

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659047

研究課題名（和文） 形質膜での脂質の非対称分布を制御するフリップ・フロップの分子機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism of flip-flop that regulates the asymmetric distribution of lipids in the plasma membranes

## 研究代表者

長谷川 顕子（山路顕子）(HASEGAWA AKIKO)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：20332314

## 研究成果の概要（和文）：

フリップ・フロップの欠損株と考えられる変異株の責任因子として、あるアダプター蛋白質を同定した。RNAi 実験の結果から、このアダプター蛋白質は細胞形質膜におけるホスファチジルセリンの動態制御に関与する可能性が示唆された。次に、アダプター蛋白質と協調してフリップ・フロップに携わる分子を探索したが、同定には至らなかった。また、フリップ・フロップに関わるシグナル伝達経路の解析を行ったところ、細胞骨格との関連が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

An adaptor protein was identified as the responsible factor of the mutant which was thought to have a defect of flip-flop machinery. The results of the RNAi experiment suggested the possibility that the adaptor protein contributes to the regulation of transbilayer movement of phosphatidylserine at the plasma membranes. I tried to identify the molecules which take part in the flip-flop machinery in cooperation with the adaptor protein. However, it has not succeeded yet. I also analyzed the signaling pathway involved in flip-flop machinery, and the relationship between flip-flop and cytoskeleton was implied.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：フリップ・フロップ、ホスファチジルセリン、脂質動態、形質膜、非対称分布、変異株

## 1. 研究開始当初の背景

細胞形質膜において、ホスファチジルセリンは内層に偏って局在しており、さらに細胞外

からの刺激や細胞の状況に応じてその分布が劇的に変化することが知られている。このような非対称性や脂質動態は人工膜では再現されないことから、生体膜には ATP のエ

エネルギーを使って膜脂質を非対称に分布させるような特別な分子装置「フリップ・フロップ機構」が備わっていると考えられている。これまでに、フリップ・フロップの実行分子を探索する研究が行われ、最近、酵母や線虫を用いた遺伝学的解析により、P型ATPaseタイプ4ホモログがホスファチジルセリンの非対称分布に関与することが報告された。しかし、脂質の移行メカニズムや調節機構などの詳細な分子機構は未だ明らかになっておらず、また複雑な細胞機能を有する哺乳動物細胞でのフリップ・フロップを解明するには情報が乏しい。したがって、フリップ・フロップに携わる新たな因子の同定や細胞の局面ごとの詳細なメカニズムの解析が必要となっている。

研究代表者はこれまでフリップ・フロップの分子基盤の解明を目指して、フリップ・フロップの欠損株であると推測される変異細胞株の性状解析を行ってきた。この変異株は、ホスファチジルセリン低感受性（親株CHO-K1は細胞外から高濃度のホスファチジルセリンを添加すると細胞死を起こす）、形質膜外層に挿入した蛍光標識ホスファチジルセリンの細胞内への取り込みの顕著な遅れ、などの異常形質を示す。一方で、変異株の脂質代謝・エンドサイトーシスなどには異常は認められない。変異株の責任因子を探索した結果、とあるアダプター蛋白質の遺伝子発現がほぼ完全に抑えられており、内生量も低下していることが明らかとなった。そこで、親株でのアダプター蛋白質の発現をRNAi法により抑制したところ、ホスファチジルセリン低感受性や蛍光標識ホスファチジルセリンの取り込み遅延など、変異株で観察された異常形質が再現された。これらの結果から、このアダプター蛋白質が形質膜におけるホスファチジルセリンの動態に関与している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

細胞形質膜における脂質分布は内外層で非対称であり、ホスファチジルセリンなどのアミノリン脂質は通常は内層に局在し、さらに細胞内外の状況に応じてその分布は劇的に変化することが知られている。このようなリン脂質の特徴的な細胞内動態には、脂質をエネルギー依存的に脂質二重層を横切らせるフリップ・フロップ機構が働いていると考えられているが、脂質の移行メカニズムや活性調節機構などの詳細な分子機構は明らかになっていない。本研究では、研究代表者がこれまでに行ってきた形質膜におけるホスファチジルセリンの動態に異常がある培養細

胞変異株の解析結果を足掛かりにして、フリップ・フロップ機構に関わる分子の同定および機能解析を行うことにより、フリップ・フロップの制御機構や細胞機能との関連を解明することを目的とする。

