

ヒト血小板と酵母を用いたスフィンゴシン1-リン酸の 動態、シグナル、生成調節機構の解明

学位論文内容の要旨

(血中におけるスフィンゴシン1-リン酸とリゾホスファチジン酸の生成機構の解析)

スフィンゴシン1-リン酸(S1P)とリゾホスファチジン酸(LPA)は、血中に存在する生理活性脂質である。これまで、LPAの生成経路には、血小板の活性化に伴い放出される経路と、血小板の外で生成される経路の2つがあると考えられていた。しかし、前者の経路に関しては、血小板からS1Pは放出されるが、LPAは放出されないという矛盾した報告があり、また、後者の経路に関しても実際には証明されていない。そこで、本研究では、(1)血小板からのLPA、S1P放出の有無、(2)LPAの血小板外での生成経路の2点について検討した。その結果、血小板からLPA、S1Pの両方が血小板の活性化に伴い放出され、その放出様式がそれぞれ異なることを明らかにした。また、血小板の活性化によって放出されるホスホリパーゼA₁、A₂と血漿中のリゾホスホリパーゼDにより血小板外でLPAが生成される機構を示唆した。

(フィトスフィンゴシン耐性酵母変異株の単離とその解析)

動物細胞ではS1Pは、細胞膜表面上にあるS1P/Edgファミリー受容体を介して、細胞増殖や細胞運動の制御などの作用を引き起こす。一方、S1Pは細胞内においても働き、アポトーシスの抑制やカルシウム動員などの作用を引き起こす。しかし、細胞内S1Pのターゲット因子は未だ同定されておらず、そのシグナル経路は全く不明である。また、S1P生成調節機構に関しても、スフィンゴシンキナーゼのリン酸化による調節機構が最近明らかとされてきたが、まだ不明な点が多く残されている。

酵母ではS1Pは存在しないが、構造が非常に類似したフィトスフィンゴシン-1リン酸(PHS1P)やジヒドロフィンゴシン-1リン酸(DHS1P)といったLong-chain base 1-phosphate(LCBPs)がシグナル分子として働くことが知られている。LCBPsの合成、分解に関わる酵素は、動物細胞と酵母で非常によく保存されている。しかし、酵母におけるLCBPsの作用は、細胞表面にLCBPsに対する受容体が存在しないため細胞内での作用のみである。そのため、細胞内におけるLCBPの機能について研究する際、酵母を用いての解析は有効な手段であると考えられる。本研究では、酵母を用いて培地中のPHSに耐性な変異株を単離し、その原因遺伝子の解析をすることにより、LCBP生成調節機構及びシグナル経路を明らかにすることを目的とした。

酵母は細胞内にLCBPsが過剰蓄積すると、細胞死を引き起こすことが知られる。そのため、LCBP分解酵素DPL1及びLCBP脱リン酸化酵素LCB3を欠損した株($\Delta dpl1 \Delta lcb3$)は、培地中のPHSに対する感受性が非常に高い。この現象を利用し、酵母($\Delta dpl1 \Delta lcb3$)のゲノムヘトランスポゾンランダムに挿入させることにより、培地中のPHSに耐性となった株を単離した。得られた変異株の原因遺伝子として、以前に報告されたLCB4、PDR5遺伝子に加えて、新たに8種の遺伝子(PBP1、HEM14、UFD4、HMG1、TPS1、KES1、WHI2、ERG5)を同定した。

PHS耐性酵母変異株が培地中のPHSに耐性を獲得する1つの機構として、細胞内へのPHSの細胞内への蓄積の低下が考えられる。その可能性について検討してみたところ、得られた

変異株のうち、PHS の蓄積が低下したことが原因で、PHS に耐性を示しているのは *pdr5* 変異株だけであることが示唆された。次に、酵母 LCB キナーゼ Lcb4p の発現の低下が、もう 1 つの PHS 耐性獲得機構として考えられたので、それぞれの変異株からライセートを調製し、抗 Lcb4p 抗体を用いてイムノプロットングを行った。野生株では、Lcb4p に相当するバンドが 2 本検出され、上のバンドがリン酸化された Lcb4p のバンドである。その結果、Lcb4p の発現は、得られた変異株のうち、 $\Delta hem14$ 変異株において著しく、 $\Delta hmg1$ 変異株において少し低下した。また、Lcb4p のリン酸化は $\Delta hem14$ 、 $\Delta hmg1$ 、 $\Delta kes1$ 、 $\Delta erg5$ 変異株において減少していた。これらの結果から、(1) LCB の輸送には *PDR5* 遺伝子、(2) LCBP の生成調節機構には *HEM14*、*HMG1*、*KES1*、*ERG5* 遺伝子、(3) LCBP シグナルには *PBP1*、*UFD4*、*TPS1*、*WHI2* 遺伝子が関わっていることが示唆された。

