

Eat Me!! 細胞死を司る脂質輸送体の作動メカニズムが 電子顕微鏡による構造解析で明らかに！

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の中西 華代 研究員と阿部 一啓 准教授の研究グループは、東京大学、大阪大学、東京医科歯科大学のチームと共同で、細胞が自発的な死（アポトーシス）を遂げる際に表面に露出し『Eat Me! (私を食べて!)』シグナルとして働く脂質（フォスファチジルセリン）の輸送に関与するフリッパーゼ、ATP11C の構造解析に成功しました。

クライオ電子顕微鏡によって、ATP11C が脂質を輸送している途中の過程を含む複数の構造を明らかにし、このタンパク質がどのように脂質を輸送しているかが明らかになりました。

この研究成果は、2020年9月29日付（日本時間9月30日午前0時）米国オンライン科学雑誌「Cell Reports」に掲載されました。

この研究は、科学研究費補助金、JST-CREST、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業および創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団、内藤記念財団ならびに経済産業省（新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）、日本医療研究開発機構（AMED））の支援のもとで行われたものです。

1. 概要

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の中西華代研究員、阿部一啓准教授の研究グループは、東京大学、大阪大学のチームと共同で、細胞が自発的な死（アポトーシス）を遂げる際に表面に露出し『Eat Me! (私を食べて!)』シグナルとして働く脂質（フォスファチジルセリン）の輸送に関与するフリッパーゼという種類の膜タンパク質、ATP11Cの構造解析に成功しました。

研究グループは、クライオ電子顕微鏡により ATP11C が脂質を輸送している状態を含む複数の構造を解析し、このタンパク質がどのように脂質を輸送しているかを明らかにしました。

本研究成果は、2020年9月29日に米国科学雑誌 Cell Reports 誌に掲載されました。

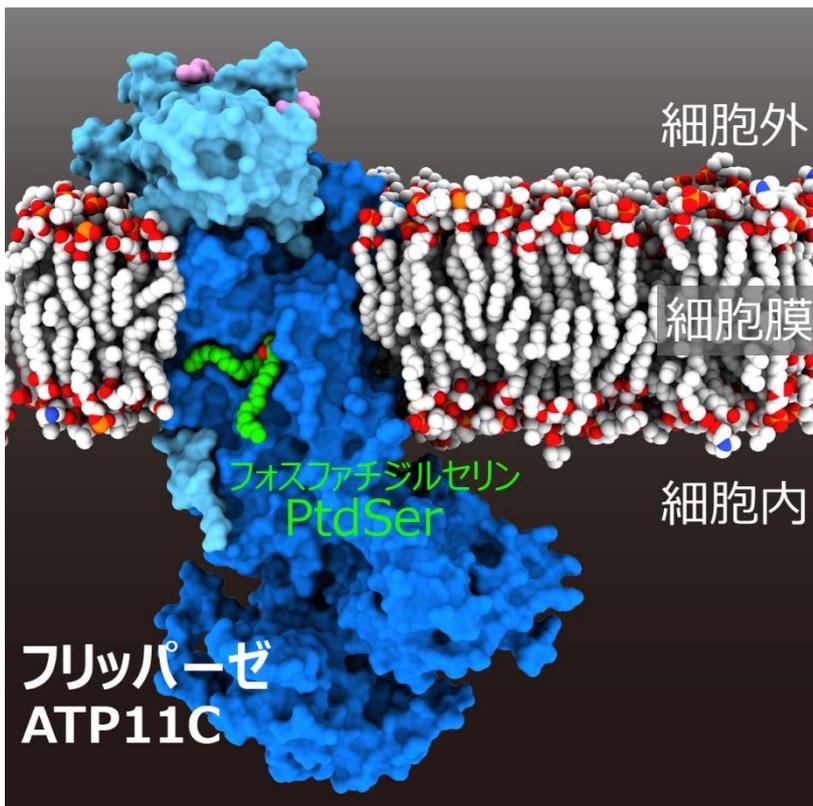


図1 フリッパーゼ ATP11C

細胞膜は数種類のリン脂質を主成分とした脂質二重層を形成している。ATP11Cという膜タンパク質は、ATPのエネルギーを使って、細胞膜の構成成分であるリン脂質の一種、フォスファチジルセリン（PtdSer）を細胞膜の外側の層から内側へとひっくり返す、『フリップ』する働きを持つ、フリッパーゼである。ATP11Cの働きによって、細胞膜表面には PtdSer が非常に少ない状態が作り出されている。

