

細胞膜ホスファチジルセリン-フリッパーゼの活性調節機構

申 恵媛, 高津 宏之

1. はじめに

生体膜は脂質二重層で構成されており, その内葉と外葉においてリン脂質組成の非対称性を有する (図1). 細胞膜において, 内葉 (細胞質側) はホスファチジルセリン (PS) やホスファチジルエタノールアミン (PE) に, 外葉 (細胞外側) はホスファチジルコリン (PC) やスフィンゴミエリン (SM) に富んでおり¹⁾, 内葉と外葉のリン脂質組成の非対称性はリン脂質をフリップ-フロップするタンパク質群によって調節される (図1). このタンパク質群には, リン脂質を細胞外側および内腔側からサイトゾル側へとATP依存的にフリップするフリッパーゼとその反対方向にフロップするフロッパーゼおよびATP非依存的に両方向にリン脂質をかき混ぜるスクランブラーゼが含まれる (図1).

リン脂質は主に小胞体膜のサイトゾル側で生合成される. 生合成されたリン脂質は小胞体膜の脂質二重層間の脂質量のバランスを保つために内腔側へと輸送 (フロップ) される²⁾ が, そのメカニズムはまだわかっていない. PSの場合, 生合成される小胞体膜では内腔側にも存在するが, トランスゴルジ, エンドソームのような分泌経路の後期のオルガネラ膜や細胞膜では, ほとんどがサイトゾル側に存在する³⁾. したがって, 生体膜の特定のリン脂質を内腔側 (および細胞外) からサイトゾル側へとフリップするフリッパーゼは, このような分泌経路の後期のオルガネラや細胞膜に存在し⁴⁾, 脂質二重層間の脂質量の非対称な分布を調節すると考えられる. 本稿では, 最近筆者らの研究によって明らかになった細胞膜のPS-フリッパーゼの調節メカニズムについて概説する⁵⁾.

2. P4-ATPase (脂質フリッパーゼ) とPSの非対称分布

P4-ATPaseはP-type ATPaseスーパーファミリーのサブファミリーであり, リン脂質を細胞外側から細胞質側へとフリップする膜10回貫通型タンパク質である (図1および図2A). 他のP-type ATPase (Ca-ATPase, H/K-ATPase, Na/K-ATPase, Cu-ATPaseなど) は陽イオンを輸送し生体膜の内外でイオンの濃度勾配を調節する重要な役割を担っている. 一方P4-ATPaseは, イオンよりはるかに大きいリン脂質を輸送する特徴がある (表1)⁶⁾. リン脂質のフリッパーゼとして初めて同定されたのがクロマフィン顆粒のATPase IIタンパク質で, 現在のATP8A1である⁷⁾. その後, P4-ATPaseの細胞内機能, 基質特異性および活性調節

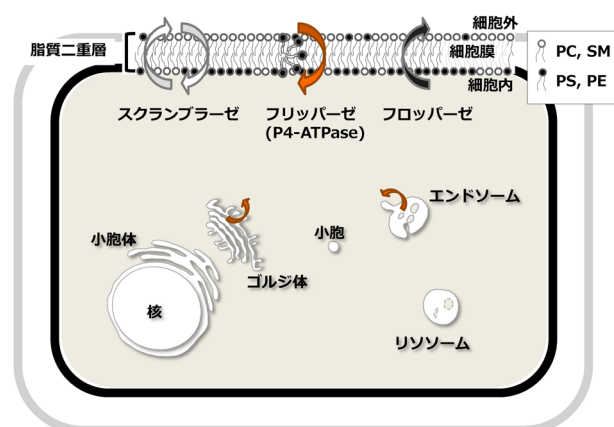


図1 リン脂質フリップ-フロップによる生体膜非対称性の調節
PC: ホスファチジルコリン, SM: スフィンゴミエリン, PS: ホスファチジルセリン, PE: ホスファチジルエタノールアミン.

表1 14種類のヒトP4-ATPaseの基質特異性⁸⁻¹⁰⁾

P4-ATPase	基質	P4-ATPase	基質
ATP8A1	PS>PE	ATP10A	PC
ATP8A2	PS>PE	ATP10B	不明
ATP8B1	PC	ATP10D	不明
ATP8B2	PC	ATP11A	PS, PE
ATP8B3	PS?	ATP11B	不明
ATP8B4	不明	ATP11C	PS>PE
ATP9A	不明		
ATP9B	不明		

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29)

Regulation mechanism of the PS-flippase ATP11C at the plasma membrane

Hye-Won Shin and Hiroyuki Takatsu (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimo-adachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載.

