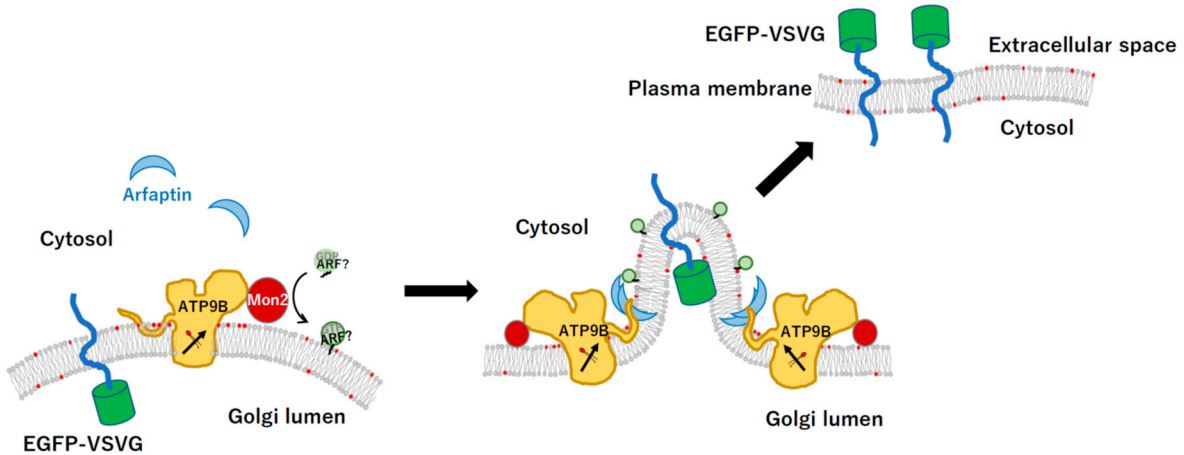
38　タンパク質分泌経路における脂質フリッパーゼの機能	申　恵媛

【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 はゴルジ体のみ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



38. タンパク質分泌経路における脂質フリッパーゼの機能

申　惠媛

京都大学 大学院薬学研究科 生体情報制御学分野

Key words：生体膜，フリッパーゼ，メンブレントラフィック，ゴルジ体，P4-ATPase

緒　言

脂質二重層間の膜脂質の組成変化は、多様な細胞機能において重要な役割を果たしており、量的変化は活発な膜変形を可能にし、質的変化は細胞機能のシグナルとなる。生体膜は、脂質二重層の内葉と外葉においてリン脂質組成の非対称性を保持している。この非対称性は脂質二重層間でのリン脂質のフリップ・フロップによって調節されており、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。このような非対称性は、様々な生体機能に重要な役割を果たす。例えば、細胞膜において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）はほとんど細胞膜内葉側にしか存在しないが、PS が細胞膜外葉への露出はアポトーシスを起こした細胞の除去や血小板凝集に重要な役割を果たす。さらに、一時的な PS の露出は筋芽細胞や破骨細胞の融合、神経細胞の再生および退縮、免疫反応などに重要であることが示唆されている［1］。PE の非対称性の調節は、酵母においては細胞極性、線虫においてはエキソソーム形成に関与することが報告されている。

これまでに遺伝学的研究から、酵母の 5 種類のすべての P4-ATPase は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るが［2］、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。私たちのグループでは、これまでに細胞膜における P4-ATPase のフリップ活性の亢進が細胞膜を内側に変形させることを示し、この膜変形が細胞の形態変化およびエンドサイトーシスを促進することを示した［3，4］。さらに、エンドソームに局在する ATP9A がトランスフェリン受容体のエンドソームから細胞膜へのリサイクリングに関与することを示した［5］。一方で、タンパク質の分泌経路における P4-ATPase の関与は不明であった。そこで本研究では、ゴルジ体に局在する ATP9A や ATP9B に着目し、タンパク質の分泌経路における機能およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。P4-ATPase のうち、ATP9A は主にエンドソームやゴルジ体に局在し、ATP9B はゴルジ体のみに局在することを示したが［6］、その一部は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局在することを示唆した。ATP9A や ATP9B のノックアウト細胞を用いた解析により、ATP9A や ATP9B は膜タンパク質のゴルジ体から細胞膜への輸送に必要であることが明らかになった。さらに、ATP9A と ATP9B が、メンブレントラフィック関連タンパク質である Mon2 と結合することを見出した。ATP9A と ATP9B は、このような結合タンパク質と協調してゴルジ体以降の輸送に関わる可能性が示唆された。