【ポイント】

- ✓ 細胞のプログラム死（アポトーシス）における一連のプロセスの最終段階を担うタンパク質の構造が解明された。
 - 新しい作用機序の薬剤開発へ
- ✓ これまで謎であった、巨大な基質（フォスファチジルセリン）を輸送する仕組みの一部が分子レベルで解明された。

2. 背景

我々の体は約 37 兆個もの細胞で出来ています。しかし、これらの細胞はずっと変わらずに存在する訳ではなくて、常に新陳代謝しています。我々ヒトの場合、数十億もの細胞が毎日死んでゆき、代わりに新しい細胞が生まれてくる、ということを繰り返しています。細胞が自発的な死を遂げる現象は**アポトーシス** (Apo- 離れる、ptosis 下降、「枯れ葉が木から落ちる」という意味を持つ) と呼ばれ、個体の発生や恒常性維持に欠かせないプロセスです。木々の落葉や、オタマジャクシがカエルになる過程でしっぽが無くなる現象も、アポトーシスによるものです。我々の体の中でもアポトーシスは重要な役割を果たしています。例えば、ある細胞の遺伝子に修復不能な傷がついてしまった場合、細胞はアポトーシスへの道を選択することで、ガン化することなく我々の体から除去されます。



我々の体には、死んだ細胞だけを選択して除去するシステムがあります。マクロファージと呼ばれる免疫細胞の一種は、アポトーシスを起こした死細胞を見つけて、これを貪食（どんしょく）してくれます。しかしマクロファージは、当然生きている細胞は貪食しません。これはアポトーシスを起こした細胞が『**Eat Me!**』シグナル、つまり『私を食べて!』という目印を提示するからです。この『**Eat Me!**』シグナルとして使われているのが、細胞膜の構成成分であるリン脂質の一種、**フォスファチジルセリン (Phosphatidylserine, PtdSer)** と呼ばれる脂質です (図 2)。

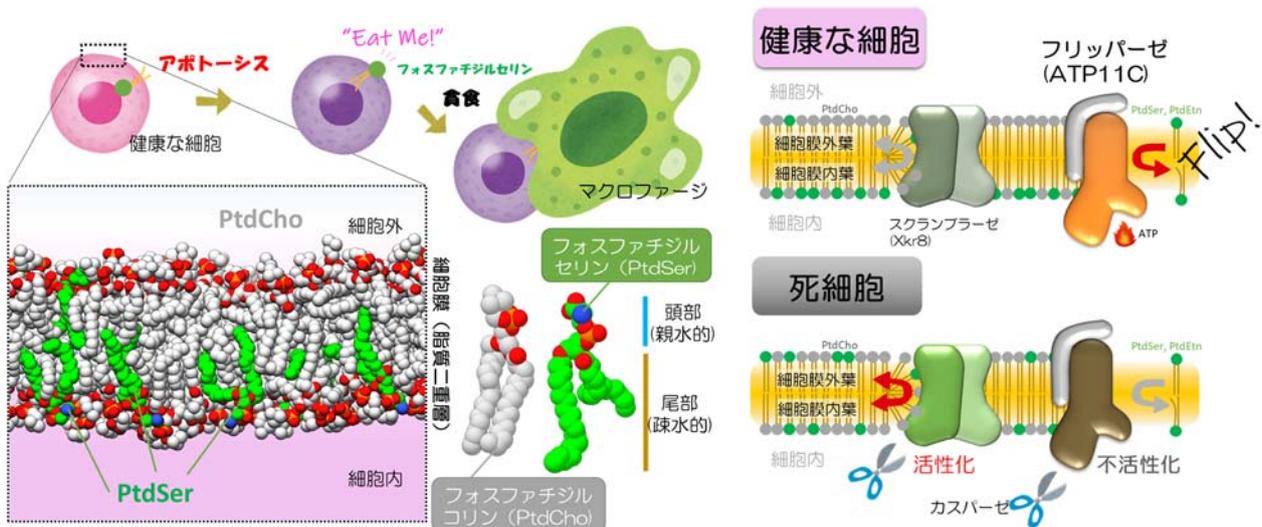


図 2 細胞のプログラム死 アポトーシスと Eat Me シグナル

(左) 細胞膜はリン脂質を主成分として、それらが疎水的な尾部を内側にした脂質二重層で出来ている。生きている細胞では、PtdSer は内側の層に多く分布している。アポトーシスが起これると、PtdSer が外側に露出し、これが『**Eat Me!**』シグナルとなって、死細胞はマクロファージに貪食される。