まず、研究代表者がこれまでに同定した責任因子であるアダプター蛋白質と結合する蛋白質の中から、脂質動態に作用する分子を探索することにより、フリップ・フロップに携わる分子群を同定する。次に、人工膜を用いた再構成実験や細胞での発現制御実験などを行って、脂質移行の詳細なメカニズムを解析する。変異株の責任因子であるアダプター蛋白質はATPase活性を持たず、膜蛋白質でもないが、標的蛋白質に結合してその活性を調節したり、局在を変化させたりすることが知られている。したがって、脂質分子に直接作用して膜内移行させる酵素が別に存在し、アダプター蛋白質はその活性調節を行っているものと考えられる。これまでに、フリップ・フロップ活性を制御する分子は全く報告されておらず、またこのアダプター蛋白質がフリップ・フロップに関与するという報告も無い。本研究では、フリップ・フロップのメカニズムをその調節機構も含めて明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

### ① 形質膜におけるホスファチジルセリンの動態に関与するアダプター蛋白質アイソフォームの同定

研究代表者が同定したアダプター蛋白質について、哺乳動物細胞では7種類のアイソフォームが存在することが報告されている。研究代表者が解析してきたフリップ・フロップ欠損変異株では、そのうちの1種類だけがほぼ完全に発現抑制されている。そこで、他のアイソフォームが脂質動態に関与しているかどうかを以下の方法により解析する。親株CHO-K1での各アイソフォームの発現をRNAi法により抑制し、ホスファチジルセリン低感受性や蛍光標識ホスファチジルセリンの取り込みの遅れなど、変異株で見られるような異常形質が再現されるかどうか検討する。

### ② アダプター蛋白質のパートナーの同定

このアダプター蛋白質はATPase活性を持たず、膜蛋白質でもないが、標的蛋白質に結合してその活性を調節することが知られている。したがって、フリップ・フロップにおいてアダプター蛋白質は制御因子として働い

ており、何らかの膜蛋白質がそのパートナーであると考えられる。そこで、FLAG タグを付加したリコンビナントアダプター蛋白質を細胞に発現させ、以下の2種類の免疫沈降実験を行うことにより、パートナーの同定を試みる。

1つ目は、フリップ・フロップへの関与が示唆されているP型ATPaseタイプ4やCDC50/ROS3などについて免疫沈降実験を行い、アダプター蛋白質と結合するかどうかを検討する。2つ目は、アダプター蛋白質とともに免疫沈降される蛋白質を網羅的に探索する。その際、前項で解析した、脂質動態に関与しないアイソフォームとの免疫沈降物をネガティブコントロールとする。得られた結果の中から膜蛋白質をピックアップし、RNAi実験などにより脂質動態との相関を解析する。

### ③ フリップ・フロップ機構に関与するシグナル伝達経路の探索

ホスファチジルセリンとの結合が報告されている、あるいはアダプター蛋白質との相互作用が報告されているシグナル伝達分子がいくつか存在する。そこで、それらの分子について、親株とフリップ・フロップ欠損変異株とで発現量・リン酸化量・細胞内局在などをウェスタンブロットリングや細胞染色により解析する。

また、一般的にシグナル伝達には蛋白質のリン酸化・脱リン酸化が大きな役割を占めていることが知られている。そこで、親株と変異株とでリン酸化蛋白質の発現量を網羅的に解析する。

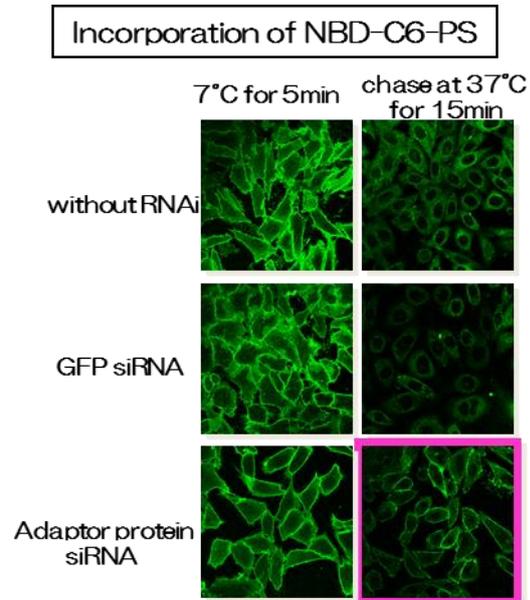
さらに、フリップ・フロップ欠損変異株では、形質膜における脂質動態異常のほかに細胞骨格の異常も観察されており、これらの異常形質が互いに相関しているかどうかを検討する。