方　法

1. ATP9A および ATP9B 安定発現細胞の作製および細胞表面のビオチン化

Retrovirus を用いて ATP9A あるいは ATP9B を安定発現する HeLa 細胞を作製した。細胞表面のタンパク質を検出するために、4℃で細胞表面のタンパク質とビオチンを架橋した。細胞抽出液にストレプトアビジンビーズを添加して pull down し、イムノブロットにより細胞表面タンパク質を検出した。

2. ATP9A および ATP9B のノックアウト細胞株の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて ATP9A あるいは ATP9B のノックアウト（KO）細胞株を樹立し、シークエンス解

析によってゲノム編集による KO を確認した。

3. VSVGtsO45 の輸送アッセイ

ATP9A-KO および ATP9B-KO 細胞に EGFP-VSVG（tsO45）タンパク質を発現させ、非許容温度の 40℃で 16 hr 以上インキュベートし、EGFP-VSVG（tsO454）を小胞体に蓄積させた。その後、これらの細胞を許容温度の 32℃で一定時間インキュベートした後、固定した。固定した細胞には、界面活性剤を処理せず、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行うことで、細胞膜に輸送された EGFP-VSVG の量を比較検討した。

結果および考察

1. ATP9A および ATP9B の細胞内輸送

ATP9A と ATP9B は他の P4-ATPase ファミリータンパク質とは異なり、シャペロン様のタンパク質である CDC50 と結合しない［6］。主に ATP9A や ATP9B は細胞内オルガネラに局在するが、これらのタンパク質が細胞膜に存在していないかを細胞表面をビオチン化することにより調べた。その結果、ATP9A および ATP9B 両方ともに CDC50A あるいは CDC50B 有無にかかわらず、一部細胞膜にも存在することが分かった（図 1a）。特に ATP9A は、より多く細胞膜に存在することが分かった。したがって、ATP9A や ATP9B は主に細胞内オルガネラに局在するが、定常状態で細胞膜を介して細胞内をサイクルしていることが考えられた。

ATP9A や ATP9B の C 末端細胞質領域には、チロシンモチーフ（YXXΦ）が存在していた（図 1b）。これまでに私たちは、P4-ATPase の ATP10B、ATP11C のサイトゾル領域に存在するジロイシンモチーフ（D/EXXXL/I）がこれらの細胞内輸送を調節することを明らかにした［7，8］。ジロイシンモチーフと同様にチロシンモチーフも、クラスリンアダプタータンパク質と結合することで膜タンパク質の細胞内輸送を制御している。したがって、この C 末端のチロシンモチーフが ATP9A や ATP9B の細胞内輸送や細胞内局在を調節する可能性が考えられた。