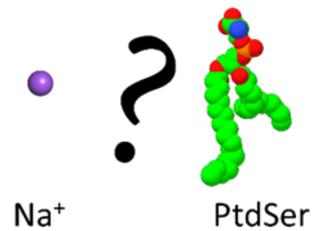
(右) 健康な細胞では、フリッパーゼ ATP11C が PtdSer を常にフリップしているため、外側の層での PtdSer の量は少ない。アポトーシスを起こした死細胞では、カスパーゼが ATP11C を切断して働けなくしてしまう。同時にカスパーゼは、リン脂質を無差別に入れ替えるスクランブラーゼを活性化させる。結果として、PtdSer が細胞膜の外側の層に露出する。

細胞膜はリン脂質が 2 重になった層で出来ています。生きている細胞の細胞膜表面には、PtdSer は殆ど無く、細胞膜の内側の層に蓄えられています。これは脂質を外側から内側の層へ

とひっくり返す(フリップさせる)働きをもつ、**フリッパーゼ**と呼ばれる膜タンパク質、**ATP11C**が、常に **PtdSer** を内側へとひっくり返しているからです(図2)。しかし、ひとたび細胞がアポトーシスを選択すると、細胞の中ではカスパーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素が登場し、この ATP11C フリッパーゼを切断してしまいます。そのため、細胞膜ではもう **PtdSer** をひっくり返せなくなってしまいます。カスパーゼは、同時に脂質を両方向に入れ替えるスクランブラーゼを活性化します。結果として死細胞では、**PtdSer** が細胞表面に露出、**『Eat Me!』** シグナルとなって、マクロファージによって貪食されます(図2)。この仕組みのお陰で、我々の体の中では一日に数十億という細胞が、不要な炎症を引き起こすことなく除去されています。

ATP11C は P 型 ATPase ファミリーという膜タンパク質のグループに分類されます。P 型 ATPase は、細胞内エネルギー通貨である ATP (アデノシン三リン酸) を燃料として、主に無機イオンを能動輸送するタンパク質の一群で、イオンポンプとも呼ばれます。胃酸を分泌するプロトンポンプや、細胞内外でのナトリウムの濃度勾配を形成するナトリウムポンプ等がこれに含まれます。しかし P 型 ATPase ファミリーの中で、ATP11C を含む P4 フリッパーゼのグループだけは、イオンと比べて巨大な脂質をフリップする、つまり輸送するわけです。どうしてそんなことができるのか? これは**『Giant substrate problem (巨大な基質問題)』**と呼ばれる謎でした。

Giant substrate problem



3. 研究成果

(1) ATP11C の複数の反応中間体における立体構造

研究グループは、ヒト培養細胞で ATP11C を発現、精製し、東京大学の最新鋭のクライオ電子顕微鏡システム(文末の解説を参照)を用い、5つの異なる状態の構造を合計6つ、3.0~4.0Å分解能で解析することで、ATP11C がどのようにATPのエネルギーを利用して巨大な脂質を輸送するかを理解することができました(図3)。

ATP11C が脂質を輸送する機構は、他のイオンを輸送する P 型 ATPase と類似した機構(Post-Albers 機構)によって、幾つかの反応中間体を経ることでタンパク質全体に渡る大きな構造変化を伴って進行すると考えられています。今回の構造解析では、この反応機構の主要な中間体をほぼすべて網羅しており、ATPの加水分解とリン脂質輸送の共役が分子レベルで理解できました。

