

学位論文題名

Defects in structural integrity of ergosterol and the Cdc50p-Drs2p putative phospholipid translocase cause accumulation of endocytic membranes onto which actin patches are assembled in yeast

(エルゴステロールの構造異常と Cdc50-Drs2リン脂質輸送体の欠損は、酵母細胞内でエンドサイトーシス由来膜構造の蓄積とその上でのアクチン細胞骨格の形成を引き起こす)

学位論文内容の要旨

緒言

脂質は生体膜の構成成分や生体内の栄養要素としての重要性に加え、細胞増殖、細胞分化、細胞死、発生、老化などの重要な生命現象に機能的に関わっている。そのため、細胞の正常な活動には、脂質の生合成、代謝、細胞内輸送の制御が正しく行われることが必要であり、その破綻は種々の疾患を引き起こすことが明らかとなっている。そのような疾患の一つに、ヒト18番常染色体上に存在する NPC1 遺伝子の欠損によって引き起こされる遺伝疾患ニーマンピック病C型が挙げられる。この疾患は細胞内で脂質の細胞内輸送に異常が生じ、コレステロールやスフィンゴミエリン等の脂質群が細胞内に蓄積されることにより、肝臓や脾臓の肥大や、脳神経系が破壊されることによる神経傷害の症状を生じる。また、アルツハイマー病では、アミロイドβ蛋白質の脳内異常凝集と蓄積によって引き起こされることがこの疾患の原因の一つとされるが、この異常凝集は神経細胞膜糖脂質の GM1 ガングリオシドと結合することによって開始する。この結合は細胞膜のコレステロール濃度に大きく依存していることから、脂質の代謝と細胞内輸送がこの疾患において重要な決定因子であることが予想される。このように疾患における細胞内脂質の関与は明らかであり、そのため、細胞レベルや分子レベルで脂質の機能と動態を解明することが、疾患原因の解明に必要不可欠である。

現在までに、脂質に関わる細胞内現象のうち、生理学的意義が完全に解明されていないものとして細胞膜におけるリン脂質の非対称分布が挙げられる。一般に動物細胞では、細胞膜二重層においてホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンが外層に多く分布し、ホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリンなどのアミノリン脂質が内層に多く分布している。この現象は、外層から内層への脂質の輸送と内層から外層への輸送が、バランスよく制御されることによって維持されていると考えられている。このリン脂質を能動的に輸送する分子の一つとして、リン脂質を外層から内層へ輸送するアミノリン脂質トランスロケースが同定されている。

本論文では、アミノリン脂質トランスロケースにより制御されたリン脂質膜非対称分布の生理機能の一端を解明するにあたり、分子遺伝学的解析が速やかにかつ明確に行うことができる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として使用した。出芽酵母には、遺伝子配列からアミノリン脂質トランスロケースであると推定される P 型 ATPase が 5 種類 (*DRS2*, *DNF1*, *DNF2*,

*DNF3* および *NEO1*) 確認されている。本論文では、そのうち *Drs2p* とそのサブユニットとして機能する *Cdc50p* からなる *Drs2p-Cdc50p* 複合体を解析対象とし、この複合体が制御するリン脂質膜非対称性が示す生理学的意義の解明を試みた。

