

## 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崩壊する。私達は細胞膜の非対称性の維持、崩壊に関与する3種の膜タンパク質(TMEM16F, XKR8, ATP11C)を世界に先駆けて同定した (Suzuki et al. Nature 2010; Suzuki et al. Science 2013; Segawa et al. Science 2014)。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

本年度はX線格子解析やCryo-EM単粒子解析によるヒトXKR8の構造解析を行なった。さらに、最近、東北大学小児科のグループとの共同でATP11Aタンパク質に点変異を持つ重度心身障害の患者を同定したことから、この変異を持つノックインマウスを樹立するとともに、この変異タンパク質の蛋白化学的性質を解析した。

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

ヒトXKR8-Basigin複合体をカイコ Sf9-Baculovirus系を用いて大量に産生・精製し、その3次構造をX線解析、Cryo-EM単粒子解析により決定した (Sakuragi et al. Nat. Struct. Mol. Bio. 2021)。XKR8-Basigin複合体は新しいprotein-foldを持っていた。またその表面上部には数多くの疎水性の残基からなる溝 (crevasse) が存在し、そこに一分子のフォスファチジルコリン (PtdCho) が配置されていた。PtdChoの存在は本

共同研究で精製タンパク質標品の質量分析からも確認された。また、XKR8分子の中央部には8個の親水性アミノ酸が階段状に配置されており、それらの変異体の解析から、リン脂質の親水性頭部はこれらアミノ酸を“stepping stone”として通過すると考えられた。

一方、重度心身障害の患者さんで見出された点変異を持つATP11A遺伝子をマウス細胞に導入し、変異タンパク質が細胞膜上に存在することを本共同研究での質量分析で確認した。そして、この変異はATP11Aの基質特異性を変更させ、本来の基質であるフォスファチジルセリン (PtdSer) ばかりでなくPtdChoも細胞膜外層から内層へ移送することを見出した。そして内層へ移動したPtdChoはその発現が顕著に増加したスフィンゴミエリン合成酵素によりスフィンゴミエリンに変換され、細胞膜外層に蓄積していた。その結果、細胞はスフィンゴミエリン分解酵素などに対して顕著に脆弱になり、神経組織など種々の組織に障害を引き起こしていると考えられる。

#### [2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

スクランブラーゼやフリッパーゼは両親媒性を持つリン脂質を疎水性の脂質2重層からなる細胞膜上で反転させるトランスポーターであり、その分子機構はこれまで全く不明であった。今回、XKR8スクランブラーゼの表面にリン脂質の入り口と考えられる疎水性の残基からなる溝と分子内に親水性残基からなる洞窟が同定されたことは、スクランブラーゼによるリン脂質移層の分子機構解明の突破口となるであろう。

一方、重度心身の患者に見出された点変異がこのフリッパーゼ分子の基質特異性を変化させる事を見出したことはこの分子のリン脂質転移機構解明への手がかりを与えるばかりでなく、こ

の患者の治療法の開発に役立つことになった。

### 【3】主な発表論文等

#### [3-1]論文発表

1. Segawa, K., Kikuchi, A., Noji, T., Sugiura, Y., Hiraga, K., Suzuki, C., Haginoya, K., Kobayashi, Y., Matsunaga, M., Ochiai, Y., Yamada, K., Nishimura, T., Iwasawa, S., Shoji, W., Sugihara, F., Nishino, K., Kosako, H., Ikawa, M., Uchiyama, Y., Suematsu, M., Ishikita, H., Kure, S., and Nagata, S.: A sublethal ATP11A mutation associated with neurological deterioration causes aberrant phosphatidylcholine flipping in plasma membranes. **J. Clin. Invest.** 131: e148005 (2021)
2. Sakuragi, T., Kanai, R., Tsutsumi, A., Narita, H., Onishi, E., Nishino, K., Miyazaki, T., Baba, T., Kosako, H., Nakagawa, A., Kikkawa, M., Toyoshima, C., and Nagata, S.: The tertiary structure of the human Xkr8-Basigin complex that scrambles phospholipids at plasma membranes. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 28: 825-834 (2021)

#### [3-2]学会発表

櫻木崇晴, 金井隆太, 包明久, 成田宏隆, 大西映里子, 西野耕平, 宮崎拓也, 馬場威, 小迫英尊, 中川敦史, 吉川雅英, 豊島近, 長田重一, 細胞膜リン脂質スクランブラーゼであるヒト Xkr8-Basigin 複合体の立体構造 第44回日本分子生物学会年会、横浜、12月2日、2021

### 【4】今後の課題等

今回決定された XKR8 の構造はスクランブラーゼとしての活性を持たない前駆体の構造である。今後はカスパーゼやリン酸化によって活性化された蛋白質の構造を解析する必要があるだろう。この際、Cross-linking 法などにより、リン酸化やカスパーゼによる切断で起こる構造変化を確認する必要があるだろう。ところで XKR8 が属する XKR Family には神経有棘赤血球症の原因遺伝子である XK が存在する。最近私たちは細胞膜タンパク質である XK は VPS13A と呼ばれる細胞内での脂質トランスポーターと複合体を形成してスクランブラーゼ活性を持つ事を見出した (Ryoden et al. PNAS 2022)。XKR8 とよく似た構造を持つと考えられる XK がそのスクランブラーゼ活性に何故 VPS13A を必要とするか大きな課題である。