

## 膜脂質の分子運動を標的にした新たな抗がん剤開発に向けての基礎研究

## 1. はじめに

細胞運動は、組織や器官形成などの個体発生だけでなく、免疫応答やガンの浸潤・転移などさまざまな病態にも深く関与している。我々は、生体膜中でのリン脂質分子の局在と分子運動の制御機構とその生物学的意義について研究を進めている。この研究の過程で、細胞膜を構築する脂質二重層の内外を横切る脂質のとんぼ返り運動（フリップ・フロップ）がアクチン細胞骨格系の再編を制御し、細胞の分裂や形態形成において重要な役割を果たすことを明らかにしてきている。さらに、細胞膜上でのリン脂質分子のフリップ・フロップを制御する新たなタンパク質 mROS3 を同定し、その機能解析を進めた結果、同タンパク質を介するリン脂質分子のフリップ・フロップが細胞運動の制御においても重要な役割を果たしていることを示唆する知見を得た。

本研究では、mROS3 タンパク質を介するリン脂質フリップ・フロップ運動がいかなるメカニズムでアクチン骨格の再編と細胞運動の制御を行っているのか、その分子機構を明らかにすべく研究を進めた。

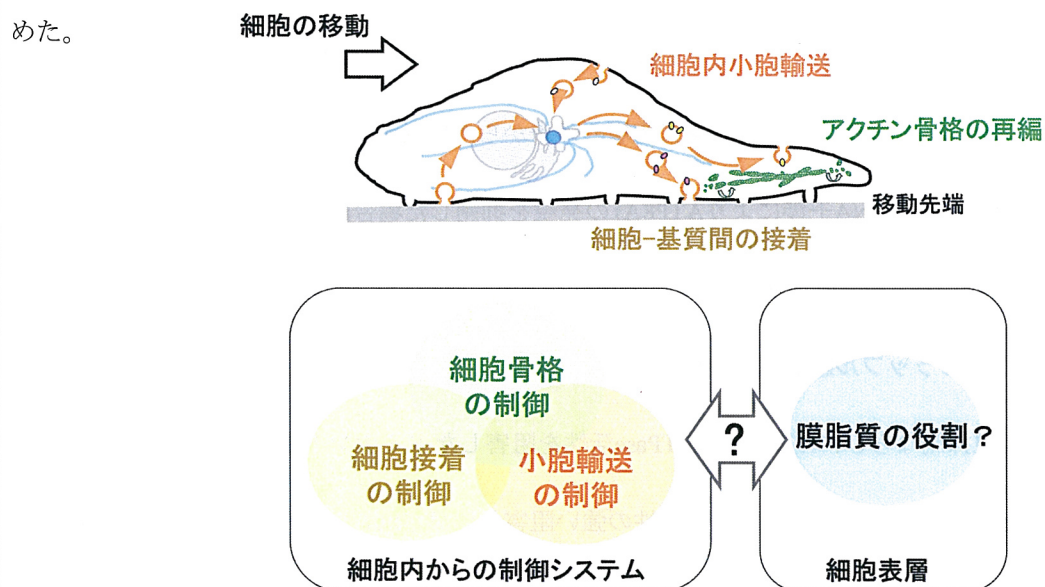


図1 細胞運動におけるダイナミックな膜動態と膜リン脂質の果たす役割

## 2. 方法

これまでの解析により、リン脂質フリップ・フロップの新たな制御分子として同定したmROS3タンパク質を培養哺乳動物細胞に過剰発現すると、活発な細胞膜のラッフルリングを引き起こすと共にBoyden-chamber法による細胞遊走活性を顕著に促進することを見出している。一方、mROS3タンパク質の発現を抑制すると、遊走活性が強く阻害されることが明らかとなった。これらの知見は、mROS3タンパク質がリン脂質のフリップ・フロップ運動の活性化を介して、アクチン骨格の再編を促すことによりラッフル膜の形成ならびに細胞運動の活性化を引き起していることを示唆している。本研究では、培養哺乳動物細胞CHO-K1細胞を主な研究材料として用い、mROS3を介するリン脂質フリップ・フロップの制御機構を明らかにし、さらに同分子を介する細胞骨格の再編と細胞運動制御の分子機構を明らかにすることを試みた。

