

## 論文の内容の要旨

# A phosphatidylserine flippase regulates intracellular membrane traffic through recycling endosomes

(ホスファチジルセリンフリッパーゼによる細胞内膜輸送の制御機構)

李尚憲

### 【序論】

ホスファチジルセリン(PS)は生体膜を構成するリン脂質の一種であり、動物細胞においてはリン脂質全体の 2-10%程度存在する。PS は、細胞膜においてはシグナル伝達分子の活性化や死細胞の貪食の誘起など多彩な機能が知られている。一方で、細胞内オルガネラにおける PS に関しては、その詳細な分布および機能ともに、未解明な点が多い。最近、当研究室は PS が細胞膜のみならずリサイクリングエンドソーム(REs)という細胞内オルガネラの細胞質側の膜に多く存在すること、そして *evectin-2* というタンパク質が PS との結合を介して REs に局在し、REs からゴルジ体への膜輸送を制御していることを明らかにした (文献 1)。

そこで私は、PS が REs の細胞質側の膜に豊富に存在するメカニズム、およびその生理的意義を明らかにすることを目指し研究を行った。その結果、PS を REs の細胞質側の膜へと局在変化させる分子として、リン脂質フリッパーゼの 1 種である ATP8A1 を見出した。そして、ATP8A1 による PS の局在制御が、膜輸送制御タンパク質 EHD1 の REs へのリクルートおよび REs からの膜輸送に必要であることを明らかにした (文献 2)。さらに、ATP8A1 のパラログであり、ヒト神経疾患の原因遺伝子でもある ATP8A2 に着目することで、PS フリッパーゼによる REs からの膜輸送の生理的意義に迫った。最後に、ATP8A1 の活性を上流から制御するシステムとして、kinase による ATP8A1 のリン酸化が存在することを見出した。

### 【結果と考察】

#### 1. ATP8A2 の機能から見た PS フリッパーゼの生理的意義

ATP8A2 は ATP8A1 と高いアミノ酸配列相同性 (67%) を持つ分子である。ATP8A1 が組織ユビキタスに発現している一方で、ATP8A2 は脳、網膜、精巣という一部の組織にしか発現していない。2012 年に、ヒト ATP8A2 遺伝子のミスセンス変異 (I376M) が、CAMRQ という神経変性疾患の発症と相関していることが報告された。また、ATP8A1, ATP8A2 それぞれの KO マウスが viable な一方で、両方のダブル KO マウスが出生後致死であることが報告された。私はこれらに着目し、ATP8A2 が ATP8A1 と同様に REs における機能を持ち、ATP8A2 の変異による疾患は ATP8A2 による REs からの膜輸送の制御の破綻に起因しているという仮説を立て、これを検証することにした。

まず ATP8A2 を COS-1 細胞に発現させてその細胞内局在を調べた。その結果、ATP8A2 は RE マ

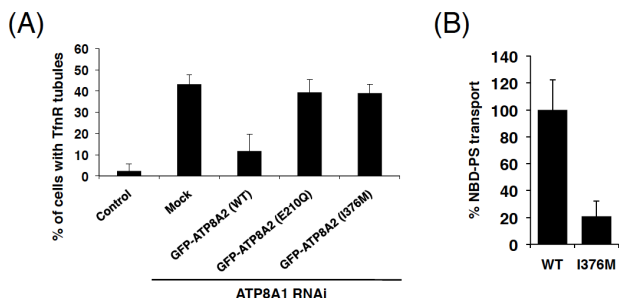
ーカーのトランスフェリン受容体 (TfnR) とよく共局在し、ATP8A1 と同様に REs に選択的に局在することが分かった (data not shown)。そこで次に、ATP8A2 が ATP8A1 の機能を補償できるかを調べるため、COS-1 細胞において ATP8A1 を RNAi したときの表現型が、ATP8A2 の過剰発現によってレスキューされるかを検証した。その結果、TfnR の tubule 化という ATP8A1 RNAi の表現型は、

WT の ATP8A2 過剰発現によってレスキューされた一方で、E210Q 活性欠失変異体ではレスキューされなかった (図 1A)。重要なことに、ATP8A2 (I376M) は、ATP8A1 RNAi の表現型をレスキューできなかった。

