

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460375

研究課題名(和文)細胞膜コレステロールによる Eat me シグナル抑制機構の解明

研究課題名(英文)An inhibitory effect of cholesterol on expressing eat me signals in human erythrocyte membrane

研究代表者

高桑 雄一 (Takakuwa, Yuichi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：40113740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト赤血球膜を構成する脂質二重層の内層と外層ではリン脂質が非対称性に分布しており、特にフォスファチジルセリン(PS)が内層のみに分布することは他の細胞と同様に大変重要である。その内層分布を維持・破綻させる機構には、それぞれフリッパーゼ・スクランブラーゼが関与するとされていたが、分子実態さえ不明であった。本研究は、フリッパーゼおよびスクランブラーゼ両者の責任分子を同定するとともに、従来説とは異なり、フリッパーゼの働きよりも、他の細胞膜より顕著に多く存在するコレステロールによりスクランブラーゼの働きが抑制されていることがPSの内層分布維持に必須であることを示した。

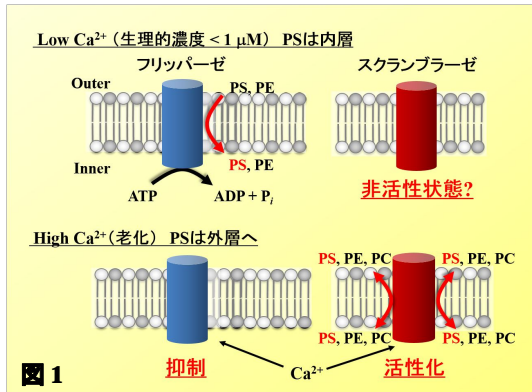
研究成果の概要(英文)：In the lipid bilayer of human erythrocyte membranes, asymmetric distribution of phospholipids, especially phosphatidylserine in the inner leaflet, is essential for erythrocyte function and survival as well as in other cells. Although, reputedly, flippase and scramblase are required for the maintenance and disruption of the lipid asymmetry, respectively, responsible molecules and their mechanisms are unclear. This study identified ATP11C as a major flippase and PLSCR1 as a major scramblase and demonstrated an inhibitory effect on PLSCR1-dependent scramblase activity as a novel function of cholesterol which exhibits abundantly in erythrocyte membranes. This finding certified that, contrary to the generally accepted theory, cholesterol inhibition of scrambling activity rather than flipping activity driven by ATP11C contributes to maintaining asymmetric distribution of phospholipids.

研究分野：生化学

キーワード：リン脂質非対称性 フォスファチジルセリン Eat me signal ヒト赤血球膜 コレステロール スクランブラーゼ フリッパーゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞膜二重層の外層および内層に分布するリン脂質の非対称性が破綻することは細胞を死に至らしめる。特に、普段は内層に維持されているフォスファチジルセリン (PS) の外層移行がマクロファージに対する「Eat me シグナル」となる (図 1)。



リン脂質の非対称性の破綻にはスクランブラーゼの関与が考えられているが、分子実態および制御機構についてはほとんど明らかにされていない。申請者はこれまで、ヒト赤血球膜に大量に存在するコレステロールが非対称性の破綻を抑制することを見出しており、さらに phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) が破綻の責任分子 (スクランブラーゼの候補分子) であることを示唆する結果を得ている。

2. 研究の目的

本研究課題では、まず (1) ヒト赤血球膜におけるリン脂質非対称性破綻の責任分子が PLSCR1 であることを、コレステロールの抑制作用の観点から確定させ、続いて PLSCR1 のリン脂質スクランプリング機構を、(2-1)「膜一回貫通タンパク質 PLSCR1 は多量体を形成することによりリン脂質の輸送を可能にする」との仮説と、(2-2)「膜貫通部分の中央にある親水性アミノ酸残基がリン脂質の輸送に必須である」との仮説を検証することで明らかにした上で、PLSCR1 の機能制御におけるコレステロールの役割を検討し、最終的に、コレステロールが「Eat me シグナル」を制御する機構に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MBP 融合リコンビナントタンパク質として大腸菌で調製した全長ヒト PLSCR1、および PLSCR1 の膜貫通領域のみのペプチドを、コレステロール存在、あるいは非存在リポソームに再構成し、蛍光標識リン脂質 (NBD-PS 等) を用いて、内層にどのくらい輸送されたかを蛍光光度計により測定し、輸送速度 (スクランプリング活性) を算出した。(2-1) 赤血球膜から天然状態で膜タンパク質を採集し、天然状態で分子量分析が可能な Blue-Native PAGE を一次元目、次いでその

