

細胞膜リン脂質フリッパーゼ ATP11C の立体構造と輸送機構

中西 華代, 阿部 一啓

1. はじめに

細胞膜の基本構造である脂質二重層は、外葉（細胞外側）と内葉（細胞質側）でリン脂質組成が異なる。ホスファチジルコリン（PtdCho）やスフィンゴミエリン（SM）は外葉に多く、ホスファチジルセリン（PtdSer）やホスファチジルエタノールアミン（PtdEtn）は内葉に局在する¹⁾。このリン脂質非対称分布は小胞輸送や細胞内シグナル伝達に必須であり、P4-ATPaseであるリン脂質フリッパーゼがATP依存的にPtdSerとPtdEtnを細胞膜の外葉から内葉に輸送することで形成・維持されている²⁾。一方で、アポトーシスによる自死を迎えた細胞では、細胞膜リン脂質フリッパーゼATP11Cがカスパーゼにより不活性化されると同時に、リン脂質を二重層の双方向に輸送するスクランブラーゼがカスパーゼ依存的に活性化されることで、定常状態では内葉にあるPtdSerが外葉に露出する（図1A）。この細胞表面へのPtdSer曝露がマクロファージによる貪食を引き起こす“eat me”シグナルとなる³⁾。本稿では筆者らの研究で明らかになった、アポトーシスに関わるリン脂質フリッパーゼATP11Cの立体構造とリン脂質認識・輸送機構について概説する^{4,5)}。

2. P4-ATPase

P型ATPaseはATPの加水分解と共役して主に陽イオンを能動輸送するポンプとして古くから研究されている。この酵素は反応サイクルにおいてATPの末端リン酸が酵素自身に転移した自己リン酸化中間体を形成することからP型と呼ばれる。P型ATPaseスーパーファミリーは一次構

造によりP1~P5の五つのファミリーに分類される。P1は重金属イオンや K^+ 、P2は Na^+ 、 Ca^{2+} 、 H^+ といった陽イオン、P3は H^+ を輸送するのに対し、P4はリン脂質、P5はポリアミンや短い一本鎖ヘリックスといった陽イオンに比べてはるかに大きな基質を輸送する^{6,7)}。P4は真核生物で発現しており、分子をコードする遺伝子は分裂酵母5、シロイヌナズナ12、線虫6、マウス15、ヒト14と多数あり、P型ATPaseの中で最大のファミリーを形成している。輸送基質としてはリン脂質PtdChoやSM、アミノリン脂質PtdSerやPtdEtn、リゾリン脂質、スフィンゴ糖脂質グルコシルセラミド、その他の脂質が知られ、細胞膜、分泌小胞、オルガネラ膜それぞれに固有のフリッパーゼ分子が局在し、特定の脂質分子を脂質二重層の外葉から内葉（細胞質側）に反転移層する⁸⁾。主なリン脂質フリッパーゼは、120~190kDaの10回膜貫通型ATPaseと40~50kDaの2回膜貫通型アクセサリーサブユニットCDC50ファミリータンパク質からなるヘテロ二量体で機能する。CDC50ファミリータンパク質は複合体を安定化するとともに、細胞内における局在部位への輸送に必要なシャペロンとして機能することが示されている⁹⁾。

P4型によるリン脂質輸送反応は、他のP型と同様にPost-Albers型の反応機構、すなわち、E1（Enzyme 1）、E2という二つの状態と、自己リン酸化されたE1P、E2Pという異なる状態をE1→E1P→E2P→E2の順に遷移することで達成されるが、その分子メカニズムの詳細は不明であった。しかし、2019年の出芽酵母Drs2p-Cdc50pの構造決定を皮切りに¹⁰⁾、筆者らのヒト細胞膜ATP11Cを含むリン脂質フリッパーゼの3次元構造が相次いで決定され^{4,5,11-14)}、P4型によるリン脂質輸送機構が分子レベルで理解され始めている。

3. ATP11Cの全体構造

筆者らは動物培養細胞発現系を用いて調製したヒトATP11C-CDC50A複合体について、3次元結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行い、五つの中間状態にある六つの構造を3.0~4.0 Å分解能で解析した。これらのうち三つはリン脂質を膜貫通領域に結合した状態で、輸送経路の構造変化が比較できた。残り三つは輸送経路が閉じた状態で膜貫通領域の構造がほぼ一致していた