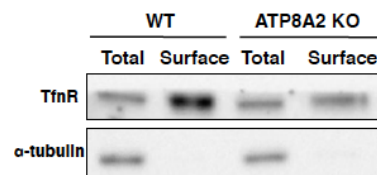
この結果と合致して、ATP8A2 の *in vitro* flippase 活性は、I376M 変異体では完全に失われていた (図 1B)。以上から、ATP8A2 の I376M 変異により ATP8A2 による REs からの輸送制御が破綻し、それが神経疾患 CAMRQ の発症を引き起こすことが示唆された。最後に、内在の

ATP8A2 が神経細胞において REs からの輸送に関与するかを、ATP8A2 KO マウス由来の初代培養神経細胞を用いて検証した。その結果、ATP8A2 KO 神経細胞では、野生型神経細胞と比較して、細胞膜上の TfnR の量が減少していた (図 2)。このことは、神経細胞における ATP8A2 が TfnR の細胞膜への膜輸送に必要であることを示唆している。

以上をまとめると、ATP8A2 は ATP8A1 と同様に REs に局在して REs から細胞膜への輸送に関与すること、ATP8A2 の I376M 変異による神経疾患の発症は、REs からの膜輸送の破綻に起因していることが示唆された。



【図 1】 (A) ATP8A2 (WT) は ATP8A1 RNAi の表現型 (TfnR の tubule 化) をレスキューできるが ATP8A2 (I376M) ではレスキューできない (B) ATP8A2 (I376M) は *in vitro* で活性を失っている



【図 2】 ATP8A2 KO 神経細胞では細胞表面の TfnR 量が減少している

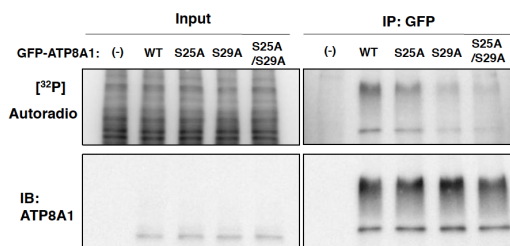
## 2. 膜輸送における ATP8A1 の機能のリン酸化による制御

REs から細胞膜への膜輸送は、外部からのシグナル依存的に亢進することが知られている。例えば、がん細胞においては、成長因子刺激により細胞接着タンパク質インテグリンの REs からの輸送が亢進し、それによりがん細胞の浸潤が活性化するとされている。ATP8A1 が REs からの膜輸送に必要であることから、ATP8A1 による PS のフリップとその下流の膜輸送制御においても、外部からのシグナルに応じた活性化システムが存在することが予想される。すなわち、ATP8A1 の活性を制御する上流のメカニズムがあることが想定される。しかしこれまで、ATP8A1 が含まれるフリップアーゼファミリー分子の活性制御メカニズムはほとんど

どわかっていない。そこで私は、リン酸化タンパク質のプロテオーム解析を行っている過去の報告で、ATP8A1 のリン酸化が検出されていることに着目し、「ATP8A1 が何らかの kinase カスケードによってリン酸化され活性制御を受け、下流の膜輸送を制御している」という仮説を立て、これを検証することにした。

まず、ATP8A1 が実際に細胞内でリン酸化されているのかを、<sup>32</sup>P ラベルを用いた実験で検証した。

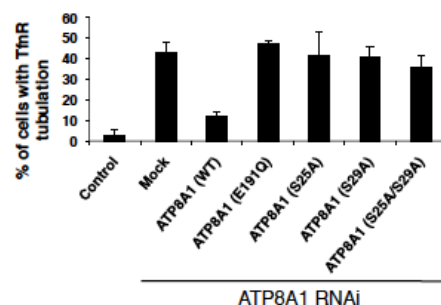
GFP タグ付き ATP8A1 を発現させた HEK293A 細胞を <sup>32</sup>P オルトリン酸で一定時間ラベルした後、