HEM14、*HMG1*、*KES1*、*ERG5* 遺伝子の変異株において、Lcb4p のリン酸化が低下した原因について調べるためには、Lcb4p のリン酸化機構を明らかにする必要がある。そこで、Lcb4p がどこに局在し、どこでリン酸化を受けるかどうかについては不明であったので、それらについて検討を行った。まず、Lcb4p の局在について検討を行った。Lcb4p 抗体を用いて細胞を染色すると、細胞膜周辺部が染まることが報告されている。しかし、酵母での小胞体は細胞膜に近接した Cortical ER と核膜とつながった Nuclear ER が存在するため、細胞膜周辺部が染まった場合、細胞膜と Cortical ER に局在する可能性が残る。そこで、細胞膜と小胞体を分けるために、シヨ糖密度勾配遠心法を用いて Lcb4p の局在について調べた。その結果、Lcb4p は主に小胞体に局在し、一部が細胞膜に局在することが明らかとなった。間接蛍光抗体法では Nuclear ER が染まらないことから、Lcb4p は ER の中でも Cortical ER だけに局在する非常に特殊な局在を示すことが示唆された。次に、Lcb4p がどこでリン酸化を受けるかどうかについて検討した。Lcb4p は翻訳後修飾としてリン酸化だけではなく、パルミトイル化を受けることが知られる。Lcb4p がパルミトイル化されない変異株 ($\Delta akr1$) では、Lcb4p のリン酸化が低下する。また、Lcb4p をパルミトイル化する酵素 (*Akr1p*) はゴルジ体に局在する。これらのことから、Lcb4p はゴルジ体でパルミトイル化された以降にリン酸化を受ける可能性が考えられた。そこで、まず、ゴルジ体から細胞膜への輸送に異常を示す *sec1* 変異株、*sec6* 変異株を用いて調べた。*sec* 変異株は 23°C では正常な輸送を示すが、37°C では輸送が止まる温度感受性の変異株である。その結果、*sec1* 変異株、*sec6* 変異株において、37°C にシフトすると Lcb4p のリン酸化が抑制された。このことから、Lcb4p はゴルジ体から輸送された後にリン酸化を受けることが示唆された。

HEM14、*HMG1*、*KES1*、*ERG5* は細胞膜構成成分であるエルゴステロールの合成や局在に関わる遺伝子であるので、エルゴステロールが Lcb4p のリン酸化に関わっている可能性が考えられた。そこで、他のエルゴステロール合成に関わる遺伝子の欠損株を作成し、Lcb4p のリン酸化について調べた。その結果、これらの変異株中においても Lcb4p のリン酸化の低下が認められた。このことから、エルゴステロールの異常が Lcb4p のリン酸化の低下を引き起こすことが明らかとなった。次に、エルゴステロール合成変異株において、Lcb4p のリン酸化が低下する原因として、Lcb4p の局在変化の可能性が考えられたので、 $\Delta erg6$ 変異株を用いて、シヨ糖密度勾配遠心法によって局在を調べた。その結果、細胞膜での Lcb4p の局在が見られなくなり、ほとんどが小胞体に局在していた。このことから、Lcb4p の局在異常が、Lcb4p のリン酸化を低下させた可能性が示唆された。

以上、酵母を用いた解析から、LCBP 生成調節や LCBP シグナルに関わる因子として、新たに 8 種の因子を同定した。これらの因子の解析から、細胞膜を構成する脂質であるエルゴステロールの異常が、Lcb4p のリン酸化を低下させることを明らかにした。また、Lcb4p がゴルジ体から細胞膜へ輸送され、続いてリン酸化され、Cortical ER へ運ばれるという Lcb4p のリン酸化機構を示唆した。さらに、エルゴステロールの異常による Lcb4p のリン酸化の低下の原因として、Lcb4p の局在異常の可能性を示唆した。

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

ヒト血小板と酵母を用いたスフィンゴシン 1-リン酸の 動態、シグナル、生成調節機構の解明

1) 血中におけるスフィンゴシン 1-リン酸とリゾホスファチジン酸の生成機構の解析 スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) とリゾホスファチジン酸 (LPA) は、血中に存在する生理活性脂質である。これまで、LPA の生成経路には、血小板の活性化に伴い放出される経路と、血小板の外で生成される経路の 2 つがあると考えられていた。しかし、前者の経路に関しては、血小板から S1P は放出されるが、LPA は放出されないという矛盾した報告があり、また、後者の経路に関しても実際には証明されていない。そこで、本研究では、(1) 血小板からの LPA、S1P 放出の有無、(2) LPA の血小板外での生成経路の 2 点について検討した。その結果、血小板から LPA、S1P の両方が血小板の活性化に伴い放出され、その放出様式がそれぞれ異なることを明らかにした。また、血小板の活性化によって放出されるホスホリパーゼ A₁、A₂ と血漿中のリゾホスホリパーゼ D により血小板外で LPA が生成される機構を示唆した。

2) フィトスフィンゴシン耐性酵母変異株の単離とその解析 酵母は細胞内に LCBPs が過剰蓄積すると、細胞死を引き起こすことが知られる。そのため、LCBP 分解酵素 *DPL1* 及び LCBP 脱リン酸化酵素 *LCB3* を欠損した株 ($\Delta dpl1 \Delta lcb3$) は、培地中の PHS に対する感受性が非常に高い。この現象を利用し、酵母 ($\Delta dpl1 \Delta lcb3$) のゲノムヘトランスポゾンランダムに挿入させることにより、培地中の PHS に耐性となった株を単離した。得られた変異株の原因遺伝子として、以前に報告された *LCB4*、*PDR5* 遺伝子に加えて、新たに 8 種の遺伝子 (*PBP1*, *HEM14*, *UFD4*, *HMG1*, *TPS1*, *KES1*, *WHI2*, *ERG5*) を同定した。