名古屋大学細胞生理学研究センター（〒464-8601 名古屋市千種区不老町）

Structures and transport mechanism of the plasma membrane flippase ATP11C

Hanayo Nakanishi and Kazuhiro Abe (Cellular and Structural Physiology Institute, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, 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.2021.930824

© 2021 公益社団法人日本生化学会

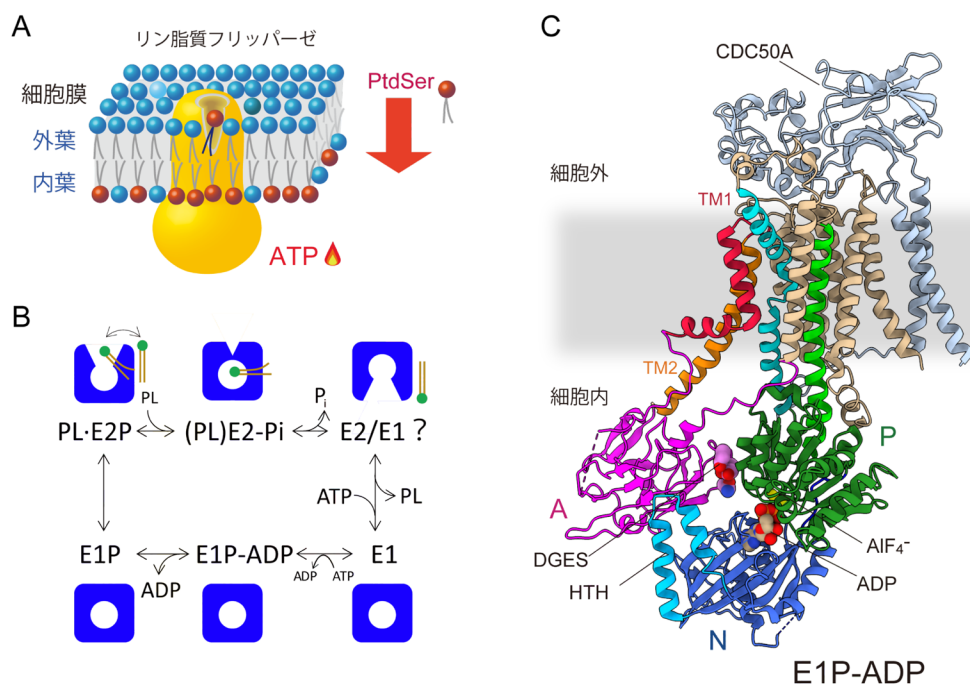


図1 ATP11C-CDC50Aの立体構造と反応機構

(A)細胞膜ホスファチジルセリン (PtdSer) フリッパーゼの概念図。(B) Post-Albers 反応機構。ATP11Cは他のP型ATPaseと同様にPost-Albers機構と呼ばれる中間体構造を経てリン脂質を輸送すると考えられている (E1: Enzyme 1, E2: Enzyme 2, E1-P: E1 phosphorylated, E2-P: E2 phosphorylated, PL: リン脂質)。(C) ATP11C-CDC50A複合体の分解能3.2Å (Cryo-EM)の立体構造に基づいた構造モデル (リボン表示)を示す。ATP11CはアクセサリサブユニットのCDC50Aとヘテロ二量体を形成している。ATP11Cは三つの細胞質ドメイン (A, P, N)と10回膜貫通ヘリックスで構成されている。NドメインにはAドメインに向かって突き出した、特徴的なHTH (水色)が存在する。Aドメインには脱リン酸化を促すDGES配列がある。PドメインとNドメインにはリン酸アナログ阻害剤AIF₄⁻とADPが結合しており、この構造がPドメインの自己リン酸化後にADPを遊離する前の状態を模倣したE1P-ADP中間体であることがわかる。