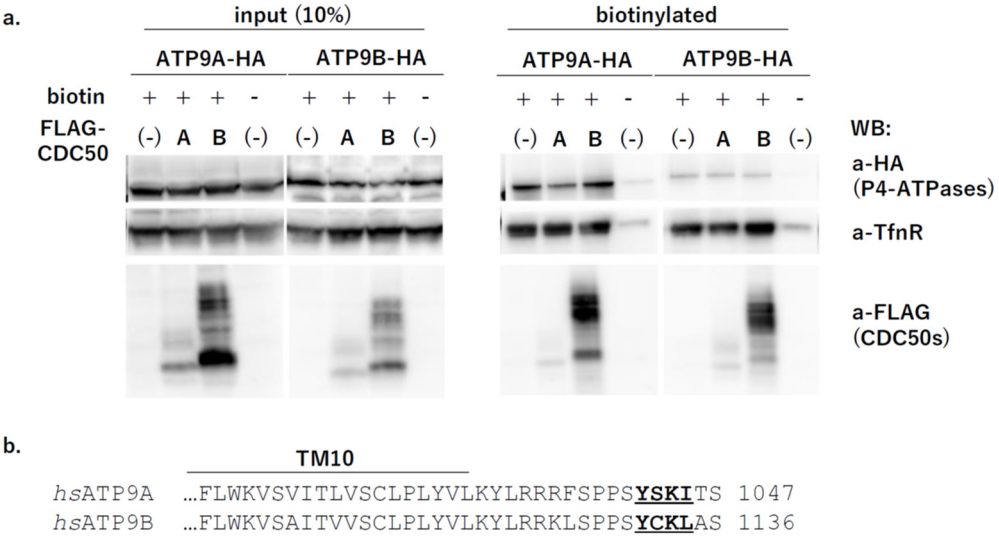


図 1. ATP9A および ATP9B の細胞内輸送

a) HeLa 細胞に ATP9A-HA および ATP9B-HA を単独および FLAG-CDC50A あるいは CDC50B と共発現させた。細胞表面に biotin を共有結合させた後、細胞抽出液に streptavidin beads を添加し pulldown することで細胞表面のタンパク質を回収して各抗体を用いてイムノブロットを行った。

b) ヒトの ATP9A と ATP9B の C 末サイトゾル領域のアミノ酸配列の比較。太字下線部がチロシンモチーフ（YXXΦ）。TM10：transmembrane membrane 10。

2. ATP9A および ATP9B の KO 細胞の作製とオルガネラマーカータンパク質の局在

私たちは ATP9A のノックダウンにより、トランスフェリン受容体のエンドソームから細胞膜へのリサイクリングが遅延することを見出した［5］。一方で、ATP9A および ATP9B が共通してゴルジ体に局在することから、これらがゴルジ体から細胞膜への輸送経路に関与する可能性を考えて検討した。そのために、ATP9A および ATP9B をそれぞれノックアウト（KO）した細胞株を樹立した。まず、それぞれ 2 種類のノックアウト細胞クローンを用いて細胞内オルガネラの分布を調べたところ、エンドソーム、ゴルジ体、リソソームに局在するオルガネラマーカータンパク質の局在には顕著な異常が認められなかった（図 2）。したがって、ATP9A および ATP9B の KO によってオルガネラの分布には影響を与えないことが示唆された。

