

**【目的】** 生体膜は、脂質二重層からなり内葉と外葉において脂質組成の非対称性を保持している。P4-ATPase (フリッパーゼ) は、膜脂質を外葉から内葉に移動 (フリップ) させることで、脂質非対称性を調節しているが、P4-ATPase の調節メカニズムやその生理機能についてはよく分かっていない。これまでに遺伝学的研究から、酵母の P4-ATPase がメンブレントラフィックに関与することが報告されていたが、ヒトの 14 種類の P4-ATPase とメンブレントラフィックの関連はよくわかっていなかった。その中で私たちは、細胞膜における P4-ATPase のフリップ活性の亢進が膜変形を引き起こすことでエンドサイトーシスを促進することおよび P4-ATPase の ATP9A がエンドソームから細胞膜へのリサイクリング経路に関わることを示した。しかし、タンパク質分泌経路における P4-ATPase の機能は不明であった。そこで、本研究では、ゴルジ体に局在する P4-ATPase に着目し、タンパク質分泌経路における P4-ATPase の機能やそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 主にゴルジ体を含む細胞内オルガネラに局在する ATP9A と ATP9B の細胞膜への輸送は、細胞表面のビオチン化により調べた。また、ゴルジ体局在を決定する ATP9B の N 末サイトゾル領域の膜との結合様式については、digitonin を用いた限定的に生体膜を透過させる方法で調べた。タンパク質分泌経路における ATP9A や ATP9B の機能を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて ATP9A および ATP9B のノックアウト細胞を作製した。これらの KO 細胞に温度感受性変異を持つ膜タンパク質の VSVG (tsO45) を発現させ、その細胞膜への輸送を調べた。

**【結果】** 私たちはこれまでに、ATP9A は主にエンドソームやゴルジ体に局在し、ATP9B はゴルジ体だけに局在することを示した。一方で、本研究により ATP9A および一部の ATP9B が細胞膜を介して細胞内でサイクルしていることが分かった。また、ATP9B の N 末端疎水性領域はゴルジ体膜に一部埋め込まれていることを示し、ATP9B がより強固にゴルジ体に留められていることが考えられた。ATP9A や ATP9B のノックアウト細胞を用いて VSVG (tsO45) の細胞膜への輸送を調べたところ、どちらの細胞においても VSVG のゴルジ体から細胞膜への輸送が有意に遅延することが分かった。したがって、ATP9A や ATP9B はゴルジ体から細胞膜へのタンパク質輸送経路において重複する機能を持つことが考えられた。さらに、ATP9A と ATP9B の結合タンパク質を調べたところ、両方ともにメンブレントラフィックに関連する Mon2 と結合することを見出した。ATP9A や ATP9B は、Mon2 のような結合タンパク質と協調してゴルジ体以降のタンパク質分泌経路に関与することが考えられた。

P4-ATPase を介したゴルジ体から細胞膜へのメンブレントラフィックのモデル