(E1-ATP, E1P-ADP, E1P)。

ATP11Cはイオンを輸送するP2型と同様に、10本の膜貫通ヘリックス (TM1~10)と細胞質側に三つの機能ドメイン、Aドメイン (actuator), Nドメイン (nucleotide binding), Pドメイン (phosphorylation)を持つ。Pドメインには自己リン酸化を受けるAsp残基を含む⁴⁰⁹DKTG配列, Aドメインには脱リン酸化を促進する¹⁷⁹DGES/T配列 (P2ではTGES)が保存されている (図1C)。アクセサリサブユニットCDC50Aは2本の膜貫通ヘリックスと大きな細胞外ドメインを有し、これらがATP11CのTM10, およびTM1-2以外の細胞外側ループを介して、それぞれ強固に結合している。ATP11CのTM1-3は細胞質側でAドメインに、TM4-5はPドメインにそれぞれつながっていて、ATP加水分解に伴う細胞質ドメインと膜貫通領域との構造変化の共役を可能にしている。反応サイクル全体を通してTM6-10はほとんど動かず、CDC50Aとともに他のドメインの支持体としての役割を果たす。Nドメインには約30アミノ酸残基からなるヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) 構造があって、この先端でAドメインと会合

する。P2型のHTH (約15アミノ酸残基)に比べて、P4型のHTHは大きい上に、Aドメインに向かって突き出ている。NドメインHTHがAドメインから解離した状態でも空間的障壁となってAドメインの動きを制限するために、P4型Aドメインが行う構造変化はP2型とは明らかに異なっている¹⁵⁾。ATP11Cは同時期に構造が決定された分裂酵母のPtdSerフリッパーゼDrs2p¹⁰⁾やヒトのオルガネラ膜ATP8A1¹¹⁾と比較してアミノ酸配列の相同性が35%程度、細胞内局在部位が異なるが、基本構造はよく似ており、NドメインHTHの特徴も一致している。ATP11CのNドメインには、このHTHに加えてユニークなループ状挿入配列が2か所あり、この部分に合計3か所のカスパーゼ切断部位が存在する⁴⁾。このうちいずれか2か所がカスパーゼによって切断されることによってATP11Cは失活し、細胞膜外葉にPtdSerが“eat me”シグナルとして露出する³⁾。

