

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 李 尚憲

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。近年になり、PSは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が明らかとなった。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も示された。Evectin-2などのPSエフェクター分子は細胞質に存在するため、PSはREsの細胞質側の膜に局在する必要がある。しかしながら、PSがどのようなメカニズムでREsの細胞質側の膜に存在するのかについては不明であった。

そこで本研究で李は、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た。

李は、フリッパーゼと呼ばれる酵素群に着目した。フリッパーゼは、リン脂質を脂質二重膜の細胞質側へとフリップさせる能力を持つ酵素であり、REsにおいてPSを細胞質側へと局在させるのに寄与している可能性が考えられた。哺乳類ではフリッパーゼファミリー分子には全部で14種類が存在するが、李は過去の知見に基づき、ATP8A1というフリッパーゼに着目してその局在を解析した。解析には細胞内オルガネラがよく分離されているCOS-1細胞を用いた。その結果、発現させたATP8A1はリサイクリングエンドソームに選択的に局在することが分かった。

そこで李は、ATP8A1がリサイクリングエンドソームにおけるPSの分布に寄与しているのかを調べることにした。李は、lact-C2と2xPHという2種類のPSプローブタンパク質を用いて、REsの細胞質側と内腔側のそれぞれのPSを染め分ける方法を考案し、これを用いた。これにより、REsの細胞質側の膜にPSが多く内腔側の膜にPSが少ないこと、そして、ATP8A1をRNAiすると内腔側のPSが増加することを示した。すなわち、ATP8A1がREsの内腔側膜から細胞質側膜へとPSをフリップしていることが示唆された。

李は次に、ATP8A1がREsの機能に関与しているのかを調べた。ATP8A1をRNAiした結果、トランスフェリンが載ったREsからの輸送膜の切断異常が起きること、REsからの輸送の遅延が起きることを見出した。さらに、EHD1という膜切断タンパク質のREsの局在がATP8A1 RNAiで失われること、そして、EHD1 RNAiによってもATP8A1 RNAiと同様にREsからの輸送膜の切断異常が起きることを見出した。EHD1はin vitroでPSに結合すること、in vivoで細胞内PS量を減少させるとエンドソーム膜への局在を失うことが分かっている。これらのことから、ATP8A1がPSを細胞質側へとフリップすることを介してEHD1をREsへとリクルートし、REsからの輸送を制御していることが示唆された。

次に李は、ATP8A2というATP8A1に相同性の高いパラログに着目することで、フリッパーゼによ

る膜輸送制御の生理的意義に迫ろうとした。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。李はこれらに着目し、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 (TfR) とよく共局在した。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、TfR 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。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。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 TfR の量が減少していた。このことは、神経細胞における ATP8A2 が TfR 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。

次に李は、ATP8A1 の活性の制御機構に迫ろうとした。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されると言われている。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わかっていない。そこで李は、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。

まず李は、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、

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。リン酸化プロテオームを行った既報に基づいて Ser25, Ser29 がリン酸化されている可能性が高いと考えた李は、これらのアミノ酸残基を変異させた時に  $^{32}\text{P}$  の取込み量が増加するかを検証した。その結果、 $^{32}\text{P}$  の取り込み量は、GFP-ATP8A1 の S29A, S25A/S29A 変異体で減少していた。このことから、Ser29 が ATP8A1 においてリン酸化されていることが分かった。

李は次に、ATP8A1 の Ser29 のリン酸化を認識する抗血清を作製した。この抗血清は、ウェスタンブロットにおいて、過剰発現した ATP8A1 WT に対してシグナルを示した一方で、そのシグナルは phosphatase 処理により消失し、かつ、ATP8A1 S29A に対してはシグナルを示さなかった。このことから、ATP8A1 は Ser29 においてリン酸化されていることが抗血清の結果からも明らかになった。

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、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、S29A 変異体 ATP8A1 がレスキューできるかを評価した。その結果、ATP8A1 S29A 変異体は、野生型と比べて ATPase 活性が减弱していることが分かった。さらに、ATP8A1 を RNAi したときに生じる TfnR の tubule 化は、ATP8A1 S29A でレスキューされなかった。これらのことから、ATP8A1 の活性と機能には Ser29 のリン酸化が必要であることが示唆された。

次に李は、ATP8A1 をリン酸化している kinase を探索することにした。Ser29 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 ExxS に対応している。そこで李は、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。ヒト 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。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。

本研究において李は、リサイクリングエンドソームの細胞質側と PS を局在化させる分子として ATP8A1 を見出し、ATP8A1 による PS のフリップが EHD1 のリクルートを介して REs からの膜輸送を制御することを見出した。さらに、ATP8A1 のパラログである ATP8A2 の遺伝子変異による神経疾患が REs からの膜輸送の破綻に起因することを提示した。そして、ATP8A1/PS/膜輸送という流れが、casein kinase 1  $\alpha$  によるリン酸化という上流からの制御を受けることも示唆した。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り、また、その現象が、神経系の疾患ともリンクすることを提唱している点でも意義深い。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。