## 3. 結果 研究成果

### 1) mROS3はType4 P型ATPase ATP8A1と複合体を形成し、リン脂質フリッパーゼとして機能する

抗mROS3抗体による免疫沈降物の解析ならびに細胞の蛍光抗体染色法により、mROS3はType4 P型ATPase ATP8A1と複合体を形成し、小胞体からゴルジ体・リサイクリングエンドソームを経由してATP8A1の形質膜への輸送を制御していることが明らかとなった。mROS3の発現を抑制した場合、ATP8A1が形質膜へと移行することが出来ずにリン脂質、特に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)の形質膜脂質二重層の外層から内層(細胞質側)への移行が阻害されることが示された。一方、RNA干渉によりATP8A1の発現を抑制した場合にもリン脂質のフリップ・フロップが阻害され、特にPEの輸送が顕著に阻害されることが明らかとなった。

### 2) mROS3/ATP8A1のラッフル膜形成における役割

ATP8A1の発現抑制ならびにATP8A1のATPase活性を阻害したドミナントネガティブ変異体の発現により、Boyden-chamber法による細胞遊走活性の強い阻害が観察された。また、遊走細胞の先端端のラッフル膜へATP8A1分子が強く濃縮して存在することが明らかとなった。さらに、mROS3あるいはATP8A1の発現を抑制すると、低分子量Gタンパク質Arf6並びにその下流で働くRac1タンパク質の形

質膜への移行が阻害され、その結果ラ  
 ッフル膜の形成抑制により細胞運動  
 が顕著に低下することが明らかとな  
 った。また、mROS3の過剰発現による  
 細胞遊走活性の促進もArf6のドミナン  
 トネガティブ体の発現により抑制さ  
 れることが示された。

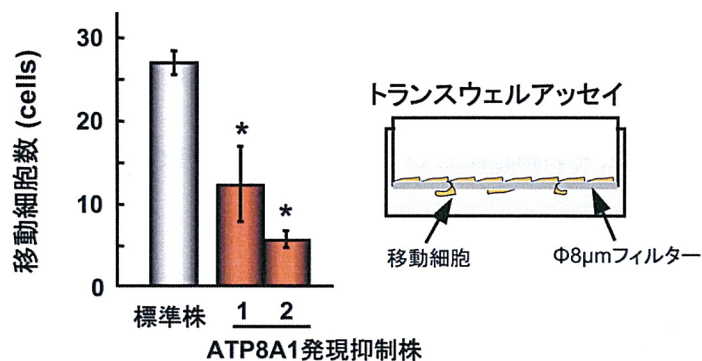


図2 ATP8A1の発現抑制による細胞運動の阻害

### 3) 細胞表面のリン脂質分子トラップによる細胞運動の阻害

これまでの解析により、mROS3/ATP8A1複合体の形質膜上への発現が細胞運動の制御において重  
 要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、ATP8A1の発現を抑制した際には、細胞表面  
 でのPEの取り込みは強く阻害されたが、PSの取り込みに顕著な変化は観察されなかった。そこで、  
 形質膜上でのいかなるリン脂質の輸送が細胞運動の進行に関与するのか、リン脂質結合プローブを培  
 養細胞に添加し、細胞表面上の各種リン脂質分子の動きをトラップした際の細胞運動に及ぼす影響を  
 検討した。その結果、ホスファチジルエタノールアミン(PE)分子をトラップした際にのみ強い細胞運  
 動の阻害が観察された。