ゲル内でタンパク質を変性状態にしたのち、SDS-PAGE を二次元目とした、二次元電気泳動を行い、膜上での分子量を推定した。

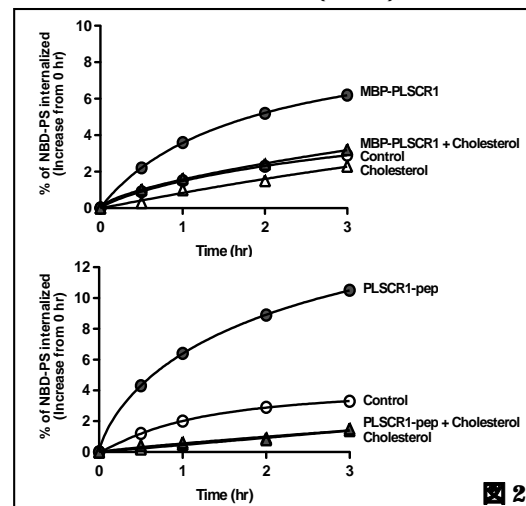
(2-2) (1) で使用した膜貫通部分ペプチド中央部の親水性アミノ酸残基 (アスパラギン酸) を疎水性アミノ酸 (ロイシン) に置換したペプチドを作製し、(1) と同様にリポソームへ再構成後、種々の蛍光標識リン脂質を用いて輸送速度を測定した。

(3) 計画にはなかったが、PS を外層から内層に能動的に輸送し、リン脂質の非対称性を維持するために重要とされるフリッパーゼに異常のある患者を解析する機会を得た (本学ヒト遺伝子研究倫理委員会承認 #223D)。この患者の赤血球について PS の表在化 (非対称性の破綻) を、PS と特異的に結合する蛍光標識 Annexin V を加えてフローサイトメトリーにより解析し、生理的な非対称性の維持・破綻に関して分子レベルの情報を得た。

4. 研究成果

(1) 他の細胞に比べ、赤血球膜に非常に多く含まれるコレステロールを除去すると、生理的な (低い) Ca^{2+} 濃度においても通常では起こらないリン脂質スクランプリングが起こり、リン脂質の非対称性が破綻する (PS が外層に露出すること) をこれまでに示していた。この結果は、コレステロールにスクランプリング活性を抑制する作用があることを表している。

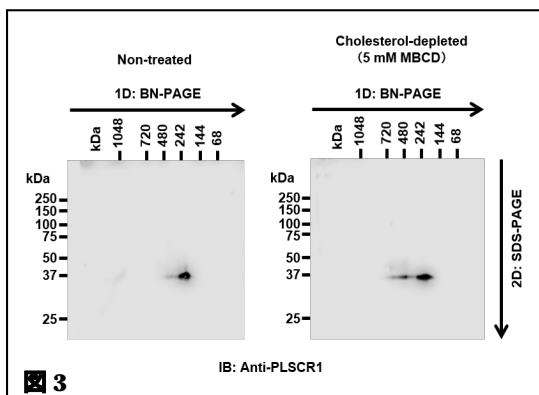
そこで、申請者が赤血球膜のスクランブラーゼとして注目している PLSCR1 についても、コレステロールによる抑制作用が働くかを解析することとした。大腸菌で調製した全長 PLSCR1 (MBP-PLSCR1) と膜貫通領域のみの部分ペプチド (PLSCR1-pep) をそれぞれリン脂質のみのリポソームに再構成し、蛍光標識された PS (NBD-PS) の内層への輸送を指標にスクランプリング活性を測定したところ、何も再構成していないリポソーム (Control) に比べて明らかなスクランプリング活性が認められた (図 2)。