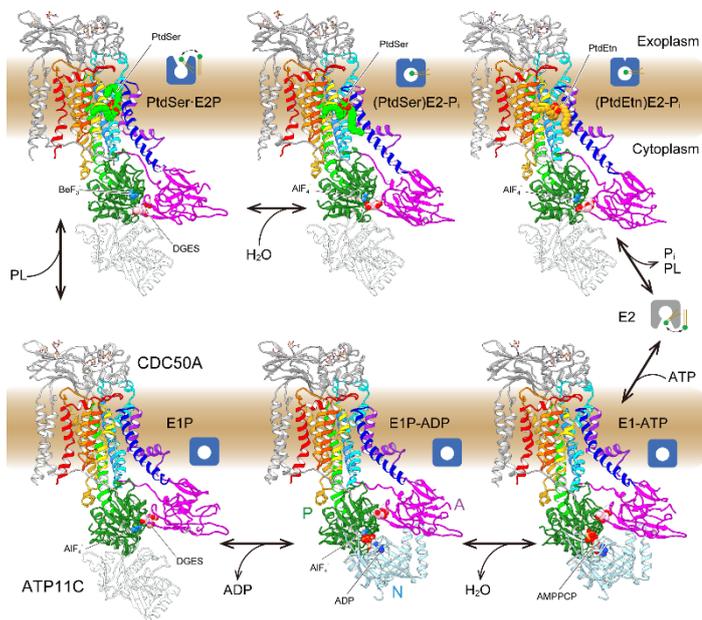


図3 ATP11Cの反応サイクルと中間体の構造
今回構造解析された6つの構造。右下から時計周りに中間体を遷移することで、ATPの加水分解反応と連動した**PtdSer**の輸送が行われる。

(2) リン脂質結合構造と脂質輸送機構

今回解析された 6 つの構造の内、3 つの構造はリン脂質が結合した状態です (図 4)。このうち 1 つは ATP11C が細胞外から **PtdSer** を取り込む瞬間の状態、もう 2 つはリン脂質の頭部がタンパク質に完全に取り込まれた (閉塞された) 状態でした (**PtdSer** と **PtdEtn** (フォスファチジルエタノールアミン) についてそれぞれ 1 つずつの構造)。これらの構造解析によって、それぞれのリン脂質がどのように ATP11C によって認識されているかが (図 5)、またこれら 2 つの状態の構造を繋ぎ合わせて考えることで、**PtdSer** が細胞膜表面からどのように ATP11C に取り込まれるかが詳細に理解できました (図 6)。

細胞膜の表面から **PtdSer** が取り込まれる際、ATP11C は細胞外に向けて脂質の入口 (ゲート) を開いており、細胞膜表面に位置するゲートから膜貫通部位中央までが深い溝のような構造で繋がっていました。**PtdSer** は、その溝に親水的な頭部を突っ込んで、疎水的な尾部をタンパク質表面に張り付かせるようにして結合していました (図 4)。**PtdSer** の頭部は、膜貫通ヘリックス 4 番 (TM4) が膜内部でほどけた位置において、フリッパーゼで高度に保存された親水性アミノ酸によって配位されていたが、取り込み状態では比較的緩く結合していることがわかりました (図 5)。

PtdSer をフリップさせるためには、脂質頭部は一度タンパク質内部に取り込まれる必要があります。次に ATP11C は細胞外へ開いたゲートを閉じることで、脂質頭部を完全に膜貫通領域に取り込みます。閉じたゲート部分 TM1-2 に存在する親水基が **PtdSer** の親水的な頭部と水素結合を形成することから、このゲートの閉塞は

PtdSer の結合自体によって引き起こされると考えられます。この閉塞状態において、**PtdSer** は周囲の親水的アミノ酸や酸素原子によってタイトに配位されます。**PtdEtn** は **PtdSer** と比べカルボキシル基がないので、閉塞時に形成できる水素結合の数が少なく、このことは **PtdEtn** が **PtdSer** に比べて輸送される活性が低いことを説明します (図 5)。ゲートが閉じるという構造変化は、TM ヘリックスを伝わって細胞質ドメインへと伝播し、反応サイクルを次の段階へ進めることがわかりました。

