

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：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（フォスファチジルセリン「PtdSer」、フォスファチジルコリンなど）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。私達は細胞膜の非対称性の維持、崩壊に関与する3種類の膜タンパク質（フリッパーゼ；P4-ATPase：スクランブラーゼ；TMEM16FとXKR8）を世界に先駆けて同定した。本研究はこれら分子の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

XKR family に属する膜タンパク質(XKR4, XKR8 および XKR9)はアポトーシス時にカスパーゼによって活性化され、スクランブラーゼとして作用する (Suzuki et al. Science 2013, J.Biol. Chem. 2014)。一方、マウス Ba/F3 細胞でマウス XKR8 を発現させるとカスパーゼ刺激によらない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。実際、2019年度の本研究においてマウス XKR8 のC-末端領域に存在する3個の Threonine/Serine 残基がリン酸化されることを見出した。さらに2021年度はこの分子を大量生産、精製し、この分子には1個のリン脂質が結合していることを見出すとともに、その三次構造を決定した。一方、本来、XKR8 と同源性を持つ XKR9 を Ba/F3 細胞で発現させると XKR8 と同様に活性化され、その細胞は PtdSer を構成的に暴露した。そこで本

年度はマウス XKR9 のリン酸化部位を同定することを目的とした。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

Flag-が付加されたマウス XKR9 を発現する Ba/F3 を phosphatase の阻害分子で処理すると XKR9 によるリン脂質スクランブラーゼ活性が増加した。そこで、XKR9 の三次構造をもとに、マウス XKR9 タンパク質の細胞質側に存在する12個の Ser, Thr, Tyr 残基に変異を導入、Ba/F3 細胞でのスクランブラーゼ活性を測定した。その結果、2個の残基がリン酸化される可能性が指摘された。

[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二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。これまでに 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、本分子によるリン脂質移層の分子機構解明の突破口となった。さらにスクランブラーゼがリン酸化によっても制御されていることを示したことはこれらスクランブラーゼが別途生理的な PtdSer 暴露に関与している可能性を指摘しており興味深い。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. [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

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. 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
4. Nagata, S. and Sakuragi, T.: Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** in press, 2023

的のためには、これら分子をリン酸化するキナーゼの同定が必須であろう。

[3-2] 学会発表

1. 櫻木崇晴、小迫英尊、長田重一：「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** 横浜（令和元年 9 月 18 日）
2. 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、**口頭発表** 横浜（令和 3 年 12 月 2 日）
3. 櫻木崇晴、長田重一、「細胞膜リン脂質スクランブラーゼ XKR8-Basigin 複合体の構造解析」、第 95 回日本生化学会大会 **シンポジウム招待講演** 名古屋（令和 4 年 11 月 9 日）

【4】今後の課題等

XKR8 や XKR9 がアポトーシス時にカスパーゼによって切断、活性化されるばかりでなく、リン酸化によっても活性化されることが示された。今後はどのような生理条件下でこれら分子が活性化されるか示す必要があるが、その目