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900486

© 2018 公益社団法人日本生化学会

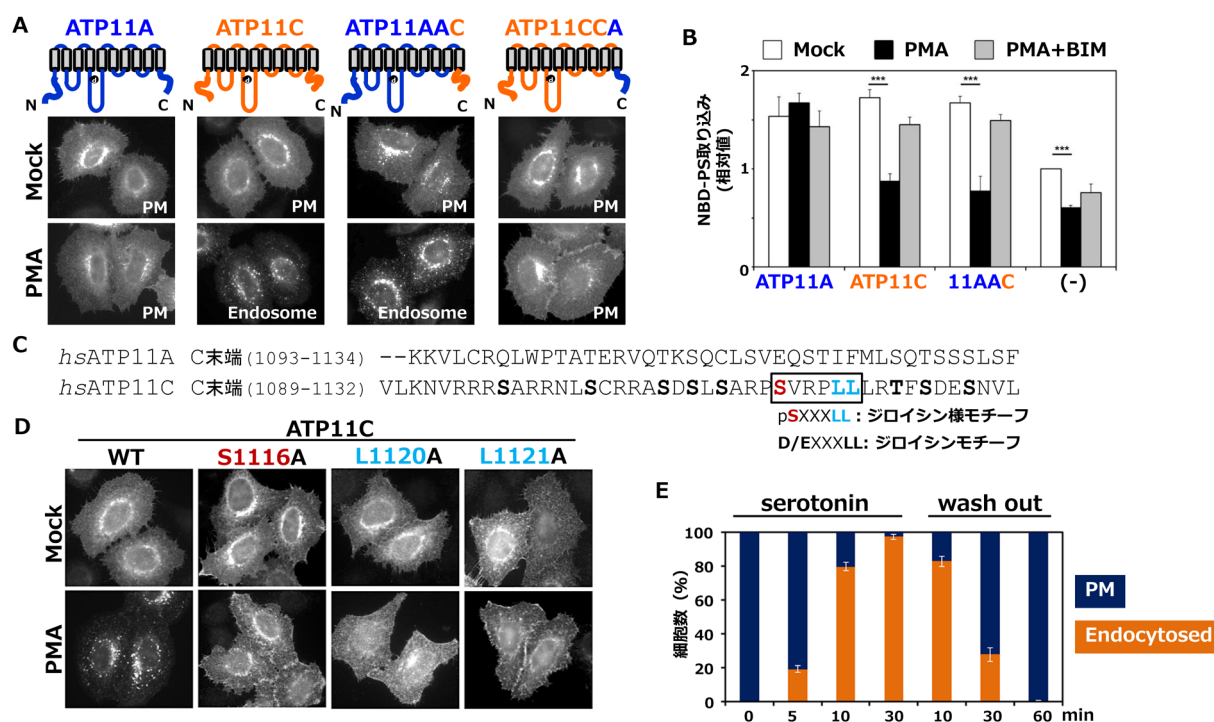


図2 ATP11Cのダウンレギュレーションメカニズム

(A) C末端にHAタグを融合させたATP11A, ATP11CおよびそれぞれのC末端置換変異体をHeLa細胞に発現させ、PMA処理後の局在変化を観察した。(B) ATP11A, ATP11C, ATP11AACをBa/F3細胞(Pro Bリンパ球)に安定発現させ、PMAおよびPMAとBIM同時処理による細胞膜のPS-フリッパー活性を測定した(*** $p < 0.001$)。PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate (PKC活性化剤), BIM: bisindolylmaleimide-1 (PKC阻害剤)。(C) ヒトATP11AとATP11CのC末端領域のアミノ酸配列。ATP11CのSerとThr残基(太字), Ser1116(赤太字), Leu1120とLeu1121(水色太字)。(D) ATP11CのC末端領域のSer1116, Leu1120, Leu1121をそれぞれAlaに置換した点変異体をHeLa細胞に発現させ、PMA処理後の局在変化を観察した。(E) ATP11C-HAと5-HT_{2A}(セロトニン受容体)をHeLa細胞に安定発現させ、セロトニン処理後(serotonin)のATP11Cの局在変化およびセロトニンを除去した後(wash out)の局在変化を観察した。ATP11Cが細胞膜に局在する細胞(紺色バー)とエンドソームおよび細胞膜に局在する細胞(橙色バー)の割合を棒グラフで示した。

