

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15731

研究課題名（和文）Xkr8によるリン脂質スクランブル機構の解明

研究課題名（英文）The study on mechanism of phospholipid scrambling by Xkr8

研究代表者

櫻木 崇晴（Sakuragi, Takaharu）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教（常勤）

研究者番号：10867906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞膜を構成するリン脂質は、その内層と外層で非対称的に分布する。アポトーシス細胞ではこの非対称性が崩壊し、通常細胞膜の内層に存在するホスファチジルセリンが細胞表面に露出される。この過程には、リン脂質を区別無く双方向に輸送する膜タンパク質、スクランブラーゼが働く。アポトーシス時に働くスクランブラーゼの実体はXkr8-Basigin複合体であるが、この分子がリン脂質を輸送する仕組みは不明である。本研究では、Xkr8-Basigin複合体の定常状態の構造を決定し、Xkr8-Basigin複合体の作用機序の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞がアポトーシスを起こすと、細胞表面に‘eat me’シグナルであるホスファチジルセリンを露出し、食細胞によって速やかに貪食される。このホスファチジルセリン露出に必須なスクランブラーゼ、Xkr8-Basigin複合体の機能が損なわれると、アポトーシス細胞が速やかに貪食されないため、個体においては自己免疫疾患や精子欠乏症を発症する。本研究ではXkr8-Basigin複合体の立体構造解析および変異体の機能解析により、この分子の作用機序の一端を解明した。この成果は将来、上記疾患の病態解明の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Phospholipids in the plasma membranes are asymmetrically distributed. This asymmetrical distribution is disrupted in apoptotic cells, and phosphatidylserine, which normally localizes to the inner leaflet, is exposed to the cell surface. This process is supported by membrane proteins called scramblases, which transport phospholipids nonspecifically and bidirectionally. Xkr8-Basigin complex is a scramblase activated during apoptosis, but how it transports phospholipids remains elusive. In this study, we determined the inactive state structure of Xkr8-Basigin complex, which provided insights into the mechanism of phospholipid scrambling by the complex.

研究分野：リン脂質スクランブラーゼ

キーワード：リン脂質スクランブラーゼ Xkr8-Basigin複合体 構造解析 単粒子解析 ホスファチジルセリン露出  
‘eat me’シグナル アポトーシス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成するリン脂質はその内層と外層で非対称的に分布する。例えばホスファチジルセリン(PS)は全て内層に存在するが、ホスファチジルコリン(PC)は主に外層に存在する。ところが、アポトーシス細胞や活性化血小板などでは、この非対称性が崩壊し、通常細胞膜の内層に分布するPSが細胞表面に露出する。アポトーシス細胞の表面に露出されたPSは‘eat me’シグナルとして働き、マクロファージによる貪食を促進する。一方、活性化血小板に露出されたPSは血液凝固因子の足場として働き、凝固反応を促進する。この過程には、リン脂質を区別無く双方向に移動させる膜タンパク質、スクランブラーゼの働きが必要である。これまでに大きく分けて2つのスクランブラーゼが同定された。一つは、活性化血小板においてカルシウム依存的に活性化するスクランブラーゼ、TMEM16Fである。それに対しXkr8-Basigin(BSG)複合体は、アポトーシス細胞においてカスパーゼによってXkr8のC末端が切断されることにより活性化するスクランブラーゼである。また申請者は、Xkr8-BSG複合体が、ある種の腫瘍細胞ではリン酸化依存的に活性化することを発見した。これまでにTMEM16Fの立体構造が報告されているが、その作用機序として複数の説が提唱され議論が続いている。また、**Xkr8-BSG複合体の立体構造は過去に報告がなく、この複合体がどのようにリン脂質をスクランブルするのは不明である。**

### 2. 研究の目的

本研究では、Xkr8-BSG複合体の立体構造解析を行うことにより、この分子がどのようにリン脂質を認識し輸送するのか、その仕組みを原子分解能のレベルで解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1)ヒスタグを付加したヒトXkr8およびヒトBSGをバキュロウイルス-Sf9発現系により大量発現し、金属アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。単粒子解析における方位決定の目印とするため、Xkr8-BSG複合体に対するモノクローナル抗体を樹立し、そのFabをXkr8-BSG複合体に結合させ、続いて密度勾配遠心法によりXkr8-BSG-Fab複合体を精製した。この精製タンパクを氷包埋し、低温電子顕微鏡で観察、単粒子解析によって複合体の構造を決定した。

(2)Xkr8の膜貫通領域に存在する荷電アミノ酸、およびリン脂質の結合した溝に存在する疎水性残基に変異を導入した。マウスプロB細胞株であるBa/F3細胞に野生型のXkr8を安定発現させると、リン酸化依存的なリン脂質スクランブリング活性を示すことが分かっている。上記の変異体をBa/F3細胞に安定発現させ、野生型のXkr8と比べてスクランブリング活性が変化するかどうかを調べた。

### 4. 研究成果

#### (1)リン脂質の結合したXkr8-BSG複合体の構造

**単粒子解析により、Xkr8-BSG複合体の構造を3.8Åの分解能で決定することに成功した(図1A)。**この構造から、Xkr8は8本の膜貫通ヘリックス、膜の内部で折り返す2本のヘリックス、カスパーゼ切断部位を含む1本の細胞内ヘリックスを持つことが分かった(図1B)。これはTMEM16Fの構造とは大きく異なっていた。また、Xkr8の細胞膜外層に面した疎水性の溝にリン脂質が一つ結合していた(図2A)。この溝を構成する疎水性残基の変異体解析の結果から、この溝がスクランブリング活性に必須であり、リン脂質の出入口として働く可能性が示唆された。

