

学 位 論 文 題 名

酵母スフィンゴシンキナーゼ Lcb4p の
リン酸化による調節機構の解明

学位論文内容の要旨

これまでに、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は細胞間シグナル伝達物質であるとともに、細胞内セカンドメッセンジャーとしても働く極めてユニークな生理活性物質であることが明らかにされてきた。出芽酵母では細胞内で S1P の代わりに長鎖スフィンゴイド塩基 1-リン酸 (LCBP) が同様の働きをしており、LCBP は長鎖スフィンゴイド塩基キナーゼである Lcb4p、Lcb5p によって生合成される。また、その活性のほとんどは Lcb4p によるものである。LCBP は生理活性を持つことから、細胞内量は厳密に制御されていることが予想されるが、そのメカニズムは全く不明であった。そこで本研究では Lcb4p の調節機構の解明を目指した。

Lcb4p に対する抗体を作製してイムノブロットィングを行ったところ、2 本のバンドが検出された。そこでリン酸化である可能性を調べるため、タンパク質抽出液に対してアルカリフォスタファアーゼを用いた脱リン酸化処理を行った。その結果、Lcb4p のバンドはすべて低分子量側にシフトしたことから、Lcb4p はリン酸化されていることが明らかとなった。リン酸化は主要な翻訳後修飾機構の一つであることから、Lcb4p のリン酸化も何らかの機能の調節に関わっていると考えられたので、まず Lcb4p をリン酸化するプロテインキナーゼの同定を目指した。酵母ではプロテインキナーゼとして 117 遺伝子が同定されている。そこで、欠損させても生存可能である 101 種の各遺伝子欠損株からタンパク質を抽出し、イムノブロットィングにより Lcb4p を検出した。その結果、サイクリン依存性キナーゼに属する Pho85p を欠損した変異株中でのみ、リン酸化型 Lcb4p が検出されなかった。 $\Delta pho85$ 欠損株では脱リン酸化処理を行っても Lcb4p のバンドはシフトしないことから、Pho85p が Lcb4p のリン酸化に関わることが明らかとなった。さらに、Lcb4p の認識にはサイクリン Pcl2p、Pcl1p が関わることを明らかにした。また、Pho85p はプロリン指向性の Ser/Thr キナーゼであり、Ser または Thr の後に Pro が続く配列を認識する。Lcb4p 点突然変異体を作成して Lcb4p のリン酸化部位の同定を目指した結果、455 番目の Ser がリン酸化されていることを見いだした。

次に、細胞内における Lcb4p のリン酸化の役割について検討を行った。Lcb4p のリン酸化は酵素活性や細胞内局在には影響していなかったが、パルスチェイス実験を行って調べた結果、安定性に影響していることが明らかとなった。Lcb4p は野生株中では半減期約 3 時間で分解していたが、 $\Delta pho85$ 欠損株中では Lcb4p は安定化しており、8 時間チェイス後でも少量の Lcb4p が検出された。また、Lcb4p の分解にはユビキチンが関与するかどうかを調べるために、脱ユビキチン化酵素 $\Delta doa4$ 欠損株を用いて調べた。 $\Delta doa4$ 欠損株ではユビキチンがリサイクルされず、細胞内のユビキチン量が減少することが知られている。その結果、 $\Delta doa4$ 欠損株では Lcb4p の分解が抑制されていること

が明らかとなった。これらのことから、Lcb4p の分解にはユビキチンが関与している可能性が示唆された。

また、これまでに Lcb4p の活性は増殖安定期で減少することが報告されている。増殖安定期における Lcb4p の発現を調べた結果、野性株では増殖安定期において Lcb4p の発現量が著しく低下していたのに対し、 $\Delta pho85$ 欠損株では安定して存在していることが明らかとなった。さらに、 $\Delta doa4$ 欠損株では Lcb4p が増殖安定期に達して 40 時間後でも安定して存在していた。これらのことから、Lcb4p は培地中の栄養が枯渇する増殖安定期で分解によるダウンレギュレーションを受けることが明らかとなった。また、リン酸化がこの分解シグナルとして働いていることが示された。