一方、コレステロールを含んだリポソームにこれらを再構成した場合 (MBP-PLSCR1

+ Cholesterol, PLSCR1-pep + Cholesterol) スクラミング活性は、ベースレベルまで低下した。これらの結果から、PLSCR1 はスクラミング活性を持ち、それはコレステロールによって抑制されることが示され、赤血球膜のスクラミング活性もまたコレステロールで抑制されることと合わせて、PLSCR1 が赤血球膜におけるスクランパーゼであると考えられた。また、PLSCR1 の膜貫通部分のみでリン脂質をスクラミングすることが可能であることも示された。

(2-1) では、膜 1 回貫通型タンパク質 PLSCR1 のリン脂質スクラミングのメカニズムとは如何なるものであろうか？申請者は、他の親水性物質の輸送体は必ず複数回膜貫通部位を持ち、その物質の通過孔を形成していることから、PLSCR1 分子が複数個集まって多量体を形成し、リン脂質の親水性部分(極性頭部；図 1 の膜を構成するリン脂質の 部分)を通過させていると仮説を立てた。赤血球膜から天然状態でタンパク質を取り出し、二次元電気泳動を行った後、最終的にウエスタンブロット (IB) で PLSCR1 を検出し、PLSCR1 の赤血球膜上での存在様式(分子量)を検討した(図 3)。PLSCR1 は分子量 35,000 (35 kDa) である。

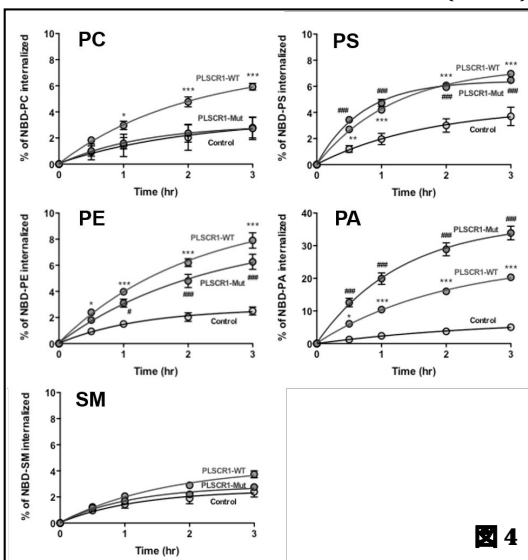


通常赤血球 (Non-treated ; コレステロールが存在する状態) から取り出した PLSCR1 は、変性状態であれば 35 kDa にシグナルが観察されるが、天然状態では 180 ~ 280 kDa に主要なスポットとしてシグナルが観察され、5 ~ 8 個の PLSCR1 が集まって多量体を形成しているものと推測された。同様の実験を、(1) で使用したリコンビナントタンパク質 MBP-PLSCR1 に対しても行ったが、やはり 5 ~ 8 量体を表す分子量の位置にシグナルが観察された。これらの結果から、事前に立てた仮説が支持された。

コレステロールが多量体を形成した PLSCR1 によるスクラミングを抑制するメカニズムとして、コレステロールが i) PLSCR1 の存在様式を変化させる(多量体が作られない、あるいは過剰に集まってしまい輸送が不可能になる) ii) 直接結合して通過孔を塞ぐ、ことが考えられた。そこで、コレステロールを除去した赤血球においても存在様式(分子量)を解析したところ

(Cholesterol-depleted ; 赤血球においてスクラミングが活性化している条件) ほぼ同様の結果が得られたことから、存在様式が変化するのではなく、おそらく直接結合することにより抑制効果を発揮しているものと推察できた。

(2-2) PLSCR1 がリン脂質の親水性頭部を通過させるメカニズムについて、更に膜貫通部位中央の親水性部位に注目し、「膜貫通部分の中央にある親水性アミノ酸残基がリン脂質の輸送に必須である」と仮説を立て検証を行った。リン脂質のスクラミングには輸送基質の特異性はないと考えられているため、まずは PLSCR1 の膜貫通部分のみのペプチド (PLSCR1-WT) をリポソームに再構成し、種々のリン脂質 (グリセロリン脂質 : フォスファチジルコリン (PC)、フォスファチジルセリン (PS)、フォスファチジルエタノールアミン (PE)、フォスファチジン酸 (PA)、スフィンゴリン脂質 : スフィンゴミエリン (SM)) のスクラミング活性(輸送速度)を測定した。SM 以外にはスクラミング活性が認められ、グリセロール骨格をもつリン脂質 (グリセロリン脂質) のみを選択的に輸送していると考えられた (図 4)。



