

研究題目 細胞膜におけるリン脂質の非対称分布とその崩壊

研究組織

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）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：瀬川勝盛（大阪大学・免疫学フロンティア研究センター）

櫻木崇晴（大阪大学・免疫学フロンティア研究センター）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

動物の細胞膜は脂質二重層から成り立っているが、それを構成するリン脂質は外膜と内膜で非対称的に分布している。この非対称的分布は、アポトーシスを起こした細胞や、活性化された血小板等においては崩壊する。私達は最近、細胞膜の非対称性の維持、崩壊に関与する3個の膜タンパク質を世界に先駆けて同定した。本研究はこれら分子の構造、作用機構を明らかにすることを目的としている。

[1-2]研究の方法・経過

私たちはこれまでに膜タンパク質 TMEM16F を Ca^{2+} によって活性化されるスクランブラーゼ、Xkr8 をアポトーシス時にカスパーゼによって活性化されるスクランブラーゼとして同定するとともに(Suzuki et al. Nature 2010, Science 2013)、P4-ATPase である ATP11A, ATP11C を細胞膜上で作用するフリッパーゼとして同定した(Segawa et al. Science 2014)。一方、マウス Ba/F3 細胞でマウス Xkr8 を発現させると低温でカスパーゼ刺激によらない構成的な活性化が認められる。この活性化はキナーゼの阻害剤で抑制され、フォスファターゼの阻害剤で活性化されることから、Xkr8 のスクランブラーゼ活性はリン酸化によって制御される可能性が考えられた。

そこで、本共同研究において Xkr8 のリン酸化部位を同定、リン酸化されない変異体、リン酸化を mimic する変異体を作成し、実際にこの

タンパク質がリン酸化により活性化されるかどうか検討する。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

Flag-が付加されたマウス Xkr8 を発現する Ba/F3 を phosphatase の阻害分子 Caliculin A で処理すると Xkr8 によるリン脂質スクランブラーゼ活性が増加することから、Caliculin A で処理した細胞より抗 Flag 抗体を用いて Xkr8 を精製、LC-MS/MS 法を用いてそのリン酸化部位を決定した。その結果、マウス Xkr8 はその C-末端部位3カ所の残基(Thr-356、Ser-361、Thr-375)でリン酸化されることを見出した。実際、これらの残基を Ala に置換した変異体はスクランブラーゼ活性を失った。一方、これらの3個のアミノ酸を Asp に置換した変異体は構成的な強いスクランブラーゼ活性を持つ、その活性はキナーゼ阻害剤で抑制されなかった。以上より、Xkr8 はカスパーゼによる切断ばかりでなく、キナーゼによるリン酸化によっても活性化されると結論した。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本来、細胞膜の内側に局在しているフォスファチジルセリン(PtdSer)はアポトーシスばかりでなく、筋肉細胞の融合過程、活性化されたマスト細胞、活性化したリンパ球、老化した赤血球、授精能を獲得した精子頭部など様々な過程で暴露される。今回、Xkr8 スクランブラーゼがキナーゼによって活性化されることは私たちが同定した Xkr や TMEM16 スクランブラーゼがこれらの

PtdSer 暴露の過程に関与している可能性を示唆しており、今後の発展が期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

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

[3-2]学会発表

櫻木崇晴、小迫英尊、長田重一（令和元年9月18日）リン酸化依存的マウス Xkr8 スクランブラーゼ活性化によるフォスファチジルセリン露出 第92回日本生化学会大会 口頭発表 パシフィコ横浜 横浜

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

9個の Xkr ファミリーに属するメンバーのうち Xkr4, Xkr8, Xkr9 がカスパーゼ依存的スクランブラーゼとして作用する。今回 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他のメンバーにもリン酸化によってスクランブラーゼ活性を持つものが存在しないかどうか検討する必要があるだろう。さらにフォスファチジルセリンの暴露にはスクランブラーゼの活性化ばかりでなくフリッパーゼの不活化も必須であることから、ATP11A および ATP11C がリン酸化によって制御されるかどうか検討する。このように本共同研究の成果は細胞膜リン脂質の分布がスクランブラーゼやフリッパーゼのリン酸化によって制御されるという新しい概念へと導くであろう。