

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学
と先端的基盤技術」

研究課題

「細胞膜におけるリン脂質の非対称分布とその崩壊」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者:長田重一

(大阪大学免疫学フロンティア研究センター
一、寄附研究部門教授)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

内膜と外膜2層から成り立つ細胞膜の構成成分、リン脂質は、内膜と外膜で非対称的に分布されている。すなわち、フォスファチジルコリンやスフィンゴミエリンは主に外膜に、フォスファチジルセリン (PtdSer) やフォスファチジルエタノールアミンはそのほとんどが内膜に局在する。このリン脂質の非対称性は種々のプロセスで崩壊する。すなわち、細胞がアポトーシスに陥ると PtdSer が細胞表面に暴露され、これが貪食細胞に対して“eat me” シグナルとして作用する。私達はアポトーシス時に PtdSer が暴露される機構を解析している過程で、ATP11C と CDC50A 複合体がフリッパーゼとしてリン脂質の非対称性分布に関与していること、TMEM16F 及び Xkr8 がスクランブラーゼとして非対称性の崩壊に関与していることを見出した。TMEM16F は Ca^{2+} によって、Xkr8 はカスパーゼによって活性化されるスクランブラーゼである。そこで本研究はこれら分子 (ATP11C・CDC50A、TMEM16F、Xkr8) による細胞膜の非対称性維持の分子機構、それを崩壊させる分子機構を明らかにしようとするものである。

長田グループは ATP11C・CDC50A 複合体、TMEM16F、Xkr8 の生化学的解析を担当し、まづ CDC50A に Error-Prone PCR 法を用いて無作為的に変異を導入、CDC50A は ATP11C の小胞体 (ER) から細胞膜への移行に必須であるとともに、フリッパーゼのサブユニットとして ATPase 活性に必要であることを示した。また TMEM16F はホモ二量体として存在し、この分子の膜貫通領域に存在する5個の Glu、Asp 残基を介して Ca^{2+} が直接 TMEM16F に結合し、そのコンフォメーション変化を誘導、スクランブラーゼ活性を発揮することを見出した。ついで、スクランブラーゼ活性を持つ TMEM16 family のアミノ酸配列の比較、変異体の作成から、リン脂質の移送に際して、III、IV、V 番目の膜貫通領域に存在する親水性アミノ酸がリン脂質頭部に対する“Stepping Stone”として機能していることを示した。一方、アポトーシス時、カスパーゼによる切断によって活性化される Xkr8 スクランブラーゼは Basigin (Bsg)、Neuroplastin (Npt) とヘテロ二量体を形成すること、これらの分子は Xkr8 を小胞体から細胞膜へ局在させるのに必須であることを示した。さらに Xkr8 はある種の細胞ではリン酸化によっても活性化されることを見出した。PtdSer の細胞表面への曝露はアポトーシス時ばかりでなく、活性化されたリンパ球やマスト細胞、がん化した細胞などで認められており、これらの細胞、過程で Xkr8 がリン酸化、活性化される可能性がある。

一方、阿部グループは ATP11C の構造解析によって、リン脂質転移反応の分子機構解明を目指した。このために、ヒト培養細胞を用いた大量発現系を構築した。そして、結晶の最適化を達成する為、脂質存在下での結晶化、変異導入や輸送基質およびリン酸アナログによるコンフォメーションの固定化等の検討を経て、原子分解能の構造を得ている。長田グループとは、ATP11C に導入した変異がタンパク質の安定性や ATPase 活性へ与える影響などに関して綿密な情報交換を行い、発現プラスミドや発現細胞を共有して研究を進めた。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. スクランブラーゼ Xkr8 のサブユニット構造とリン酸化による活性化

概要: スクランブラーゼ Xkr8 が Ig-superfamily に属する膜蛋白質 Basigin あるいは Neuroplastin と 1:1 の複合体を形成していること、アポトーシス時、Xkr8 の C-末端部位がカスパーゼによって切断され、Xkr8/Basigin は多量体化 (2:2 の複合体) することを見出した。さらに、リン酸化によって Xkr8 スクランブラーゼが活性化されることを見出し、Xkr8 の C-末端に3カ所のリン酸化部位を同定した。