さらに、Lcb4p の分解経路について検討を行った。ユビキチンはプロテアソームでのタンパク質分解のシグナルとして働くことが広く知られている。そこで Lcb4p のプロテアソームにおける分解の可能性について、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて調べた。その結果、野性株、LCB4 過剰発現株ではともにプロテアソーム阻害剤の有無で Lcb4p の量に変化が無く、また、約 10 kDa 高分子量側に検出されるユビキチン化された Lcb4p の量もまた変化していなかった。これらの結果から、Lcb4p の分解はプロテアソームで行われているのでは無いということが示唆された。

近年プロテアソームによるタンパク質分解とは異なるユビキチンの機能が明らかにされており、ユビキチンはエンドサイトーシスの取り込みだけではなく、内腔に小胞を含んだエンドソームである multivesicular body (MVB) への選別シグナルとしても機能していることが示された。そこで、Lcb4p がユビキチン化に依存して小胞輸送されている可能性について調べた。その結果、MVB の形成に欠損がある変異株では増殖安定期における Lcb4p の分解が抑制されていた。このことから、Lcb4p は MVB を介して輸送されていることが明らかとなった。また、EGFP-LCB4 融合タンパク質を発現した株を用い、対数増殖期と増殖安定期における Lcb4p の局在を調べた結果、野性株は対数増殖期では Lcb4p は細胞膜に局在していた。一方、増殖安定期では Lcb4p は細胞膜への局在が減少して液胞に移行していることが明らかとなった。この局在の変化は $\Delta pho85$ 欠損株や $\Delta doa4$ 欠損株では見られなかったことから、Lcb4p は増殖安定期では分解のために液胞へ輸送されていることが明らかとなった。さらに、液胞に存在するプロテアーゼの欠損株を用いて調べた結果、 $\Delta pep4\Delta prb1$ 二重欠損株や $\Delta pep4\Delta prc1$ 二重欠損株では増殖安定期における Lcb4p の分解が抑制されていた。これらのことから、増殖安定期では Lcb4p は MVB を介して液胞に輸送されて分解されていることが明らかとなった。

以上、本論文では酵母 LCB キナーゼである Lcb4p の量はリン酸化によって調節されており、その発現量は増殖安定期においてダウンレギュレーションされていることを明らかにした。これまでに LCBP の細胞内量は増殖安定期における細胞周期の G1/G0 期での停止に重要な働きをしていることが知られている。このことと本論文の結果を考え合わせると、リン酸化によって調節される増殖安定期の Lcb4p の分解は、外界の栄養低下に対する適応において重要であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 五十嵐 靖 之
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助教授 井ノ口 仁 一
副 査 助教授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

酵母スフィンゴシンキナーゼ Lcb4p の リン酸化による調節機構の解明

これまでに、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は細胞間シグナル伝達物質であるとともに、細胞内セカンドメッセンジャーとしても働く極めてユニークな生理活性物質であることが明らかにされてきた。出芽酵母では細胞内で S1P の代わりに長鎖スフィンゴイド塩基 1-リン酸 (LCBP) が同様の働きをしており、LCBP は長鎖スフィンゴイド塩基キナーゼである Lcb4p、Lcb5p によって生合成される。また、その活性のほとんどは Lcb4p によるものである。LCBP は生理活性を持つことから、細胞内量は厳密に制御されていることが予想されるが、そのメカニズムは全く不明であった。そこで本研究では Lcb4p の調節機構の解明を目指した。