メカニズムの研究は主に酵母の遺伝学的研究が先行するなか、哺乳類におけるP4-ATPaseの研究はほとんど進んでこなかった。そのなかで筆者らは、ヒトのP4-ATPaseの細胞内局在を決定し、細胞膜に局在するP4-ATPaseの安定発現細胞を用いてそのフリッパー活性および基質特異性をNBD(nitrobenzoxadiazole)で蛍光標識されたリン脂質を用いて明らかにしてきた^{4, 8, 9)}。これまでに明らかになっているP4-ATPaseの基質を表1にまとめた^{4, 6, 8-10)}。しかしながらこれらのP4-ATPaseの活性がどのように調節されているかは不明である。

生体膜の全リン脂質のうち5~10%を占めるPSは、定常状態においてほとんどが細胞膜の内葉に存在する。このPSの非対称分布はP4-ATPaseによって形成・維持されている。PSの細胞表面への露出がアポトーシスを起こした細胞および活性化した血小板や赤血球でみられることはよく知られており、PSの露出にはスクランブラーゼの活性化とフリッパーゼの不活性化が必要であることが示唆されている¹¹⁾。実際、アポトーシスを起こした細胞において、

PSの露出には細胞膜のPS-フリッパーゼであるATP11Cがカスパーゼによって切断され、不活性化されることが必要であると報告された¹²⁾。しかしながら、このように死んで除去される細胞ではなく、生細胞におけるPS-フリッパーゼの調節メカニズムは不明であった。

3. PS-フリッパーゼATP11Cのフリッパー活性調節

筆者らは、細胞膜のPS-フリッパーゼであるATP11CがCa²⁺依存性プロテインキナーゼC(PKC)の活性化によってエンドサイトーシスされることを見いだした。細胞膜のATP11CはCa²⁺イオノフォア(A23187)処理またはPKC活性化剤のPMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)処理によってエンドサイトーシスされ(図2A)、このエンドサイトーシスはPKC阻害剤の処理によって阻害された。一方で、別の細胞膜のPS-フリッパーゼであるATP11Aは、同様の条件下でエンドサイトーシスされなかった(図2A)ことからATP11CがCa²⁺依存性PKCの活性化によって特異

的にエンドサイトーシスされることがわかった。エンドサイトーシスされたATP11Cは初期エンドソームよりサイクリングエンドソームに局在し、後期エンドソームにはほとんど局在しないことから、エンドサイトーシスされたATP11Cは、分解されず細胞膜へリサイクルされる可能性が考えられた(後述)。ATP11Cのエンドサイトーシスに必要な領域を同定するために、ATP11AとATP11CのN末端およびC末端を置換したキメラタンパク質を作製し解析したところ、C末端領域を置換したATP11AACはPMA処理によってエンドサイトーシスされる一方で、ATP11CCAはエンドサイトーシスされないことがわかった(図2A)。したがって、ATP11CのエンドサイトーシスにはそのC末端が不可欠であることが判明した。次に、細胞膜におけるPS-フリッパーゼの活性を測定したところ、PKC活性化によって内在性のPS-フリップ活性が低下した[図2B(-)]。さらに、ATP11Cを安定発現している細胞では、コントロールに比べPS-フリップ活性が上昇したが、その上昇した活性はPMA処理によって低下した。しかしながら、ATP11Aを安定発現する細胞では、上昇したPS-フリップ活性がPMA処理により低下しなかった。一方で、ATP11AACキメラを安定発現する細胞では、コントロールに比べ上昇したPS-フリップ活性がPMA処理によって低下した(図2B)。すなわち、ATP11CおよびATP11AACキメラタンパク質がPMA処理によってエンドサイトーシスされることで細胞膜のPS-フリップ活性が低下したと考えられた。このようなPMA処理によるPS-フリップ活性の低下は、PKC阻害剤(bisindolylmaleimide-1:BIM)を同時に処理することで回復した(図2B)。したがって、 Ca^{2+} 依存性PKCの活性化によってATP11Cがエンドサイトーシスされると細胞膜におけるPS-フリップ活性が減少することが示唆された。