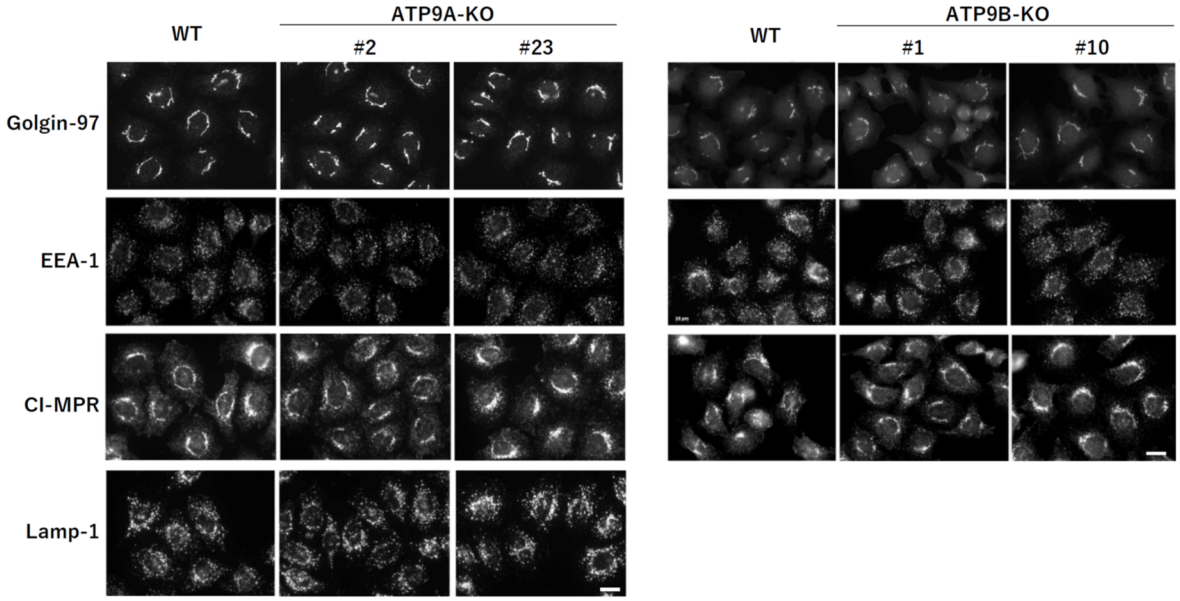


図 2. ATP9A および ATP9B のノックアウト細胞におけるオルガネラ分布
CRISPR/Cas9 システムを用いて ATP9A および ATP9B それぞれの KO 細胞株を樹立した。それぞれの KO の 2 種類のクローンにおいて免疫染色により様々なオルガネラマーカーの局在を観察した。Golgin-97：trans-Golgi network（TGN）marker、EEA1：early endosome marker、CI-MPR：TGN/endosome marker、Lamp-1：late endosome marker。
スケールバー：20 μ m。

3. ATP9A と ATP9B のノックアウト細胞における膜タンパク質の細胞膜への輸送

次に、ATP9A および ATP9B の KO によるタンパク質分泌経路を調べた。そのために、これらの KO 細胞にウイルス由来の膜タンパク質 VSVG の温度感受性変異体（tsO45）を発現させその細胞膜への輸送を調べた。VSVG（tsO45）タンパク質は、非許容温度の 40℃では、フォールディングがうまく行かず小胞体に留まるが、許容温度の 32℃では小胞体からゴルジ体を経て細胞膜へと輸送される。EGFP-VSVG（tsO45）をそれぞれの KO 細胞に発現させ、40℃から 32℃にシフトしてから 1 時間インキュベートした後細胞表面に到達した EGFP-VSVG を観察した。細胞を固定してから透過処理をせずに抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行うことで、細胞表面の EGFP-VSVG のシグナルを調べた。40℃でインキュベートした細胞では、細胞表面の EGFP-VSVG は検出されなかった。また、40℃では小胞体におけるフォールディング異常により、EGFP のシグナルも検出されなかった（図 3、左パネル）。一方で、32℃でインキュベートした後はどの細胞でも EGFP-VSVG のシグナルがゴルジ体で強く検出された（図 3、右パネル）ので、各 KO 細胞における EGFP-VSVG の発現およびゴルジ体への輸送には影響がないことが考えられた。興味深いことに、32℃でイン

キュベートした後、細胞表面に露出した EGFP-VSVG の量は ATP9A と ATP9B の KO 細胞において有意に低下していることが分かった（図 3、右パネル）。したがって、ATP9A や ATP9B はともに VSVG のゴルジ体から細胞膜への輸送経路に必要であることが明らかになった。この輸送経路において、ATP9A や ATP9B が重複する機能を持つ可能性が考えられたので、ダブルノックアウト細胞を作製し VSVG の輸送を調べる予定である。また、これらの輸送経路に ATP9A や ATP9B の flippase 活性が必要であるかどうかについては、今後野生型および ATPase 活性欠損型をそれぞれの KO 細胞に発現させ、VSVG 輸送の回復を調べる予定である。また、ATP9A や ATP9B の基質は不明だが、線虫のオルソログは PE を基質とし、細胞膜からのエキソソームの形成を負に制御していることが報告されている［9］。ATP9A や ATP9B の基質の同定は、今後の課題である。