【図 3】 ATP8A1 のリン酸化は S25, S29 の変異で減少する

細胞破碎液から anti-GFP で GFP-ATP8A1 を免疫沈降して  $^{32}\text{P}$  の取込みを検出した。その結果、GFP-ATP8A1 には  $^{32}\text{P}$  ラベルの取込みが見られ、ATP8A1 は細胞内でリン酸化されていることが分かった。そこで、ATP8A1 のどのアミノ酸がリン酸化されているのかを調べた。過去の知見に基いて、S25, S29 がリン酸化されている可能性が高いと考えて、これらのアミノ酸残基を変異させた時に  $^{32}\text{P}$  の取込み量が変化するかを検証した。その結果、 $^{32}\text{P}$  の取り込み量は、GFP-ATP8A1 の S25A, S29A, S25A/S29A 変異体で減少した (図 3)。このことから、S25, S29 が ATP8A1 においてリン酸化されていることが分かった。

次に、このリン酸化が ATP8A1 の機能に必要であるかを検証するため、S25, S29A 変異体 ATP8A1 の *in vitro* での ATPase 活性を調べた。また、ATP8A1 を RNAi したときの表現型を、S25, S29 変異 ATP8A1 がレスキューできるかを評価した。その結果、ATP8A1 S25A/S29A 変異体は、野生型と比べて ATPase 活性が減弱していることが分かった (data not shown)。さらに、ATP8A1 を RNAi したときに生じる TfnR の tubule 化は、ATP8A1 S25A, S29A, S25A/S29A のいずれでもレスキューされなかった (図 4)。これらのことから、ATP8A1 の活性と機能には S25, S29 のリン酸化が必要であることが示唆された。

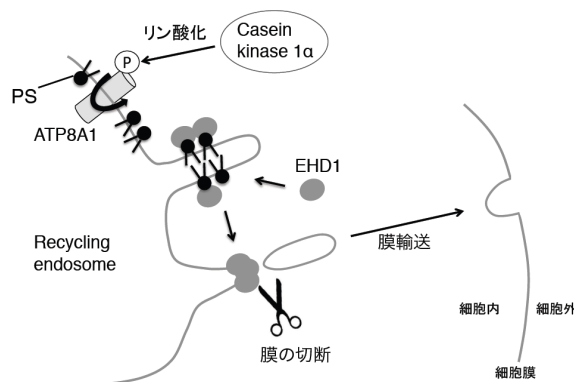


【図 4】ATP8A1 の S25, S29 変異体は ATP8A1 RNAi のレスキュー能力を失っている

次に私は、ATP8A1 をリン酸化している kinase を探索することにした。S25, S29 が含まれるアミノ酸配列は、casein

kinase 1 によるリン酸化モチーフである SxxxS に対応している。そこで私は、casein kinase 1 が ATP8A1 のリン酸化を担っているという仮説を立てた。Casein kinase 1 には、 $\alpha$ ,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$  の 6 つのアイソフォームが存在する。これらの中から、ATP8A1 をリン酸化する kinase が存在するのを見当をつけるために、各々を RNAi したときの TfnR の局在を調べることにした。その結果、casein kinase 1  $\alpha$  の RNAi によってのみ、TfnR の tubule 化が生じた (data not shown)。この結果より、casein kinase 1  $\alpha$  が ATP8A1 をリン酸化する kinase の有力候補として考えられる。

本研究から、図 5 のようなモデルを考えた。ATP8A1 が casein kinase 1  $\alpha$  によるリン酸化を受け、その活性が上昇する。すると、PS の細胞質側へのフリップが亢進し、PS が REs の細胞質側の膜に濃縮される。その結果、EHD1 が REs へとリクルートされ、REs からの膜輸送が亢進する。本研究は、これまで膜の単なる構成脂質として考えられてきた PS が、膜輸送を制御するシグナル伝達分子のような機能を持つことを示した点で重要である。



【図 5】まとめの図。Casein kinase 1  $\alpha$  が ATP8A1 をリン酸化することにより EHD1 を介する膜輸送を制御する

文献 1: Uchida *et al.*, *PNAS*, 2011

文献 2: Lee *et al.*, *EMBO J*, 2015