4. ATP11CのC末端領域のジロイシン様モチーフの同定

ATP11CのC末端領域にはPKCによってリン酸化される可能性のある9個のSerおよびThr残基が存在し(図2C)、そのうち8残基のリン酸化がホスホプロテオームデータベースに登録されていた。そこで、9個すべてのSerおよびThrをそれぞれAlaに置換した変異体を作製し、エンドサイトーシスに必要な残基を調べたところ、ATP11CのSer1116をAlaに置換するとPKC活性化によってエンドサイトーシスされないことが判明した(図2D)。興味深いことに、このSerの下流には三つのアミノ酸をはさんでLeuが二つあることがわかった(図2C)。ジロイシンモチーフ(D/EXXXLL)(図2C)は、さまざまな膜タンパク質のサイトゾル領域に存在し、クラスリンアダプタータンパク質のAP-2と結合することでエンドサイトー

シスのシグナルとして機能する¹³⁾。したがって、Ser1116がPKCによってリン酸化されるとジロイシン様モチーフ(pSXXXLL)として機能する可能性が考えられた(図2C)。そこで、二つのLeuをそれぞれAlaに置換した変異体を作製した。これらのATP11Cの変異体は、PMA存在下でエンドサイトーシスされないことが明らかになった(図2D)。さらにSer1116のリン酸化を模倣するようにSerをAspに置換すると定常状態でもATP11Cが細胞膜だけでなく細胞内のエンドソームに局在することがわかった。したがって、Ser1116がPKC活性化によってリン酸化されるとpSXXXLLがジロイシン様モチーフとして機能し、ATP11Cがエンドサイトーシスされることが示された。紙面の都合上データは割愛するが、クラスリンをノックダウンした細胞では、PMAあるいはA23187処理によるATP11Cのエンドサイトーシスが阻害されることから、ATP11Cはクラスリン依存的にエンドサイトーシスされることがわかった。また、種々のPKCのアイソフォームのノックダウン実験を行った結果、ATP11CはPKC α の活性化によってエンドサイトーシスされ、ダウンレギュレーションされることがわかった。

5. GPCRのシグナルによるATP11Cのダウンレギュレーション

このような Ca^{2+} 依存的なPKC活性化によるATP11Cのダウンレギュレーションが生理的条件下で行われているかどうかを調べるために、Gq共役型のGタンパク質共役受容体(GPCR)のシグナル伝達経路に着目した。Gq共役型GPCRが活性化されると細胞内カルシウム濃度が上昇しPKCが活性化される(図3)。セロトニン受容体のうち、Gq共役型である5-HT_{2A}受容体とATP11CをHeLa細胞に安定に発現させ、セロトニン刺激によるATP11Cの動態を観察した。図2Eで示すように、セロトニンを処理するとATP11Cがエンドサイトーシスされることがわかった。また、BAPTA-AMの添加により細胞内 Ca^{2+} をキレートするとセロトニン処理によるATP11Cのエンドサイトーシスが阻害されることから、GPCRのシグナルによる細胞内カルシウム濃度の上昇によって、ATP11Cがエンドサイトーシスされることが示された。さらに、処理したセロトニンを除去すると細胞内に取り込まれたATP11Cが再び細胞膜へとリサイクルされることがわかった(図2E, wash out)。したがって、 Ca^{2+} シグナル依存的にエンドサイトーシスされたATP11Cは、シグナルがオフになると再び細胞膜へリサイクルされることが示された。

これまでの結果を図3にまとめた。①～④のシグナル依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇による⑤PKCの活性化が、⑥ATP11CのC末端のSer1116をリン酸化し、ジロイシン

