A や ATP9B がどのようなメカニズムでゴルジ体からのタンパク質輸送を調節してい

るかについてさらに研究を進めた。Mon2 は、低分子量 GTPase の ARF ファミリータンパク質の GDP/GTP 交換因子 (GEF) の類似タンパク質として同定され、メンブレントラフィックに関与することや ATP9A と結合する可能性が報告されていた⁹。しかし、ゴルジ体からのタンパク質の分泌経路に関与するかは不明であった。まず、ATP9A および ATP9B が Mon2 と結合することを共免疫沈降法により確認した (図3)。さらに、Mon2 に対する抗体を作製し、その局在を調べたところ ATP9A や ATP9B と同様にゴルジ体に局在していた。ATP9A や ATP9B は Mon2 との結合を介してゴルジ体からのタンパク質輸送に関与する可能性を考えて解析を続けている。

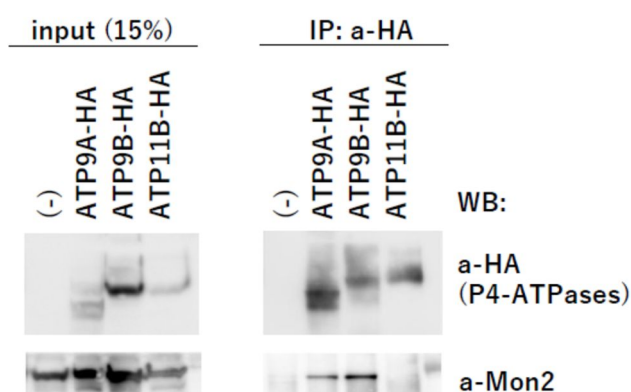


図3 . ATP9AとATP9Bの結合タンパク質としてMon2を発見

参考文献

1. Takada, N. *et al.* Phospholipid-flipping activity of P4-ATPase drives membrane curvature. *EMBO J* **37**, e97705 (2018).
2. Naito, T. *et al.* Phospholipid Flippase ATP10A Translocates Phosphatidylcholine and Is Involved in Plasma Membrane Dynamics. *J Biol Chem* **290**, 15004-15017 (2015).
3. Tanaka, Y. *et al.* The phospholipid flippase ATP9A is required for recycling pathway from endosomes to the plasma membrane. *Mol Biol Cell* **27**, 3883-3893 (2016).
4. Takatsu, H. *et al.* ATP9B, a P4-ATPase (a Putative Aminophospholipid Translocase), Localizes to the trans-Golgi Network in a CDC50 Protein-independent Manner. *J. Biol. Chem.* **286**, 38159-38167 (2011).
5. Shin, H.W. & Takatsu, H. Regulatory Roles of N- and C-Terminal Cytoplasmic Regions of P4-ATPases. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **70**, 524-532 (2022).
6. Inoue, H. *et al.* The interaction of ATP11C-b with ezrin contributes to its polarized localization. *J Cell Sci* **134**, jcs258523 (2021).
7. Okamoto, S. *et al.* The N- or C-terminal cytoplasmic regions of P4-ATPases determine their cellular localization. *Mol Biol Cell* **31**, 2115-2124 (2020).
8. Takatsu, H. *et al.* Phospholipid flippase ATP11C is endocytosed and downregulated following Ca²⁺-mediated protein kinase C activation. *Nat Commun* **8**, 1423 (2017).
9. McGough, I.J. *et al.* SNX3-retromer requires an evolutionary conserved MON2:DOPEY2:ATP9A complex to mediate Wntless sorting and Wnt secretion. *Nat Commun* **9**, 3737 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 Lala Trisha, Doan Juleva K., Takatsu Hiroyuki, Hartzell H. Criss, Shin Hye-Won, Hall Randy A.	4. 巻 298
2. 論文標題 Phosphatidylserine exposure modulates adhesion GPCR BA11 (ADGRB1) signaling activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102685 ~ 102685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102685	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 Shin Hye-Won, Takatsu Hiroyuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Regulatory Roles of N- and C-Terminal Cytoplasmic Regions of P4-ATPases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 524 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00042	査読の有無 無
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 Inoue Hiroki, Takatsu Hiroyuki, Hamamoto Asuka, Takayama Masahiro, Nakabuchi Riki, Muranaka Yumeka, Yagi Tsukasa, Nakayama Kazuhisa, Shin Hye-Won	4. 巻 134
2. 論文標題 The interaction of ATP11C-b with ezrin contributes to its polarized localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.258523	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 Okamoto, S., Naito, T., Shigetomi, R., Kosugi, Y., Nakayama, K., Takatsu, H., and Shin, H.-W.	4. 巻 31
2. 論文標題 The N- or C-terminal cytoplasmic regions of P4-ATPases determine their cellular localization.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 2115-2124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-04-0225	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 喜多夏暉、瀧本明日香、ボメゴウダシツダバサーブゴウダ、高津宏之、中山和久、惠淑萍、申 惠媛
2. 発表標題 グルコシルセラミドフリッパーゼ発現によるゴ シェ病細胞の異常改善の検討
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中淵立樹、高津宏之、中山和久、申 惠媛
2. 発表標題 脂質フリッパーゼATP9Aの活性がオートファジーに与える影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村中友萌香、重富亮、山崎雄吾、中山和久、高津宏之、申 惠媛
2. 発表標題 ホスファチジルイノシトールをflipするP4-ATPaseの発見
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木司、中淵立樹、高津宏之、中山和久、申 惠媛
2. 発表標題 タンパク質分泌経路におけるリン脂質フリッパーゼATP9A/ATP9Bの役割
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 申 惠媛
2. 発表標題 生体膜非対称性を制御する脂質フリッパーゼの細胞内局在のメカニズム
3. 学会等名 大阪大学タンパク質研究所セミナー：生体膜上の生物科学（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喜多夏暉、瀧本明日香、高津宏之、中山和久、申 惠媛
2. 発表標題 ゴーシェ病患者の細胞にみられるリソソームの機能異常
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上寛己、高津宏之、申 惠媛
2. 発表標題 リン脂質フリッパーゼATP11Cの極性局在メカニズム
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hye-Won Shin
2. 発表標題 Regulation of activity and localization of phosphatidylserine flippase, ATP11C.
3. 学会等名 Cell Bio virtual 2021 (ASCB & EMBO meeting) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 申 惠媛
2. 発表標題 リン脂質フリッパーゼによる生体膜曲率の誘導
3. 学会等名 日本薬学会大140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 申 惠媛
2. 発表標題 脂質フリッパーゼの細胞内局在決定のメカニズム
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田哲、山崎和生、大保貴嗣、高津宏之、申 惠媛、Stefania Danko、川辺淳一、鈴木裕
2. 発表標題 ヒトフリッパーゼATP8A1とCaポンプの反応機構の比較
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中山和久監訳 共訳（申 惠媛 第4章、第13章）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 598
3. 書名 フロッパー細胞生物学 第3版（細胞の基本原理を学ぶ）	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Emory University School of Medicine			
フランス	Angers University Hospital			