抗 Lcb4p 抗体を作製して解析を行った結果、Lcb4p はリン酸化されていることを見いだした。リン酸化は主要な翻訳後修飾機構の一つであることから、Lcb4p のリン酸化も何らかの機能の調節に関わっていると考えられた。そこでまず Lcb4p のリン酸化に関わるキナーゼの同定を目指した。酵母ではプロテインキナーゼとして 117 遺伝子が同定されており、そのうち 101 種類は欠損させても生存可能である。これらの欠損株を用いて調べた結果、サイクリン依存性キナーゼ Pho85p が Lcb4p のリン酸化に関わっていることが明らかとなった。また、Lcb4p の認識にはサイクリン Pcl2p、Pcl1p が関わることを明らかにした。さらに、Pho85p による Lcb4p の推定リン酸化部位の点突然変異体を作成して調べた結果、Lcb4p の 455 番目の Ser がリン酸化されていることを見いだした。

次に、細胞内における Lcb4p のリン酸化の役割について検討を行った。パルスチエイイス実験を行って調べた結果、 $\Delta pho85$ 欠損株中では野生株に比較して Lcb4p が安定化していたことから、Lcb4p のリン酸化は安定性に影響していることが明らかとなった。また、Lcb4p の分解にはユビキチンが関与するかどうかを調べるため、ユビキチンがリサイクルされずに細胞内のユビキチン量が減少することが知られている、脱

ユビキチン化酵素 $\Delta doa4$ 欠損株を用いて調べた。その結果、 $\Delta doa4$ 欠損株では Lcb4p の分解が抑制されていることが明らかとなった。これらのことから、Lcb4p の分解にはユビキチンが関与している可能性が示唆された。

また、これまでに Lcb4p の活性は増殖安定期で減少することが報告されている。増殖安定期における Lcb4p の発現を調べた結果、野生株ではその発現量が著しく低下していたのに対し、 $\Delta pho85$ 欠損株では安定化していることが明らかとなった。さらに、 $\Delta doa4$ 欠損株ではより安定化していた。これらのことから、Lcb4p は培地中の栄養が枯渇する増殖安定期で分解によるダウンレギュレーションを受けることが明らかとなった。また、リン酸化がこの分解シグナルとして働いていることが示された。

さらに、ユビキチンを介した Lcb4p の分解経路について解析を行った。近年ユビキチンはエンドサイトーシスの取り込みだけではなく、内腔に小胞を含んだエンドソームである multivesicular body (MVB) への選別シグナルとしても機能していることが示されている。そこで Lcb4p がユビキチン化に依存して輸送されている可能性を検討した。その結果、MVB の形成に欠損がある変異株では、増殖安定期における Lcb4p の分解が抑制されていた。このことから、Lcb4p は MVB を介して輸送されていることが明らかとなった。また、EGFP-LCB4 融合タンパク質を発現した株を用い、対数増殖期と増殖安定期における Lcb4p の局在を調べた。その結果、野生株において Lcb4p は対数増殖期では細胞膜に局在していたが、増殖安定期では細胞膜への局在が減少して液胞に局在していた。この局在の変化は $\Delta pho85$ 欠損株や $\Delta doa4$ 欠損株では見られなかったことから、Lcb4p は増殖安定期では分解のために液胞へ輸送されていることが明らかとなった。さらに、液胞に存在するプロテアーゼの欠損株を用いて調べた結果、 $\Delta pep4\Delta prb1$ 二重欠損株や $\Delta pep4\Delta prc1$ 二重欠損株では増殖安定期における Lcb4p の分解が抑制されていた。これらのことから、増殖安定期では Lcb4p は MVB を介して液胞に輸送されて分解されていることが明らかとなった。

以上、本論文では酵母 LCB キナーゼである Lcb4p の量はリン酸化によって調節されており、その発現量は増殖安定期においてダウンレギュレーションされていることを明らかにした。これまでに LCBP の細胞内量は増殖安定期における細胞周期の G1/G0 期での停止に重要な働きをしていることが知られている。このことと本論文の結果を考え合わせると、リン酸化によって調節される増殖安定期における Lcb4p の分解は、外界の栄養低下に対する適応において重要であると思われる。