また、試験した 4 種のグリセロリン脂質のなかでも輸送速度は PA が圧倒的に速く、極性頭部に対する親和性が異なる可能性が示唆され、従来説とは異なる知見が得られた。中央部の親水性アミノ酸残基(アスパラギン酸)を疎水性アミノ酸残基(ロイシン)に置換したペプチド (PLSCR1-Mut) をリポソームに再構成し、同様の解析を行ったところ、SM だけではなく PC にも輸送活性が認められなかった (図 4)。一方、残り 3 種のリン脂質は WT とほぼ同様の輸送速度であったことから、中央部の親水性アミノ酸残基は PC を輸送するために必須であると考えられた。

(3) リン脂質の非対称性の維持・破綻に寄与するもう一つの分子、フリッパーゼの異常患者を解析する機会を申請期間中に得ることができ、赤血球膜における主要フリッパーゼとして ATP11C を同定し、その異常は遺伝

性溶血性貧血の原因となることを新規に見出したことを報告した (Arashiki *et al*, *Haematologica* 2016)。フリッパーゼは PS の内層維持に非常に重要であるとの通説であったが、この患者赤血球 (Patient) のフリッパーゼ活性は 90%低下しているにもかかわらず、予想に反して全体の赤血球 (Total) では PS の表在化はほとんど正常赤血球 (Control) と同程度であった (図 5; 数値は PS が表在化した細胞の割合)。

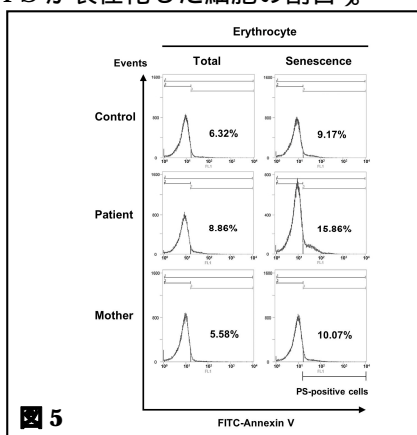


図 5

一方、老化赤血球 (Senescence) を分画すると、スクランブラーゼが活性化されどの赤血球も PS 表在化細胞は増えているが、患者赤血球ではより増加しており、老化の最終盤では、非対称性の維持にはやはりフリッパーゼ活性も少なからず必要で、早期の PS 表在化により溶血性貧血が発現すると考えられた。本患者から得られた最も重要なことは、通常ではフリッパーゼ活性はほとんど必要ないくらいにスクランプリング活性が抑制されているということである。つまり、本申請課題により明らかになったコレステロールによるスクランプリング活性の抑制が、赤血球が生きるために不可欠であると結論づけることができた。

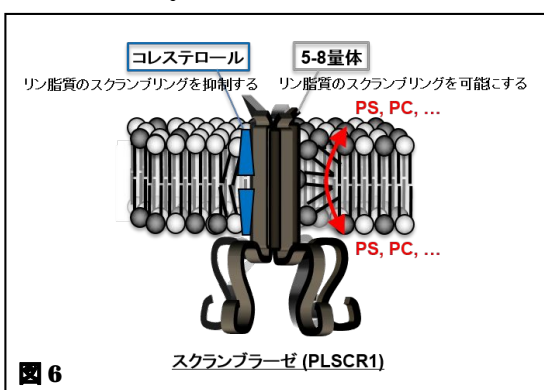


図 6

以上をまとめると、ヒト赤血球膜のスクランブラーゼは PLSCR1 であり、多量体を形成し、膜貫通部位の中央部に比較的親水性の部位を持つことで、非選択的な (種類を選ばない) リン脂質スクランプリングを可能にしている。そして、コレステロールは、低い Ca^{2+} 濃度において PS を表在化させないために、PLSCR1 とおそらく直接結合してスクランプリングを抑制し、赤血球膜のリン脂質非