## 結果

リン脂質膜非対称分布の生理機能を解明するために、*Drs2p* が局在部位に輸送されない *cdc50* 欠損変異と遺伝学的相互作用を示す遺伝子変異を探索した。その結果、エルゴステロール (ヒト細胞のコレステロールに相当) 後期合成経路の遺伝子変異と *cdc50* 欠損変異が同時に起こることによって致死となることを明らかにした。後期段階のエルゴステロール合成酵素欠損変異株は致死にはならないが、構造が異常なステロールが蓄積されることが報告されている。しかし、本論文で明らかにしたような遺伝学的相互作用の報告は現在までになされていない。すなわち、膜を構成する脂質本体 (ステロール) と動態 (リン脂質膜非対称性) の両者が異常になることが、どのように生命現象に関与するかは明らかにはなっていない。この致死性の原因を解明するため、エルゴステロール後期合成経路の遺伝子の一つ *ERG3* を欠損し、ガラクトースプロモーター発現制御 *CDC50* 遺伝子を持った *cdc50 erg3* 条件的二重欠損変異株を作製し、細胞学的解析を行った。電子顕微鏡観察では、*cdc50 erg3* 二重欠損変異株の細胞内には通常観察されない大きな膜構造が蓄積していた。この変異株では、細胞膜-初期エンドソーム-ゴルジ体-細胞膜の経路 (エンドサイトーシス・リサイクリング経路) をサイクルする *Snclp* (v-SNARE) が細胞内に蓄積していたことから、電子顕微鏡観察で見られた異常膜構造がエンドサイトーシス・リサイクリング経路の異常によって生じたものである可能性が考えられた。また、その異常膜には通常細胞膜に多く存在するステロールも存在していた。これらの結果から、リン脂質の非対称性とステロールの構造が同時に異常になることによりエンドサイトーシス・リサイクリング経路が異常になり、細胞内ステロール輸送にも異常が生じていることが確認された。

また本論文では、*cdc50 erg3* 二重欠損変異株が細胞極性を失い、アクチン細胞骨格が異常局在していることも見いだした。出芽酵母において脂質の異常がアクチン細胞骨格に影響を及ぼしている例は少ないことから、この変異株におけるアクチン細胞骨格の詳細な解析を行った。その結果、*cdc50 erg3* 二重欠損変異株では、通常細胞膜直下にしか存在しないアクチン繊維が細胞内に形成されていることが確認された。この変異株ではアクチン繊維の形成に関わる因子も細胞内アクチン繊維と共局在していた。これらの結果から、細胞内アクチン繊維は単にアクチンの非特異的な凝集によってできたものではなく、細胞内でアクチン繊維を形成する機構が働いて形成されたものであることが示唆された。さらに、この細胞内アクチン繊維は、上述の細胞内に蓄積した *Sncl* と共局在を示していた。この結果から、細胞内にアクチン繊維が形成される機構について次のような仮説が立てられた。すなわち、(1) エンドサイトーシス・リサイクリング経路に異常が生じ、ステロール輸送の異常を引き起こした。(2) その結果、ステロールが細胞内の膜構造に蓄積し、細胞内膜構造の脂質組成が細胞膜に類似したものに変化した。(3) 細胞内内膜構造の脂質組成の異常により通常では観察されないアクチン繊維の細胞内形成という異常現象が引き起こされた。以上の結果から、リン脂質の非対称性とステロールの構造がエンドサイトーシス・リサイクリング経路を制御することにより、アクチン細胞骨格の形成制御に関与している可能性が明らかとなった。

## 考察

本論文によって、膜を構成する脂質本体 (ステロール) と動態 (リン脂質膜非対称性) とが同時に異常になることによって細胞内脂質環境に異常が生じる可能性が示唆された。また、細胞内脂質環境の異常によって、生命現象の異常 (アクチン細胞骨格の異常な形成) が引き起こされることも示唆された。高等生物においてもリン脂質膜非対称性がおそらく同様の機構で機能していると考えられ、本論文で得られた知見は、今後ヒトの細胞において脂質の細胞内動態を理解するためのきっかけとなりうる。リン脂質膜非対称性を含め脂質の細胞内での動態

や機能を解明することは、種々の疾患のメカニズムを解明するために不可欠な過程であり、本論文で明らかにした知見がそこでも役立つことが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 口 昌 幸  
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦  
副 査 教 授 田 中 一 馬

## 学 位 論 文 題 名

Defects in structural integrity of ergosterol and the Cdc50p-Drs2p putative phospholipid translocase cause accumulation of endocytic membranes onto which actin patches are assembled in yeast

(エルゴステロールの構造異常と Cdc50-Drs2リン脂質輸送体の欠損は、  
酵母細胞内でエンドサイトーシス由来膜構造の蓄積と  
その上でのアクチン細胞骨格の形成を引き起こす)