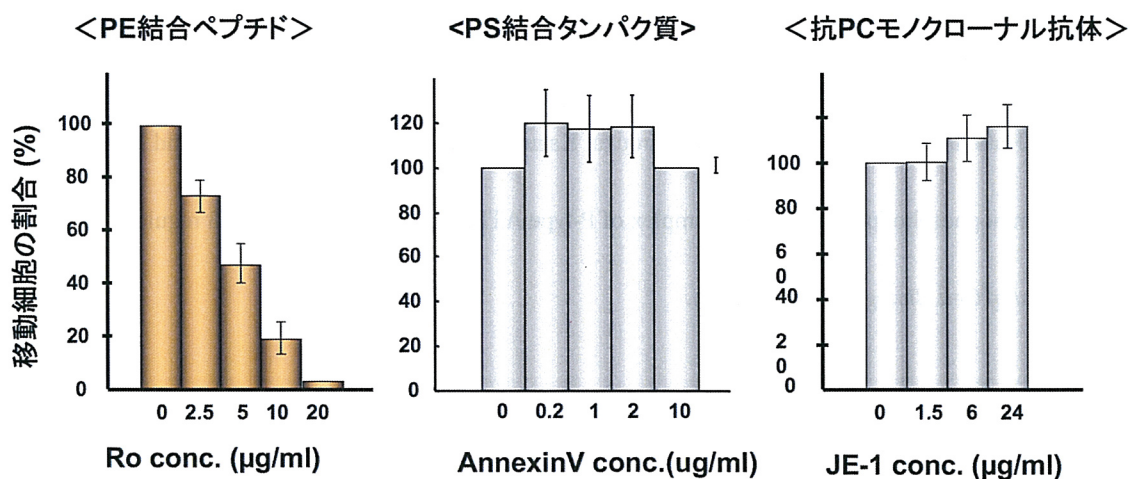


図3 細胞膜表面のリン脂質トラップによる細胞運動の阻害

PE : ホスファチジルエタノールアミン、PS : ホスファチジルセリン、PC : ホスファチジルコリン

#### 4. 考察 まとめ

P型ATPase ATP8A1タンパク質は、1996年にリン脂質フリッパーゼ活性を担う最初の分子として同定されたが、その細胞膜上での機能は長い間不明であった。本研究により、mROS3/ATP8A1複合体によるリン脂質、特にPE分子のフリッ

プ・フロップを介する膜

脂質分子の配向性の変

化が、Arf6等の低分子

量Gタンパク質活性化

の引き金となり、アクチ

ン細胞骨格の再編と細

胞運動の制御に重要な

役割を果たしていることが明らかと

なった。

今後、小分子有機化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより、膜脂質分子の運動を標的とした細胞浸潤阻害剤の検索を進め、新たな作用機序に基づくがん治療薬開発の基礎を築くべく、一層努力したい。

#### 5. 発表論文、参考文献

Utako Kato, Hironori Inadome, Hotsue Shirouzu, Kazuo Emoto, Toshihide Kobayashi, and Masato Umeda.

“An aminophospholipid translocase complex of P-type ATPase ATP8A1 and mROS3 regulates cell migration”

*Journal of Cell Biology*, under revision.

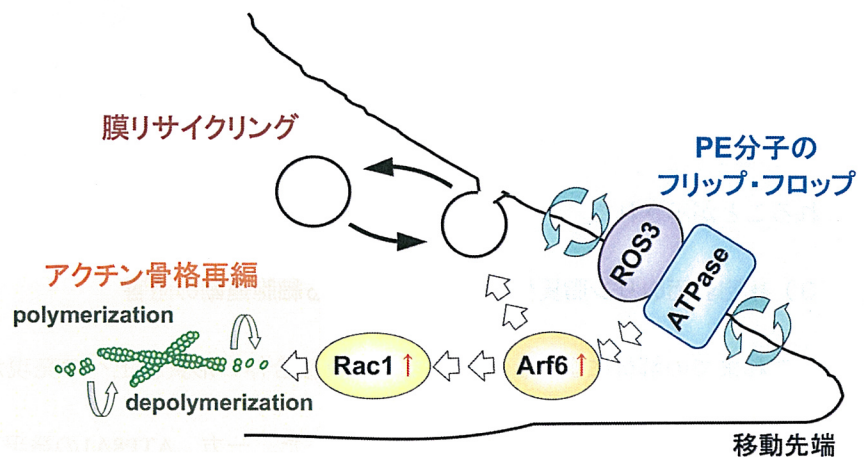


図4 mROS3/ATP8A1 複合体は Arf6 タンパク質の局在と活性制御を介して細胞運動を制御する