## 4. 研究成果

### ① 形質膜におけるホスファチジルセリンの動態に関与するアダプター蛋白質アイソフォームの同定

アイソフォーム7種類についてそれぞれ2本ずつsiRNAを作製した。CHO-K1細胞でRNAiを行ってmRNAの発現量を確認したところ、いずれのsiRNAも各アイソフォームの発現を特異的に抑制していることが確認できた。そこで次に、RNAiを行ったCHO-K1細胞で、ホスファチジルセリンに対する感受性の測定

や蛍光標識ホスファチジルセリンの細胞内移行の観察を行った。その結果、一部のsiRNA処理では、感受性の低下や移行の遅延が引き起こされた。これらの結果から、アダプター蛋白質のアイソフォームのうちのいくつかは、形質膜におけるホスファチジルセリンの移行に関与している可能性が示唆された。



### ② アダプター蛋白質のパートナーの同定

FLAG タグを付加したアダプター蛋白質と、ATP8A1やCDC50/ROS3などをCHO-K1細胞に共発現させて、抗FLAG抗体で免疫沈降実験を行ったが、アダプター蛋白質との共沈は起こらなかった。また、FLAGタグを付加したアダプター蛋白質のみを発現させて、免疫沈降実験を行い、共沈してきた蛋白質をマス解析により同定したが、得られたのはアダプター蛋白質のホモダイマーあるいはヘテロダイマーのみだった。さらに、内在性のアダプター蛋白質について免疫沈降実験を試みたが、抗体の性能が不十分で成功しなかった。現在までのところ、パートナー蛋白質の同定には至っていない。それは、免疫沈降実験で膜蛋白質を得ようとする技術的な難しさにも原因があると思われる。今後、クロスリンク法などの他の手法も検討し、パートナーの同定を行っていきたいと考えている。

### ③ フリップ・フロップ機構に関与するシグナル伝達経路の探索

これまでにホスファチジルセリンとの結合が報告されている、あるいは脂質とのコミュニケーションが想定されるシグナル伝達分子として、SGK1, Raf, Aktなどが挙げられる。これらについて、リアルタイムPCRによる遺伝子発現・ウェスタンブロッティングによる蛋白質発現やリン酸化・細胞染色による細胞内局在を、親株とフリップ・フロップ欠損変異株とで比較したが、有意な差は認められなかった。

また、抗リン酸化チロシン・抗リン酸化セリン・抗リン酸化スレオニンの抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、両細胞株でのリン酸化蛋白質の発現を比較したが、やはり有意な差は認められなかった。

ところで、これまでに行った性状解析から、フリップ・フロップ欠損変異株では細胞骨格が親株とは異なることが明らかとなっている。そこで、細胞骨格と脂質動態とに相関があるかどうかを検討した。細胞骨格に作用する阻害剤や安定化剤などの試薬で親株を処理し、蛍光標識ホスファチジルセリンの形質膜における動態を観察したところ、阻害剤処理により蛍光標識ホスファチジルセリンの取り込みの遅れがみとめられた。これらの結果から、細胞骨格の構築が、形質膜におけるホスファチジルセリンの膜間移行に関与している可能性が示唆された。

今後の課題は、アダプター蛋白質の役割・形質膜における脂質動態・細胞骨格の構築という三者がどのように相関しているのかについて、分子レベルで解明することである。

## 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0件)

[学会発表] (計2件)

1. Akiko Yamaji-Hasegawa, Akira Hattori, Masafumi Tsujimoto, Toshihide Kobayashi  
“14-3-3 regulates the transbilayer movement of phosphatidylserine by altering actin assembly”

RIKEN symposium “Lipid-protein interaction. From molecules to cells” (招待講演) 2013年5月24日、理化学研究所 (埼玉)

## 2. 山路顕子

「細胞形質膜の内外層非対称性を制御するフリップ・フロップ機構」  
理研シンポジウム「第3回 生体分子の分

離・解析法の進展 膜タンパク質への応用」  
(招待講演) 2011年10月28日、理化学研究所 (埼玉)

[図書] (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 顕子 (山路顕子) (HASEGAWA AKIKO)  
独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員  
研究者番号: 20332314

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者