4. リン脂質輸送経路

筆者らが決定した構造のうち三つは輸送基質を膜貫通領

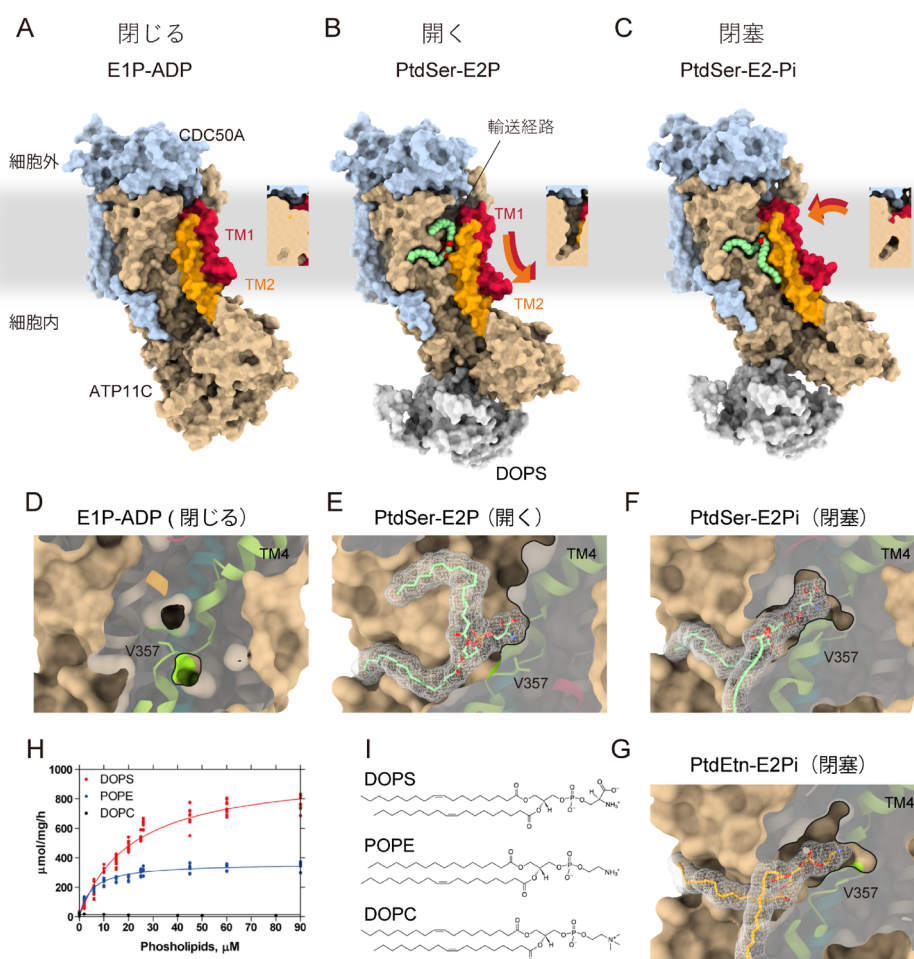


図2 ATP11Cのリン脂質結合構造と輸送経路

(A~C) ATP11CにPtdSerが結合する前後の立体構造をsurfaceモデルで示す。主にTM1-2 (橙色, 赤色) が移動することでリン脂質輸送経路の入口が開閉する。(A) E1P-ADP中間体では輸送経路が閉じている。(B) E2P中間体では疎水領域の側面に溝ができ、リン脂質の頭部が溝に入り込んでいる。(C) E2-Pi中間体ではPtdSer頭部が完全に閉塞されている。それぞれの立体構造の右側に、脂質輸送経路近傍のmembrane sliceを示した。(D~F) TM1-2を取り除いた輸送経路の断面図、PtdSer親水性頭部の結合状態と閉塞状態を示す。(G) PtdEtnを閉塞した中間体の断面図。輸送経路奥にある4番の膜貫通ヘリックス (TM4, 黄緑) が一部ほどけた部位にあるVal357は、細胞外と細胞質側を隔てる疎水性ゲートとなっている。(H) ATP11Cのリン脂質濃度依存ATP加水分解活性。(I) 輸送基質のDOPSとDOPE, 輸送されないDOPCの化学構造を示す。

域に結合した状態であり、これらの比較からリン脂質輸送経路の形状と開閉機構がわかってきた。その一つPtdSer-E2P中間体は、PドメインのAsp409にリン酸アナログ阻害剤フッ化ベリリウム (BeF_3^-) が共有結合し自己リン酸化を模倣した状態にあった。この状態では、膜貫通領域の側面に細胞膜表面から脂質二重層の中間まで縦走するV字形の親水性の溝が細胞膜外葉側へと露出し、親水的なPtdSer頭部はこの溝の底に結合、疎水的な尾部は脂質二重層側で膜貫通領域の側面に張りついていた (図2B)。次の反応中間体 (PtdSer) E2-Piはリン酸アナログ阻害剤フッ化アルミニウム (AlF_4^-) がAsp409に結合して脱リン酸化の遷移状態 (リン酸が遊離する直前の状態) を模倣していた。この中間体では、輸送経路の細胞外側の入口が閉じPtdSer頭

部が膜貫通領域に閉塞され、尾部は脂質二重層に残されタンパク質の側面に張りついていた (図2C)。

リン脂質輸送経路はTM1-2, 4-6によって構成されている。これらの中でTM4は細胞膜中央部に位置する保存されたPro残基により膜内でヘリックスが一部ほどけている。この周辺の保存配列³⁵⁶PVSM配列 (他のフリッパーゼではPISLが多い) に含まれるVal357は輸送経路を細胞内外に隔てる疎水性ゲートとしての役割を担っている (図2D)。Pドメインの構造変化に連動したTM4-5の構造変化により、Val357側鎖を含むほどけたヘリックス部分の向きが変わり疎水性ゲートが細胞質側に傾くことで、PtdSer頭部を格納できる空間が生じる (図2D~F)。このTM4のVal357はPtdSer-E2P状態ではV字形輸送経路の底になって