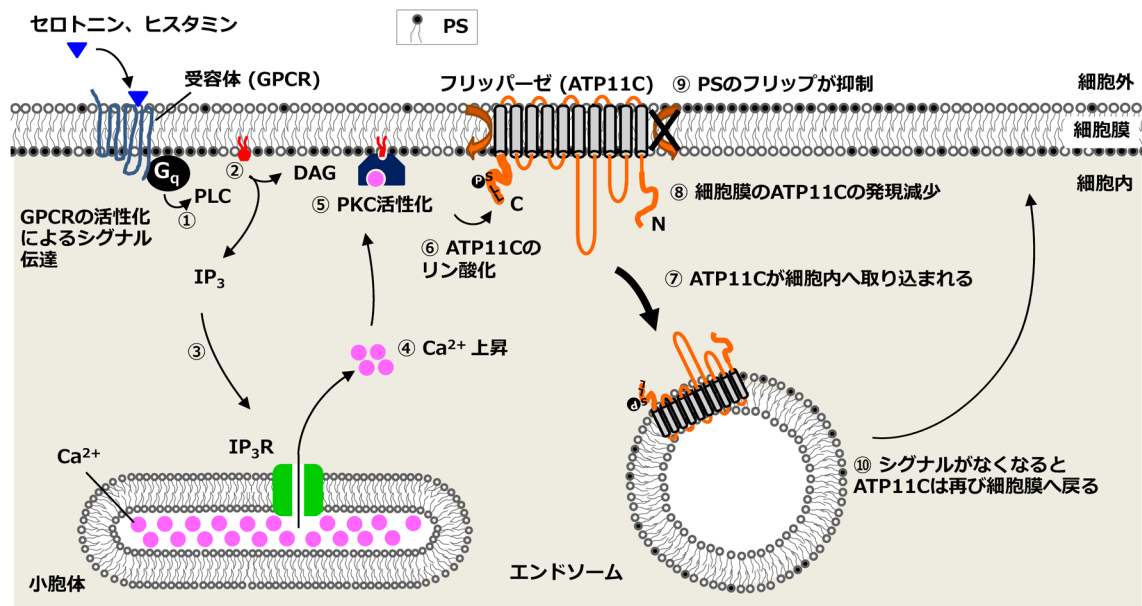


図3 GPCRのシグナル伝達によるATP11Cの調節機構 (①～⑩)

①セロトニンあるいはヒスタミンがその受容体に結合すると受容体に共役しているGqが活性化し、PLC（ホスホリパーゼC）を活性化する。②PLCがPIP₂（ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸）を加水分解しDAG（ジアシルグリセロール）とIP₃（イノシトール1,4,5-三リン酸）を産生する。③IP₃が小胞体のIP₃受容体に作用し、小胞体内のCa²⁺をサイトゾルに放出する。④サイトゾル内のCa²⁺濃度が上昇し、⑤DAGおよびCa²⁺によってPKCが活性化される。⑥PKCαによってATP11CのC末端のSer1116がリン酸化され、ジロイシン様モチーフが生成される。⑦ATP11Cがクラスリン依存的なエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。⑧細胞膜のATP11Cの発現量が減少し、⑨細胞膜のPS-フリッパー活性が抑制される。⑩シグナルがオフになると取り込まれたATP11Cは再び細胞膜へとリサイクルされる。PS：ホスファチジルセリン。

様モチーフを形成する。その後、⑦ATP11Cはクラスリン依存的にエンドサイトーシスされ、⑧細胞膜から一時的にエンドソームへ隔離されることで、⑨細胞膜のPS-フリッパー活性が低下する。⑩シグナルがオフになるとATP11Cが再び細胞膜へリサイクルされることで細胞膜のPS分布の恒常性に寄与すると考えられた。筆者らは本研究によって初めてシグナル依存的なP4-ATPaseの活性調節メカニズムを示した。しかしながら、この調節機構の生理的意義に関してはまだ不明である。

クランブラーゼの活性化とP4-ATPase（ATP11C）のダウンレギュレーションがセットになっていると考えられる。さらに、速やかなPS露出の回復のためには、細胞膜からエンドソームにいったん隔離したATP11Cを再びリサイクルするシステムが効率的であると考えられる。このようなシグナル依存的なATP11Cの調節メカニズムがどのような生理機能に関与するかを解明するのが今後の興味深い課題である。

文 献

6. おわりに

PSの露出は、アポトーシスを起こした細胞や活性化した血小板や赤血球などの死にゆく細胞のみならず、正常な細胞でも起こる。脱分極したクロマフィン細胞におけるPSの露出は、代償性エンドサイトーシスに関与する¹⁴⁾。活性化した免疫細胞においてもPSが露出し、筋細胞や破骨細胞の融合のときにもPSの露出が必要である^{11, 15)}。活性化された血小板や赤血球およびアポトーシスを起こした細胞のPS露出は、スクランブラーゼの活性化とフリッパーゼの不活性化を必要とする¹¹⁾。したがって、生細胞においても局所におけるシグナル依存的なPSの露出にはス