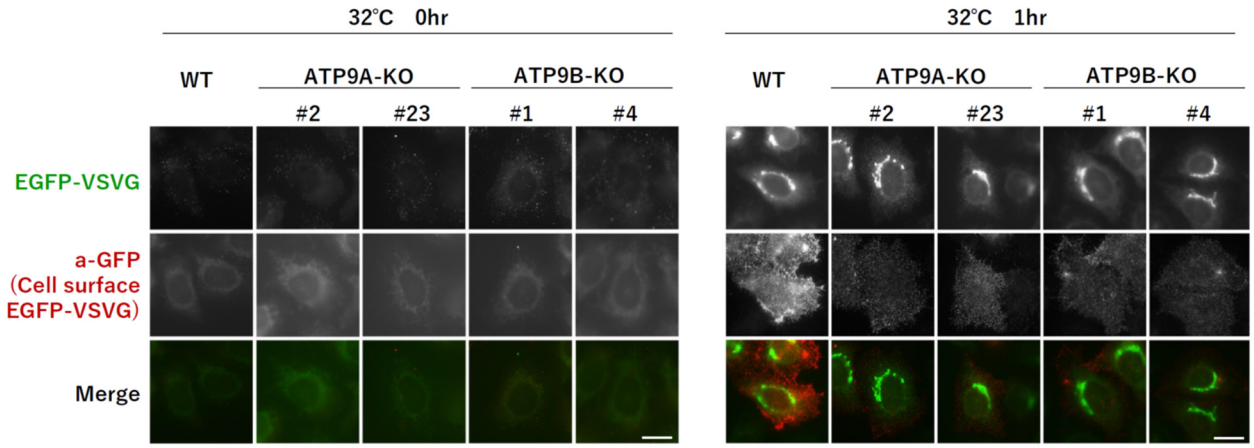


図3. ATP9AおよびATP9Bのノックアウト細胞における膜タンパク質の輸送
それぞれのKO細胞にEGFP-VSVG（tsO45）タンパク質を発現させ、40℃でインキュベートした後32℃で0 hr、1 hrインキュベートした。細胞を固定後、膜透過処理をせずに抗GFP抗体を用いて細胞表面に輸送されてEGFP-VSVGを染色した。スケールバー：20 μm。

4. ATP9A および ATP9B の結合タンパク質

ATP9A や ATP9B がどのようなメカニズムでゴルジ体からのタンパク質輸送を調節しているかについてさらに研究を進めた。そのなかで興味深いことに、ATP9A や ATP9B が Mon2 と結合することを見出した（図 4）。Mon2 は、低分子量 GTPase の ARF ファミリータンパク質に対する GDP/GTP 交換因子（GEF）の類似タンパク質として同定されたが、GEF 活性の中心である Sec7 ドメインを持たない特徴がある。Mon2 は、主にエンドソームからゴルジ体への輸送経路に関わることが報告されていたが［10］、ゴルジ体からのタンパク質の分泌経路に関与するかは不明であった。Mon2 に対する抗体を作製し、その局在を調べたところ ATP9A や ATP9B と同様にゴルジ体に局在していた。現在、ATP9A や ATP9B は Mon2 との結合を介してゴルジ体からのタンパク質輸送に関与する可能性を考えている。今後、Mon2 がゴルジ体以降の輸送経路に関与するか、P4-ATPase と Mon2 の結合がタンパク質輸送経路にどのようなメカニズムで関与するかについて調べていく予定である。