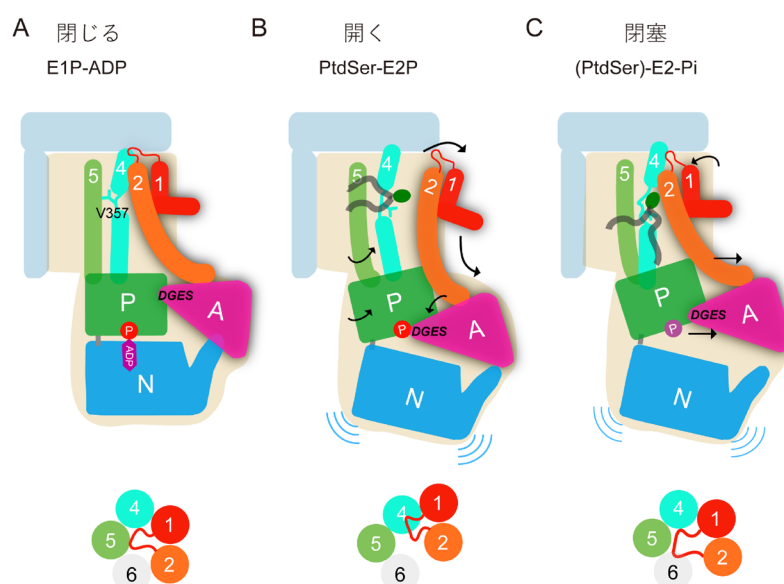


図3 ATP11Cによるリン脂質輸送機構モデル

ATP11CがPtdSerを細胞膜外葉から内葉へと輸送する際の構造変化モデルを示す(本文参照)。(A) E1P-ADP中間体では輸送経路が閉じている。(B) E2P中間体では疎水領域の側面に溝ができ、リン脂質の頭部が溝に入る。(C) E2-Pi中間体ではPtdSer頭部が完全に閉塞される。それぞれの中間体における膜貫通ヘリックスの配置を細胞外側から見た形で下段に示す。

おり、脂質二重層の中間の深さに位置する。

輸送経路が閉じたE1P状態からPtdSer-E2P状態へ遷移する過程では、Aドメインの構造変化に伴って、これと連結したTM1-2が膜に対して垂直方向に細胞質側へと下がると同時に水平方向にヘリックス1本程度ずれる。併せてPドメインの傾きやこれと連動した上記TM4-5の構造変化によって、リン脂質輸送経路の細胞膜外葉側の入口が開き、PtdSer頭部が輸送経路へと導入される。次にPtdSer-E2Pから(PtdSer)-E2-Pi状態へ遷移する際には、TM1-2の細胞質側が、PtdSer頭部と複数の水素結合を形成することで輸送経路内部TM4に向かって倒れて細胞膜外葉側の入口が塞がり、PtdSer頭部が脂質膜から隔離された閉塞状態を作り出す。

5. 輸送基質認識機構

ATP11CはどのようにPtdSerを見分けるのだろうか？ ATP11CはPtdSerに比べ速度は低いがPtdEtnを輸送する(図2H)。二つの異なるアミノリン脂質の頭部を閉塞した(PtdSer)-E2-Piと(PtdEtn)-E2-Pi構造を比較すると、PtdSer頭部はPtdEtnに比べ閉塞空間内の隙間が小さく、より密着して結合していた(図2F, G)。このような閉塞空間内における頭部の占有率の違いは、PtdEtn頭部がカルボキシ基を持たないことに起因している(図2G)。一方で、生体膜の主要リン脂質であるPtdChoの頭部は疎水性が大きく、輸送経路に入ることができたとしても閉塞状態における

TM1-2との水素結合を形成できない。このため、周囲の膜貫通ヘリックス、特にTM1-2を引き寄せて、頭部を閉塞することができないと考えられる。

輸送経路が細胞膜外葉側に向けて開いたE2P状態では、PtdSer頭部の親水性官能基とタンパク質の親水性相互作用は限定的であり(水素結合として三つ)比較的ゆるく結合している。一方で(PtdSer)-E2-Pi状態ではPtdSer頭部はその閉塞空間の中で多数の極性相互作用(水素結合として約10)を形成する。PtdSer頭部と輸送経路表面のアミノ酸との水素結合形成によって、周囲の膜貫通ヘリックス、特にAドメインと直接連結したTM1-2が手繰り寄せられることで、輸送経路が閉じ閉塞状態に移行すると考えられる。逆に、閉塞状態において、たとえばPtdChoのように、TM1-2と適切な相互作用ができない場合には、輸送経路を閉じることができず、脂質は細胞膜外葉へと解離してゆくことになるだろう。したがって、このような輸送基質との水素結合形成それ自体が輸送基質の選別に関係していると考えられる。