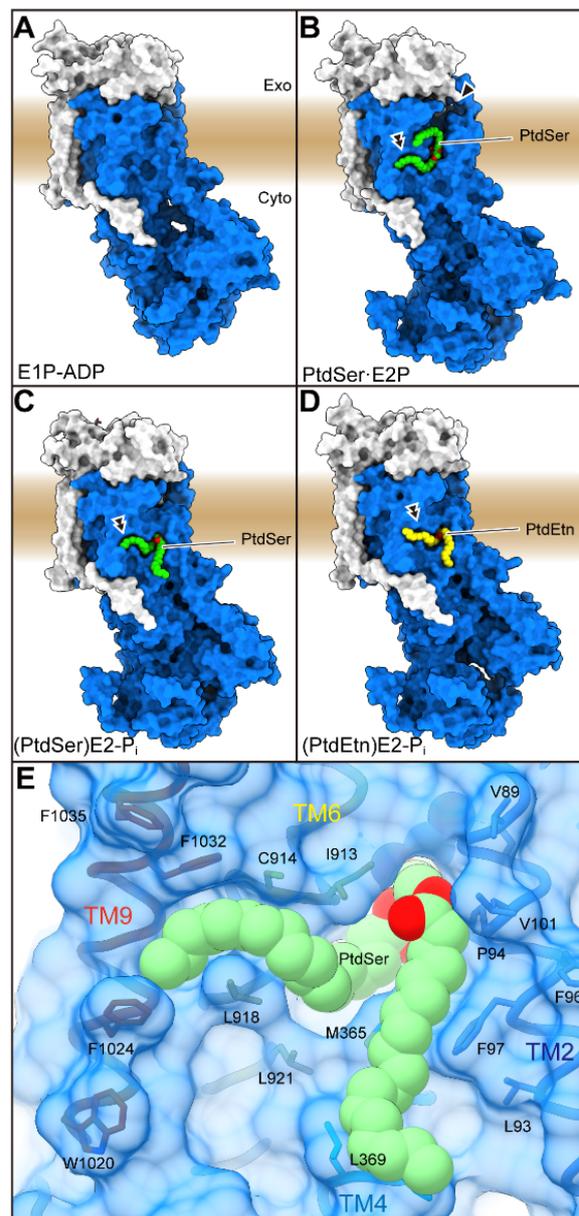


図 4 ATP11C のリン脂質結合構造

- A. リン脂質が結合する前の段階
- B. **PtdSer** を取り込む状態
- C. **PtdSer** を閉塞した状態
- D. **PtdEtn** を閉塞した状態
- E. **PtdSer** がタンパク質の周りに結合した状態の拡大図

ゲートが閉じる際の構造変化は、脂質の認識にも関わっています。細胞膜の構成成分の多くはフォスファチジルコリン (PtdCho) と呼ばれる成分ですが、ATP11C は PtdSer と PtdEtn を認識してフリップします。PtdCho は PtdSer よりも少し大きくて、親水的な相互作用を作りにくい脂質です。ゲートを閉じる構造変化には、PtdSer の末端のカルボキシル基が、ゲートに相当する膜貫通ヘリックス 1 番と 2 番の間の親水的なアミノ酸と水素結合を形成する必要がありますことがわかりました。つまり、結合した脂質が

PtdSer であれば水素結合を形成することでゲートを閉じることができですが、PtdCho ではゲートを閉じることが出来ないわけです。このようにして ATP11C は自分がフリップすべき脂質を見分けていることが理解できました。

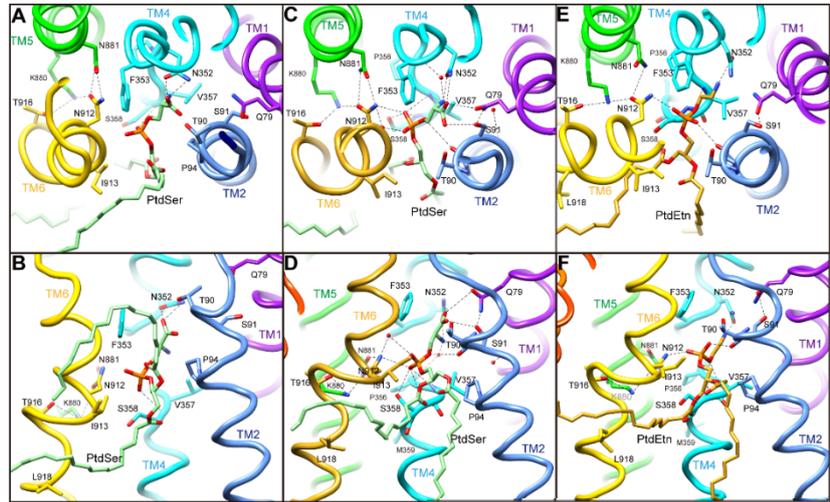
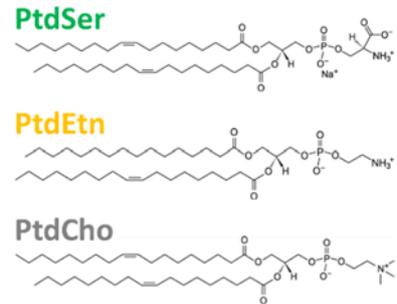