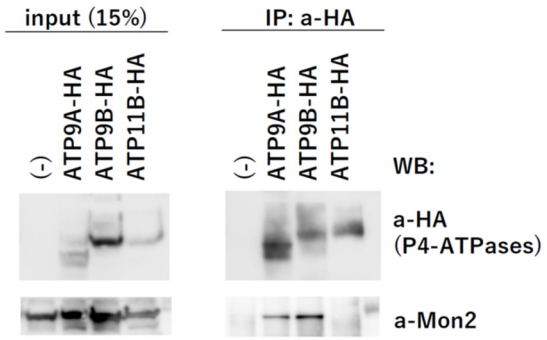


図 4. ATP9A と ATP9B の結合タンパク質として Mon2 を発見
ATP9A-HA、ATP9B-HA、ATP11B-HA を安定に発現する HeLa 細胞を用いて抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行った。Mon2 が ATP9A および ATP9B と共沈降することが分かった。

文　献

1) Shin HW, Takatsu H. Phosphatidylserine exposure in living cells. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2020;55(2):166-78. Epub 2020/05/16. doi: 10.1080/10409238.2020.1758624. PMID: 32408772.

2) Muthusamy B-P, Natarajan P, Zhou X, Graham TR. Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2009;1791(7):612-9. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.03.004. PMID: 19286470.

3) Takada N, Naito T, Inoue T, Nakayama K, Takatsu H, Shin HW. Phospholipid-flipping activity of P4-ATPase drives membrane curvature. EMBO J. 2018;37(9):e97705. doi: 10.15252/embj.201797705. PMID: 29599178.

4) Naito T, Takatsu H, Miyano R, Takada N, Nakayama K, Shin HW. Phospholipid Flippase ATP10A Translocates Phosphatidylcholine and Is Involved in Plasma Membrane Dynamics. J Biol Chem. 2015;290(24):15004-17. doi: 10.1074/jbc.M115.655191. PMID: 25947375.

5) Tanaka Y, Ono N, Shima T, Tanaka G, Katoh Y, Nakayama K, Takatsu H, Shin HW. The phospholipid flippase ATP9A is required for recycling pathway from endosomes to the plasma membrane. Molecular biology of the cell. 2016;27(24):3883-93. doi: 10.1091/mbc.E16-08-0586. PMID: 27733620.

6) Takatsu H, Baba K, Shima T, Umino H, Kato U, Umeda M, Nakayama K, Shin HW. ATP9B, a P4-ATPase (a Putative Aminophospholipid Translocase), Localizes to the trans-Golgi Network in a CDC50 Protein-independent Manner. J Biol Chem. 2011;286(44):38159-67. doi: 10.1074/jbc.M111.281006. PMID: 21914794.

7) Okamoto S, Naito T, Shigetomi R, Kosugi Y, Nakayama K, Takatsu H, Shin HW. The N- or C-terminal cytoplasmic regions of P4-ATPases determine their cellular localization. Molecular biology of the cell. 2020;31(19):2115-24. Epub 2020/07/03. doi: 10.1091/mbc.E20-04-0225. PMID: 32614659.

8) Takatsu H, Takayama M, Naito T, Takada N, Tsumagari K, Ishihama Y, Nakayama K, Shin HW. Phospholipid flippase ATP11C is endocytosed and downregulated following Ca2+-mediated protein kinase C activation. Nature communications. 2017;8(1):1423. doi: 10.1038/s41467-017-01338-1. PMID: 29123098.

9) Wehman AM, Poggioli C, Schweinsberg P, Grant BD, Nance J. The P4-ATPase TAT-5 Inhibits the Budding of Extracellular Vesicles in C.elegans Embryos. Current Biology. 2011;21(23):1951-9. doi: 10.1016/j.cub.2011.10.040. PMID: 22100064.

10) Mahajan D, Boh BK, Zhou Y, Chen L, Cornvik TC, Hong W, Lu L. Mammalian Mon2/Ysl2 regulates endosome-to-Golgi trafficking but possesses no guanine nucleotide exchange activity toward Arl1 GTPase. Scientific reports. 2013;3:3362. doi: 10.1038/srep03362. PMID: 24285343.