6. PtdSer輸送機構モデル

ATP加水分解に伴う細胞質領域の構造変化は、膜貫通ヘリックスを介して脂質輸送経路の細胞膜外葉側入口、および経路内部における疎水性ゲートの開閉と相互に共役し、リン脂質輸送反応が進行する。

これらの構造上の特徴を踏まえATP11Cによるリン脂質

輸送機構モデルを提案する (図3). ATP11Cの細胞質領域にATPが結合するとNドメインとPドメインが結合し、AドメインがPドメインから隔離する。この際、NドメインはHTHの先端でAドメインと会合して互いの動きを制限する (図3A)。ATPの末端リン酸がPドメイン Asp409に転移し、ADPが遊離すると、NドメインがPドメインから離れると同時に、Aドメインのロックが外れる。ただし、NドメインのHTHが立体障害となりAドメインの可動範囲はP2型イオンポンプに比べて狭い。Aドメインの¹⁷⁹DGES配列がPドメインのリン酸化部位と会合する動きと連動して、TM1-2が膜に対して細胞質側に下がる、かつ水平方向にヘリックス1本分ずれることで、輸送経路の溝が細胞膜外葉側へと開く (図3B)。同時に輸送経路の深部 (³⁵⁶PVSM付近) では、Pドメインの構造変化に連動したTM4-5の傾きの変化によって、それまで基質結合部位を占有していた疎水性ゲート Val357が細胞質側へと傾く。そこに細胞膜外葉のリン脂質頭部が拡散によって入り込み、V字形溝の底 (Val357付近) に到達する。そこでPtdSerが近傍の親水性アミノ酸と水素結合を形成することで周囲の膜貫通ヘリックスを引き寄せ、閉塞状態へと移行する。この構造変化は、特にTM1-2細胞外側に位置する親水基とPtdSerとの水素結合形成の有無によって駆動される (図3C)。TM1-2の細胞外領域は脂質の入口におけるフタの役割を果たし、また同時に、これらTM1-2がAドメインと連結していることは、PtdSer閉塞と連動して引き起こされる脱リン酸化反応を進めるのに都合がよい。この閉塞に伴うAドメインの動きによって、¹⁷⁹DGES配列が自己リン酸化部位から離れ、Pドメインの脱リン酸化が進む。最後のステップは中間体構造が未解明なので推定となるが、Pドメインからリン酸が遊離すると、AドメインがPドメインからさらに離れることで、TM1-2の細胞質側とTM4のVal357疎水性ゲートが細胞質側に開き、PtdSerの頭部が細胞膜内葉に反転移層されると考えられる。

7. おわりに

本稿ではPtdSerフリッパーゼであるATP11Cの輸送機構について、PtdSer親水性頭部と輸送経路の相互作用を中心に輸送機構を説明した。現時点でATP11Cを含む6種類のP4-ATPaseについて3次元構造が決定されており、フリッパーゼの作動機構への理解が着実に進んでいる。しかし、脂質輸送経路が細胞質側に開いた構造 (E1/E2?) が未解明であり、その他にも解明すべき点が多数ある。PtdSerフリッパーゼには頭部は同じでもリゾリン脂質を輸送しないので、親水性頭部だけでなく脂肪酸鎖の長さや形状を認識する機構があるのかもしれない。また、脂質二重層を並進拡散するPtdSerが、膜に対して90度回転し輸送経路に頭

部を挿入する過程の説明も必要である。リン酸基を持たないグルコシルセラミドを輸送する分子の基質認識機構も興味深い。さまざまな脂質を基質とするP4-ATPaseの基質結合構造を明らかにし、基質認識・輸送機構の共通点や違いを比較できれば、特異的阻害剤の開発や関連疾患の治療薬開発につながると期待される。

謝辞

本稿で紹介したATP11Cの構造機能解析に関して、大阪大学免疫学フロンティア研究センター瀬川勝盛 (現東京医科歯科大学)、長田重一、名古屋大学細胞生理学研究センター藤吉好則 (現東京医科歯科大学)、入江克雅 (現和歌山県立医科大学)、公益財団法人高輝度光科学研究センター・SPRING-8長谷川和也、東京大学西澤知宏 (現横浜市立大学)、濡木理各博士のご尽力に感謝致します。ATP11Cの生化学的解析実験に関しては名古屋大学細胞生理学研究センター技術補佐員の谷口真由美さんのご助力に感謝致します。