対称性の破綻を防ぐことで早期の溶血から守り、赤血球の寿命を全うさせる役割を担っていると考えられた (図 6)。

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 2 件)

Nobuto Arashiki, Yuichi Takakuwa, Narla Mohandas, John Hale, Kenichi Yoshida, Hiromi Ogura, Taiju Utsugisawa, Shouichi Ohga, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Seiji Kojima, Hitoshi Kanno: ATP11C is major flippase in human erythrocytes and its defect causes congenital hemolytic anemia. *Haematologica*, March 2016 [Epub ahead of print] doi:10.3324/haematol.2016.142273. 査読有

高桑 雄一、新敷 信人、斎藤 将樹: ヒト赤血球の寿命を規定するメカニズム [Senescence mechanism of human erythrocyte] *臨床血液* 2014 第 55 巻第 6 号 ; 643-650 査読有 <http://doi.org/10.11406/rinketsu.55.643>.

[学会発表] (計 11 件)

Arashiki Nobuto, Takakuwa Yuichi, Kanno Hitoshi: ATP11C Encodes a Major Flippase in Human Erythrocyte and Its Genetic Defect Causes Congenital Non-Spherocytic Hemolytic Anemia. 57th Annual Meeting and Exposition of American Society of Hematology, Orland, FL, USA, 2015/12/06 査読有

新敷信人、高桑雄一: ヒト赤血球膜におけるスクランブラーゼ PLSCR1 のリン脂質輸送メカニズム. 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2015/12/01

Yuichi Takakuwa, Nobuto Arashiki, Ichiro Koshino: Maintenance, Regulation, and Disorder of Asymmetric Distribution of Phospholipids in the Bilayer of Human Erythrocyte Membrane. Gordon Research Conference, Red Cells, Holderness, NH, USA, 2015/07/02 招待講演

Nobuto Arashiki, Yuichi Takakuwa: New insight into the regulatory mechanism of membrane lipid scrambling in human erythrocyte: Inhibitory effect of cholesterol on PLSCR1-mediated phospholipid scrambling. Gordon Research Conference, Red Cells,

Holderness, NH, USA, 2015/06/29 査読有

新敷信人, 高桑雄一: ヒト赤血球膜におけるリン脂質スクランプリングのコレステロールによる抑制機構. 第 57 回日本脂質生化学会, 一橋大学 (東京都千代田区), 2015/05/28

新敷信人, 高桑雄一: 赤血球膜におけるリン脂質スクランブラーゼ PLSCR1 の多量体形成. 日本膜学会第 37 年会, 早稲田大学 (東京都新宿区), 2015/05/15

TAKAKUWA Yuichi: Senescence mechanism of human erythrocytes. The 78th annual meeting of the Japanese Society of Hematology, Sapporo, Japan, 2013/10/11 招待講演

Saito Masaki: Cholesterol inhibition of phospholipid scrambling in human erythrocyte membranes through its suppression of PLSCR1 activity. 2013 Red cell club meeting, New York, NY, USA, 2013/10/04

齋藤将樹, 萬野純恵, 高桑雄一: Phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) を介したリン脂質の scrambling 機構の検討. 第 86 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2013/09/13

齋藤将樹, 萬野純恵, 高桑雄一: Phospholipid scramblase 1 を介するリン脂質 scrambling におけるヒト赤血球膜コレステロールの抑制効果の検討. 第 55 回日本脂質生化学会, 松島大観荘 (宮城県宮城郡), 2013/06/07

高桑雄一: 生体膜の本質に迫る. 日本膜学会第 35 年会, 早稲田大学 (東京都新宿区), 2013/05/20 招待講演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高桑 雄一 (TAKAKUWA, Yuichi)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40113740

(2) 研究分担者

萬野 純恵 (MANNO, Sumie)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10101205

齋藤 将樹 (SAITO, Masaki)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50400271

越野 一郎 (KOSHINO, Ichiro)

東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80328377

田中 正太郎 (TANAKA, Shotaro)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90380667

新敷 信人 (ARASHIKI, Nobuto)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80569658

(4) 研究協力者

Narla Mohandas
Red Cell Physiology Laboratory, New York Blood Center