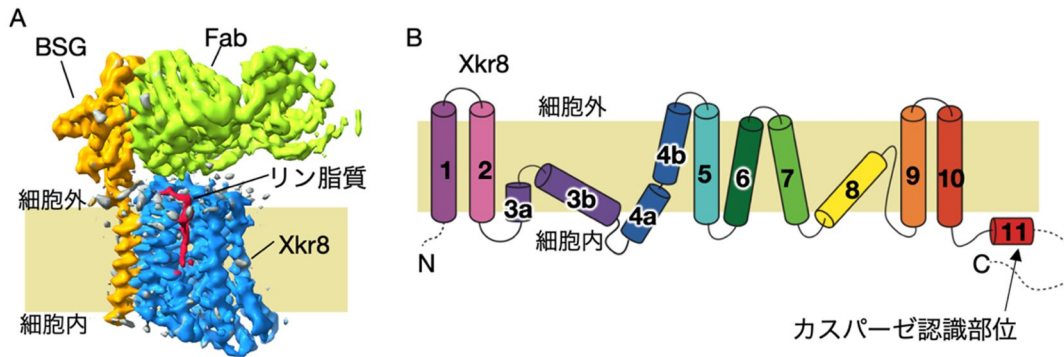


図 1. Xkr8-BSG 複合体の構造

A)Xkr8-BSG 複合体の密度マップ。B)Xkr8 のトポロジー図。(図は Sakuragi et al.,2021,Nat Struct Mol Biol より転載)

### ( 2 ) Xkr8 の膜貫通領域に並ぶ荷電アミノ酸

親水性のリン脂質頭部領域を通過させるため、スクランブラーゼの膜貫通領域には親水性のポア領域が存在することが予測された。実際、Xkr8 の膜貫通領域には、多数の荷電アミノ酸が階段の様に連なる部位が発見された(図 2A)。さらに、この領域に存在する荷電アミノ酸の変異体解析の結果から、これらの荷電アミノ酸が Xkr8 複合体のリン脂質スクランピング活性に必須であることも分かった。これらの結果から、この領域がリン脂質頭部を通過させるポア領域である可能性が示唆された。

### ( 3 ) スクランピング活性を制御するトリプトファン

ポア領域と予測される、荷電残基の並ぶ部位の上部と、疎水性の溝に結合したリン脂質の頭部は隣接しており、その間には一つのトリプトファン(W45)が存在していた(図 2B)。この配置から、“ W45 は定常状態において、リン脂質頭部がポア領域へ侵入することを妨げている ” という仮説を立てた。実際、W45A 変異体はリン酸化非依存的にリン脂質を通過させた。これらの結果から、W45 はポア領域の gate keeper として働き、Xkr8-BSG 複合体の活性を制御すると考えた。

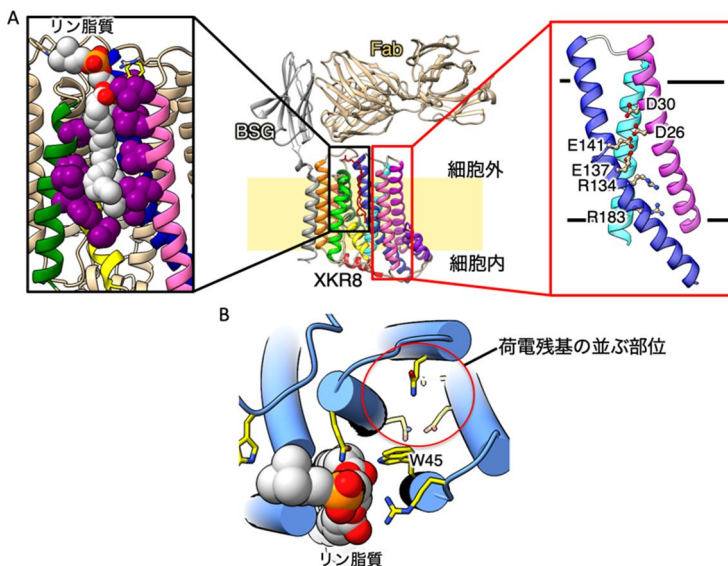


図 2. Xkr8-BSG 複合体の構造的特徴

A)細胞膜に平行な方向から見た Xkr8 複合体の構造。拡大図は、疎水性残基(紫の球で表示)からなる溝と結合したリン脂質(左)、および膜貫通領域に並ぶ荷電アミノ酸(右)。B)荷電残基の並ぶ部位とリン脂質頭部の間に存在する W45。(A は Sakuragi et al.,2021,Nat Struct Mol Biol より転載)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakuragi Takaharu, Kanai Ryuta, Tsutsumi Akihisa, Narita Hiroataka, Onishi Eriko, Nishino Kohei, Miyazaki Takuya, Baba Takeshi, Kosako Hidetaka, Nakagawa Atsushi, Kikkawa Masahide, Toyoshima Chikashi, Nagata Shigekazu	4. 巻 28
2. 論文標題 The tertiary structure of the human Xkr8-Basigin complex that scrambles phospholipids at plasma membranes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 825 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-021-00665-8	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sakuragi Takaharu, Kanai Ryuta, Tsutsumi Akihisa, Narita Hiroataka, Onishi Eriko, Nishino Kohei, Miyazaki Takuya, Baba Takeshi, Kosako Hidetaka, Nakagawa Atsushi, Kikkawa Masahide, Toyoshima Chikashi, Nagata Shigekazu
2. 発表標題 The tertiary structure of the human Xkr8-Basigin complex that scrambles phospholipids at plasma membranes
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 櫻木崇晴、長田重一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 133
3. 書名 実験医学2022年3月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

免疫学フロンティア研究センターホームページ(ヒトXkr8-Basigin複合体の立体構造解析)  
<http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/research/20211012-1200.htm>

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
---------	---------