文 献

- 1) Yang, Y., Lee, M., & Fairm, G.D. (2018) Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J. Biol. Chem.*, **293**, 6230–6240.
- 2) Hankins, H.M., Baldridge, R.D., Xu, P., & Graham, T.R. (2015) Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. *Traffic*, **16**, 35–47.
- 3) Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T.R., Matsuda, F., & Nagata, S. (2014) Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, **344**, 1164–1168.
- 4) Nakanishi, H., Irie, K., Segawa, K., Hasegawa, K., Fujiyoshi, Y., Nagata, S., & Abe, K. (2020) Crystal structure of a human plasma membrane phospholipid flippase. *J. Biol. Chem.*, **295**, 10180–10194.
- 5) Nakanishi, H., Nishizawa, T., Segawa, K., Nureki, O., Fujiyoshi, Y., Nagata, S., & Abe, K. (2020) Transport Cycle of Plasma Membrane Flippase ATP11C by Cryo-EM. *Cell Rep.*, **32**, 108208.
- 6) Li, P., Wang, K., Salustros, N., Grønberg, C., & Gourdon, P. (2021) Structure and transport mechanism of P5B-ATPases. *Nat. Commun.*, **12**, 3973.
- 7) McKenna, M.J., Sim, S.I., Ordureau, A., Wei, L., Harper, J.W., Shao, S., & Park, E. (2020) The endoplasmic reticulum P5A-ATPase is a transmembrane helix dislocase. *Science*, **369**, eabc5809.
- 8) López-Marqués, R.L., Gourdon, P., Günther Pomorski, T., & Palmgren, M. (2020) The transport mechanism of P4 ATPase lipid flippases. *Biochem. J.*, **477**, 3769–3790.
- 9) Segawa, K., Kurata, S., & Nagata, S. (2018) The CDC50A extracellular domain is required for forming a functional complex with and chaperoning phospholipid flippases to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **293**, 2172–2182.
- 10) Timcenko, M., Lyons, J.A., Janulien, D., Ulstrup, J.J., Dieudonné, T., Montigny, C., Ash, M.-R., Karlsen, J.L., Boesen, T.,

- Kühlbrandt, W., et al. (2019) The CDC50A extracellular domain is required for forming a functional complex with and chaperoning phospholipid flippases to the plasma membrane. *Nature*, **571**, 366–370.
- 11) Hiraizumi, M., Yamashita, K., Nishizawa, T., & Nureki, O. (2019) Cryo-EM structures capture the transport cycle of the P4-ATPase flippase. *Science*, **365**, 1149–1155.
- 12) Bai, L., You, Q., Jain, B.K., Duan, H.D., Kovach, A., Graham, T.R., & Li, H. (2020) Transport mechanism of P4 ATPase phosphatidylcholine flippases. *eLife*, **9**, e62163.
- 13) Bai, L., Kovach, A., You, Q., Hsu, H.-C., Zhao, G., & Li, H. (2019) Autoinhibition and activation mechanisms of the eukaryotic lipid flippase Drs2p-Cdc50p. *Nat. Commun.*, **10**, 4142.
- 14) He, Y., Xu, J., Wu, X., & Li, L. (2020) Structures of a P4-ATPase lipid flippase in lipid bilayers. *Protein Cell*, **11**, 458–463.
- 15) Abe, K., Irie, K., Nakanishi, H., Suzuki, H., & Fujiyoshi, Y. (2018) Crystal structures of the gastric proton pump. *Nature*, **556**, 214–218.

著者寸描

●中西 華代（なかにし はなよ）

名古屋大学細胞生理学研究センター研究員。博士（農学）。

■略歴 2000年名古屋大学大学院生命農学研究科博士課程修了。日本学術振興会特別研究員PD, 日本学術振興会特別研究員RPD, 愛知医科大学医学部学際的痛みセンター主任研究員, 名古屋大学理学研究科研究員などを経て16年より現職。

■研究テーマと抱負 脂質リッパラーゼの立体構造と作動機構を明らかにすること。

■趣味 読書, 空手, ハイキング。

●阿部 一啓（あべ かずひろ）



名古屋大学細胞生理学研究センター・大学院創薬科学研究科准教授。博士（理学）。

その他については本誌91巻2号（2019）, p. 177をご参照ください。