図 5 ATP11C のリン脂質結合部位の拡大図

A,B. PtdSer を取り込む状態
C,D. PtdSer を閉塞した状態
E,F. PtdEtn を閉塞した状態

リン脂質の化学構造→



(3) ATP11C のリン脂質輸送機構モデル

今回構造解析された 5 つの中間体構造から、ATP11C が PtdSer を細胞膜の外側の層から取り込むために、どうやって細胞外のゲートを開いて、これを取り込み、ゲートを閉じるのか。一連の構造変化とその鍵となるファクターが明らかになり、これらを ATP11C によるリン脂質輸送モデルとして提唱しました (図 6)。リン脂質結合状態の構造情報やその輸送機構の理解は、新たな作用機序をもった抗がん剤等の薬剤開発へと繋がることを期待されます。

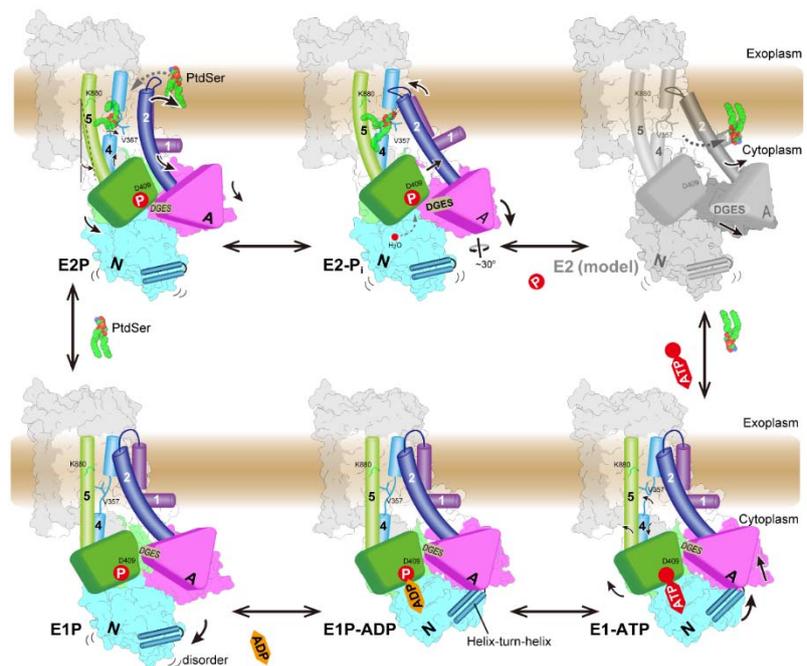
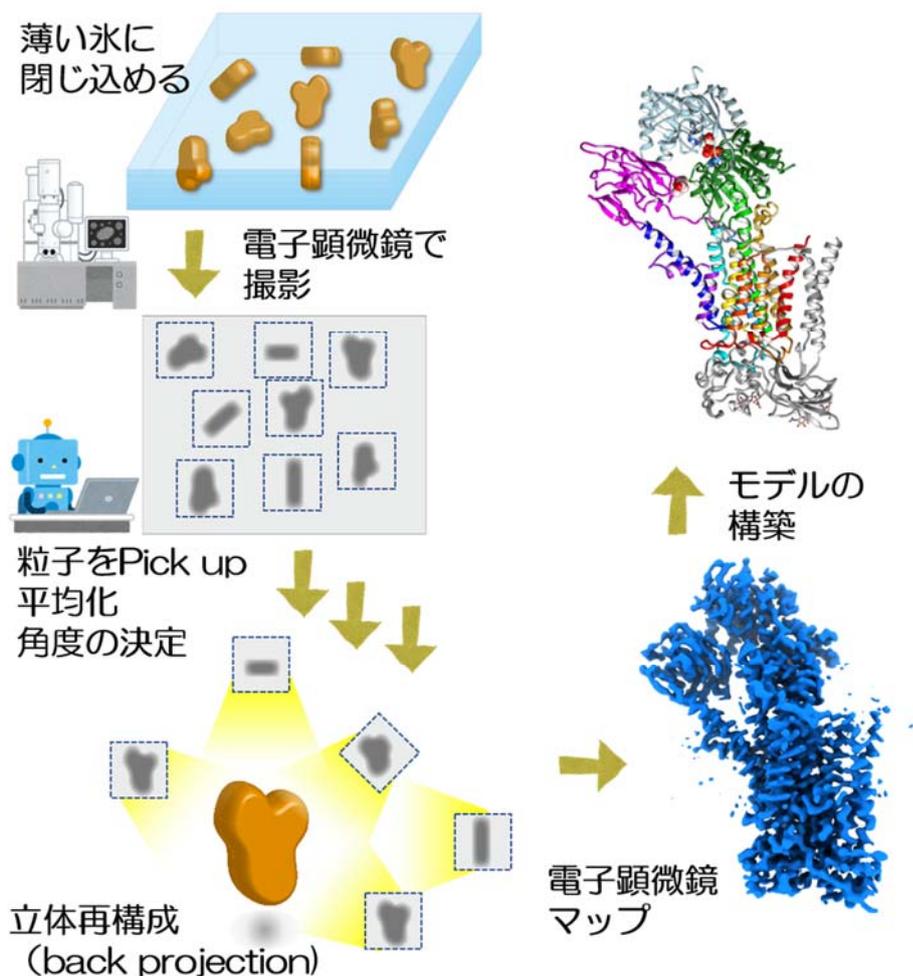


