

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 や XKR9 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 や XKR9 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。2019 年度の本共同研究においてマウス XKR8 は C-末端領域の Serine/Threonine 残基がリン酸化されることを報告した(Sakuragi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2019)。今回、精製した XKR 8 を nanodisc に再構成し、その構造を CryoEM 単粒子解析法を用いて解析した。また、XKR9 の細胞質側に存在する Tyrosine/Threonine/ Serine 残基に変異を導入、リン酸化による活性化を引き起こす残基を同定した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

ナノディスクに組み込んだ XKR8 の構造を解

像度 3.7Å で解明した。その結果、XKR8 の底部、細胞質側には窪みが存在し、その窪みに C-末端部位が疎水結合、イオン結合などにより結合していた。この結合に関与しているアミノ酸に変異を導入すると XKR8 のスクランブラーゼ活性は顕著に増大した。このことは XKR8 の C-末端部位がプラグとして分子の底面に結合、分子の機能を制御していることを示唆している。一方、XKR9 は IL-3 受容体を介して JAK によって活性化されたシグナルが XKR9 の2個のアミノ酸をリン酸化することが明らかになった。しかし、XKR9 はこれらのリン酸化のみでは活性化されず、リン酸化に加え、C-末端領域がリン酸化以外の方法で修飾され、活性型になると予想された。

[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。私達はこれまでにスクランブラーゼ XKR8 の分子表面にリン脂質の入り口と考えられる疎水性の溝と、分子内にリン脂質頭部の通り道と考えられる親水性の洞窟を同定した。今回、解像度の高い CryoEM による構造解析から、XKR8 の C-末端部位の構造が明らかとなった。そして、変異体の解析から、C-末端部位がプラグとして活性を制御していることが示された。また、XKR9 がリン酸化に加えて他の修飾を受けて活性化されていることが明らかになった。私達は XKR8 活性型の構造解析を進めており、今回の成果はこの分子の活性化機構を明らかにする上で、重要な成果である。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. Calianese, D.C., Noji, T., Sullivan, J.A., Schoch, K., Shashi, V., McNiven, V., Ramos, L.L.P., Jordanova, A., Karteszi, J., Ishikita, H., and Nagata, S.: Substrate specificity controlled by the exit site of human P4-ATPases, revealed by de novo point mutations in neurological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 121, e2415755121, 2024
2. Sakuragi, T., Kanai, R., Otani, M., Kikkawa, M., Toyoshima, C., and Nagata, S.: The role of the C-terminal tail region as a plug to regulate XKR8 lipid scramblase. *J. Biol. Chem.* 300, 105755, 2024

XKR9 がリン酸化以外にどのような修飾を受けて活性化されるか検討する必要がある。

[3-2]学会発表

1. 長田重一 「細胞膜におけるリン脂質フリッパーゼとスクランブラーゼ」 第 71 回日本実験動物学会総会 特別講演 京都、5 月 30 日、令和 6 年
2. 長田重一 「細胞膜の非対称性：その維持と崩壊」 第 42 回日本骨代謝学会学術集会 特別講演 沖縄、7 月 1 日、令和 6 年
3. 長田重一 「細胞膜の非対称性：その維持と崩壊 (**Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases**)」 関西医科大学 大学院企画セミナー、大阪、10 月 4 日、令和 6 年
4. 長田重一 「**Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases**」 第 14 回シグナルネットワーク研究会 特別講演 沖縄、10 月 19 日、令和 6 年
5. 櫻木崇晴 「C 末端細胞内領域によるスクランブラーゼ XKR8 の活性制御」 第 47 回日本分子生物学会年会 福岡、11 月 27 日、令和 6 年

【4】今後の課題等

今後はどのような生理条件下で XKR8 や XKR9 がリン酸化、活性化されるか示す必要がある。その目的のためには、これら分子をリン酸化するキナーゼの同定が必須である。また、