2. TMEM16 分子の Ca^{2+} 結合部位、スクランブリングドメインの同定

概要: TMEM16 family 蛋白質はホモ二量体として存在すること、 Ca^{2+} の結合によりこの二量体が安定化することを見出した。ついで TMEM16K の細胞質、膜貫通領域に存在する酸性アミノ酸に網羅的に点変異を導入、それらの熱安定性を検討することにより5箇所の Ca^{2+} 結合部位を同定した。一方、スクランブラーゼ活性を持つ TMEM16 members の膜貫通領域には数個の親水性アミノ酸残基が存在する。これらの親水性アミノ酸がリン脂質頭部のための"stepping stone"として作用することを示した。

3. CDC50A の ATP11C のフリッパーゼ活性への関与

概要: ATP11C は CDC50A と複合体を形成しているが CDC50A は ATP11C の細胞膜への局在に必須である。今回 CDC50A の変異体の解析から、この分子は ATP11C の活性にも寄与していることを見出した。P 型 ATPase に属し、胃酸分泌に中心的な役割を担う胃プロトンポンプ (H^+ , K^+ -ATPase; ATP4a) も type II 膜タンパク質をサブユニットとして持つ。 H^+ , K^+ -ATPase の構造を決定し、胃の内部を強酸性にするための分子機構を解明した。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. スクランブラーゼ TMEM16F の作用機構モデルの提唱

概要: TMEM16F を介した PtdSer の細胞表面への暴露は血小板によるトロンビンの活性化、骨のミネラル化などに関与している。この分子の活性部位を同定し、活性部位に存在する親水性アミノ酸がリン脂質頭部の "stepping stone"として作用することを見出したことは、TMEM16F の活性を人工的に制御することによって、血液凝固反応や骨のミネラル化などをコントロールできる可能性を示唆している。

2. Xkr8 のサブユニット構造とリン酸化による活性化

概要: Basigin (Bsg) はマラリア原虫の受容体、アミノ酸トランスポーターのサブユニットとしてがん化への関与が指摘され、Bsg に対する抗体がマラリアの阻害剤、抗がん剤として開発されようとしている。今回の私たちの結果はこれら阻害剤が Xkr8 スクランブラーゼ活性も抑制、自己免疫疾患を誘導する可能性を指摘している。一方、PtdSer はがん細胞、活性化されたリンパ球、マスト細胞でも暴露されることから Xkr8 をリン酸化するキナーゼが同定できれば、その阻害剤は自己免疫疾患、アレルギーなどの制御に用いられるであろう。

3. ATP4a, 胃プロトンポンプの構造解析

概要: 胃潰瘍などの治療薬として臨床で用いられている薬剤 (vonoprazan) と、細胞毒性の為に薬剤としては利用されていない特異的阻害剤 (SCH28080) の結合状態が明らかになった。この構造情報は、現行の薬剤の改良、および新規薬剤の論理的な設計にとって有用であり、創薬への利用が期待される。

< 代表的な論文 >

- Suzuki, J., Imanishi, E. and Nagata, S.: The Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113: 9509-9514, 2016
- Sakuragi, T., Kosako, H. and Nagata, S.: Phosphorylation-mediated activation of mouse Xkr8 scramblase for phosphatidylserine exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116: 2907-2912, 2019
- Abe, K., Irie, K., Nakanishi, H., Suzuki, H. and Fujiyoshi, Y.: Crystal structures of the gastric proton pump. *Nature*, 556: 214-218, 2018

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「長田」グループ

研究代表者:長田重一(大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門教授)

研究項目:細胞膜におけるリン脂質の非対称分布とその崩壊

② 「阿部」グループ

主たる共同研究者:阿部一啓(名古屋大学・細胞生理学研究センター・准教授)

研究項目:フリッパーゼ ATP11C の構造解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

東京大学大学院 工学研究科・野地研究室・渡邊力也講師のグループと TMEM16F の一分子でのスクランブラーゼ活性の測定に成功した。

マウス Xkr8 がリン酸化によって活性化されることを見出したことから、徳島大学・先端酵素学研究所・藤井節郎記念医科学センター・小迫秀尊教授にリン酸化部位の決定を依頼、迅速にリン酸化部位が同定された。その後 ATP11C フリッパーゼもリン酸化されていることが判明、小迫教授との共同研究は継続している。