図 6 ATP11C のリン脂質輸送モデル

ATP の加水分解やリン脂質輸送反応に伴うドメインの動きや膜貫通ヘリックスの変化が詳細に理解できた。

解説 クライオ電子顕微鏡による単粒子解析



純度の高いタンパク質を薄い氷の中に閉じ込めて、**クライオ電子顕微鏡**（クライオ＝低温という意味）で画像を撮影する（実際には高速動画）。画像には、いろいろな方向を向いたタンパク質が粒子として映っているが、それぞれの写真はノイズが多くてよくわからない。

そこで、コンピューター上で同じ方向を向いている粒子の写真を重ね合わせて、数十万粒子の画像から立体構造を構築する。この方法によって高い解像度でタンパク質の立体構造が得られる。この方法の開発に貢献した3名の研究者（Richard Henderson, Jacques Dubochet, Joachim Frank）が2017年にノーベル化学賞を受賞した。従来のX線による解析にはタンパク質の三次元結晶が必要であり、そのため限られたものしか構造解析できなかったが、この方法は結晶を必要とせず、原理的には精製されたタンパク質さえあれば、迅速、簡便に構造を決定することができる。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金・基盤研究（B）（課題番号 17H03653）、JST-CREST（JPMJCR14M4）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（BINDS, JP19am0101074）および創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（JP19am0101115j003, 支援番号 1925）、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団、内藤記念財団、経済産業省（新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）、日本医療研究開発機構（AMED））による支援を受けて行われました。

【論文情報】

「Cell Reports」(発表日：2020年9月29日 Online版)

タイトル：Transport cycle of plasma membrane flippase ATP11C by cryo-EM

著者：中西華代^{1,7}、西澤知宏^{2,7}、瀬川勝盛³、濡木理²、藤吉好則^{4,5}、長田重一³、阿部一啓^{1,6,8}

1. 名古屋大学細胞生理学研究センター
2. 東京大学理学研究科
3. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター
4. 東京医科歯科大学高等研究院
5. 株式会社 CeSPIA
6. 名古屋大学創薬科学研究科
7. Co-first author
8. Corresponding author

DOI : doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108208