- 1) Murate, M., Abe, M., Kasahara, K., Iwabuchi, K., Umeda, M., & Kobayashi, T. (2015) Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J. Cell Sci.*, **128**, 1627–1638.
- 2) Montigny, C., Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P., & Lenoir, G. (2016) On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**(8 Pt B), 767–783.
- 3) Fairm, G.D., Schieber, N.L., Ariotti, N., Murphy, S., Kuerschner, L., Webb, R.I., Grinstein, S., & Parton, R.G. (2011) High-resolution mapping reveals topologically distinct cellular pools of phosphatidylserine. *J. Cell Biol.*, **194**, 257–275.
- 4) Takatsu, H., Baba, K., Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K., & Shin, H.-W. (2011) ATP9B, a P4-ATPase (a Putative Aminophospholipid Translocase), Localizes to the

- trans-Golgi Network in a CDC50 Protein-independent Manner. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38159–38167.
- 5) Takatsu, H., Takayama, M., Naito, T., Takada, N., Tsumagari, K., Ishihama, Y., Nakayama, K., & Shin, H.-W. (2017) Phospholipid flippase ATP11C is endocytosed and downregulated following Ca^{2+} -mediated protein kinase C activation. *Nat. Commun.*, **8**, 1423.
 - 6) Lopez-Marques, R.L., Theorin, L., Palmgren, M.G., & Pomorski, T.G. (2014) P4-ATPases: Lipid flippases in cell membranes. *Pflügers Arch.*, **466**, 1227–1240.
 - 7) Zachowski, A., Henry, J.P., & Devaux, P.F. (1989) Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature*, **340**, 75–76.
 - 8) Naito, T., Takatsu, H., Miyano, R., Takada, N., Nakayama, K., & Shin, H.-W. (2015) Phospholipid flippase ATP10A translocates phosphatidylcholine and is involved in plasma membrane dynamics. *J. Biol. Chem.*, **290**, 15004–15017.
 - 9) Takatsu, H., Tanaka, G., Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S., Nakayama, K., & Shin, H.-W. (2014) Phospholipid flippase activities and substrate specificities of human type IV P-type ATPases localized to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **289**, 33543–33556.
 - 10) Andersen, J.P., Vestergaard, A.L., Mikkelsen, S.A., Mogensen, L.S., Chalal, M., & Modaly, R.S. (2016) P4-ATPases as phospholipid flippases-structure, function, and enigmas. *Front. Physiol.*, **7**, 275.
 - 11) Bevers, E.M. & Williamson, P.L. (2016) Getting to the outer leaflet: Physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol. Rev.*, **96**, 605–645.
 - 12) Segawa, K. & Nagata, S. (2015) An apoptotic 'Eat me' signal: Phosphatidylserine exposure. *Trends Cell Biol.*, **25**, 639–650.
 - 13) Bonifacino, J.S. & Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 395–447.
 - 14) Ory, S., Ceridono, M., Momboisse, F., Houy, S., Chasserot-Golaz, S., Heintz, D., Calco, V., Haeberlé, A.M., Espinoza, F.A., Sims, P.J., et al. (2013) Phospholipid scramblase-1-induced lipid reorganization regulates compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. *J. Neurosci.*, **33**, 3545–3556.
 - 15) Verma, S.K., Leikina, E., Melikov, K., Gebert, C., Kram, V., Young, M.F., Uygur, B., & Chernomordik, L.V. (2018) Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion. *J. Biol. Chem.*, **293**, 254–270.

著者寸描

●申 恵媛 (しん へうおん)



京都大学大学院薬学研究科准教授。博士(理学)。

■略歴 韓国出身。韓国国立慶北大学校生物学科卒業、同校修士課程修了。筑波大学生物科学研究科細胞工学学際カリキュラム博士課程修了。ドイツEMBL・マックスプランク研究所のポストドク研究員、金沢大学薬学部助手、京都大学大学院薬学研究科助教、生命科学系キャリア

パス形成ユニットグループリーダーなどを経て2012年より現職。

■研究テーマと抱負 生体膜の表裏の膜脂質の組成変化による細胞機能の調節および多細胞系の高次機能の調節メカニズムを理解したい。

■ウェブサイト <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/hshin/ShinIndex.html>

■趣味 アウトドア、バレエ。

●高津 宏之 (たかつ ひろゆき)

京都大学大学院薬学研究科研究員。博士(理学)。

■略歴 愛知県出身、2001年筑波大学大学院生物科学研究科博士課程修了。

■研究テーマと抱負 フリッパーゼの活性がアポトーシスだけではなく様々な生命現象に結びつくはずだという考えのもとに、日々細胞と対話中。

■趣味 スケート。