PHS 耐性酵母変異株が培地中の PHS に耐性を獲得する 1 つの機構として、細胞内への PHS の細胞内への蓄積の低下が考えられる。その可能性について検討してみたところ、得られた変異株のうち、PHS の蓄積が低下したことが原因で、PHS に耐性を示しているのは *pdr5* 変異株だけであることが示唆された。次に、酵母 LCB キナーゼ *Lcb4p* の発現の低下が、もう 1 つの PHS 耐性獲得機構として考えられたので、それぞれの変異株からライセートを調製し、抗 *Lcb4p* 抗体を用いてイムノプロットングを行った。野生株では、*Lcb4p* に相当するバンドが 2 本検出され、上のバンドがリン酸化された *Lcb4p* のバンドである。その結果、*Lcb4p* の発現は、得られた変異株のうち、 $\Delta hem14$ 変異株において著しく、 $\Delta hmg1$ 変異株において少し低下した。また、*Lcb4p* のリン酸化は $\Delta hem14$ 、 $\Delta hmg1$ 、 $\Delta kes1$ 、 $\Delta erg5$ 変異株において減少していた。これらの結果から、(1) LCB の輸送には *PDR5* 遺伝子、(2) LCBP の生成調節機構には *HEM14*、*HMG1*、*KES1*、*ERG5* 遺伝子、(3) LCBP シグナルには *PBP1*、*UFD4*、*TPS1*、*WHI2* 遺伝子が関わっていることが示唆された。

HEM14、*HMG1*、*KES1*、*ERG5* 遺伝子の変異株において、*Lcb4p* のリン酸化が低下した原因について調べるためには、*Lcb4p* のリン酸化機構を明らかにする必要がある。*Lcb4p* は主に小胞

体に局在し、一部が細胞膜に局在することが明らかとなった。間接蛍光抗体法では Nuclear ER が染まらないことから、Lcb4p は ER の中でも Cortical ER だけに局在する非常に特殊な局在を示すことが示唆された。次に、Lcb4p がどこでリン酸化を受けるかどうかについて検討した。Lcb4p は翻訳後修飾としてリン酸化だけではなく、パルミトイル化を受けることが知られる。Lcb4p がパルミトイル化されない変異株 ($\Delta akr1$) では、Lcb4p のリン酸化が低下する。

また、Lcb4p をパルミトイル化する酵素 (Akr1p) はゴルジ体に局在する。これらのことから、Lcb4p はゴルジ体でパルミトイル化された以降にリン酸化を受ける可能性が考えられた。そこで、まず、ゴルジ体から細胞膜への輸送に異常を示す *sec1* 変異株、*sec6* 変異株を用いて調べた。*sec* 変異株は 23°C では正常な輸送を示すが、37°C では輸送が止まる温度感受性の変異株である。その結果、*sec1* 変異株、*sec6* 変異株において、37°C にシフトすると Lcb4p のリン酸化が抑制された。このことから、Lcb4p はゴルジ体から輸送された後にリン酸化を受けることが示唆された。

HEM14、*HMG1*、*KES1*、*ERG5* は細胞膜構成成分であるエルゴステロールの合成や局在に関わる遺伝子であるので、エルゴステロールが Lcb4p のリン酸化に関わっている可能性が考えられた。そこで、他のエルゴステロール合成に関わる遺伝子の欠損株を作成し、Lcb4p のリン酸化について調べた。その結果、これらの変異株中においても Lcb4p のリン酸化の低下が認められた。このことから、エルゴステロールの異常が Lcb4p のリン酸化の低下を引き起こすことが明らかとなった。次に、エルゴステロール合成変異株において、Lcb4p のリン酸化が低下する原因として、Lcb4p の局在変化の可能性が考えられたので、 $\Delta erg6$ 変異株を用いて、シヨ糖密度勾配遠心法によって局在を調べた。その結果、細胞膜での Lcb4p の局在が見られなくなり、ほとんどが小胞体に局在していた。このことから、Lcb4p の局在異常が、Lcb4p のリン酸化を低下させた可能性が示唆された。

以上の通り、申請者は酵母を用いた解析から、LCBP 生成調節や LCBP シグナルに関わる因子として、新たに 8 種の因子を同定した。これらの因子の解析から、細胞膜を構成する脂質であるエルゴステロールの異常が、Lcb4p のリン酸化を低下させることを明らかにした。また、Lcb4p がゴルジ体から細胞膜へ輸送され、続いてリン酸化され、Cortical ER へ運ばれるという Lcb4p のリン酸化機構を示唆した。さらに、エルゴステロールの異常による Lcb4p のリン酸化の低下の原因として、Lcb4p の局在異常の可能性を示唆した。よって、申請者は博士 (薬学) の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認めた。