細胞膜に含まれているリン脂質は脂質二重層の外層と内層で非対称に分布している。この現象は、リン脂質輸送体による内外層の輸送が、正常に制御されることにより維持されている。現在までに、リン脂質輸送体としてアミノリン脂質（ホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリン）を外層から内層へ輸送するアミノリン脂質トランスロケースが同定されている。しかし、脂質二重層間におけるリン脂質輸送の制御機構と生理学的意義はまだ完全には解明されていない。

アミノリン脂質トランスロケースにより制御されるリン脂質膜非対称分布の生理機能の一端を解明するにあたり、分子遺伝学的解析が速やかにかつ明確に行うことができ、分子細胞生物学領域で多くの研究室で用いられている出芽酵母をモデル生物として使用した。本研究は、出芽酵母においてアミノリン脂質トランスロケースであると推定される P 型 ATPase の一つ、Drs2p とそのサブユニットとして機能する Cdc50p からなる Drs2p-Cdc50p 複合体を解析対象とし、この複合体が制御するリン脂質膜非対称性が示す生理学的意義の解明を目的としている。

本研究において、エルゴステロール（ヒト細胞のコレステロールに相当）後期合成経路の遺伝子変異 *erg3* と Drs2p が局在異常を示す *cdc50* 欠損変異が同時に起こることによって致死となることを明らかにした。ガラクトースプロモーター発現制御 *CDC50* 遺伝子を持った *erg3* 欠損変異株 (*cdc50 erg3* 二重欠損変異株) を作製し、その表現型を解析した。*CDC50* 遺伝子発現抑制後、細胞増殖停止が確認される時間において、*cdc50 erg3* 二重欠損変異株の細胞内には通常観察されない大きな膜構造の蓄積が見られた。*cdc50* 欠損変異株では、細胞膜-初期エンドソーム-ゴルジ体-細胞膜の経路(エンドサイトーシス・リサイクリング経路)の輸送低下が見られる。*cdc50*

*erg3* 二重欠損変異株では、エンドサイトーシス・リサイクリング経路をサイクルする Snclp (v-SNARE) が、*cdc50* 欠損変異株以上に細胞内に蓄積していたことから、*erg3* 欠損変異が *cdc50* 欠損変異による輸送異常を悪化させていると考えられた。この結果から電子顕微鏡観察で見られた異常膜構造がエンドサイトーシス・リサイクリング経路の異常によって生じたものである可能性が考えられた。さらに、異常膜構造には通常細胞膜に多く存在するステロールが蓄積していたことを確認した。

生体膜に含まれている脂質群はアクチン細胞骨格を制御していることが示唆されている。ステロールが異常膜構造に蓄積する *cdc50 erg3* 二重欠損変異株では、アクチン構造が異常局在していることが確認された。さらに共焦点レーザー顕微鏡による詳細な解析により *cdc50 erg3* 二重欠損変異株では、通常細胞膜直下にしか存在しないアクチン構造が細胞内に形成されていることが確認された。

アクチン構造は、脂質との相互作用により細胞膜直下に局在している。細胞内アクチン構造は、細胞内に蓄積した Sncl と共局在を示していた。このことから、*cdc50 erg3* 二重欠損変異株で見られた細胞内アクチン構造が、エンドサイトーシス・リサイクリング経路の異常により生じた異常ステロール膜構造上に形成されたと考えられた。

本研究により、リン脂質膜非対称性を制御していると推定される Drs2p-Cdc50p 複合体の局在とステロールの構造が同時に異常になることにより、エンドサイトーシス・リサイクリング経路の異常と細胞内ステロール輸送の異常が生じることが明らかとなった。またこの状況下では、細胞内に異常な膜構造が蓄積したことから、生体膜環境が異常である可能性が考えられた。これらの結果より、リン脂質膜非対称性の制御とステロールの構造が生体膜環境の維持に関与することが示唆された。さらに、細胞内の異常膜構造上にアクチン構造が形成されたことが確認された。したがって、生体膜環境がアクチン細胞骨格にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

口頭発表において、副査の渡辺教授より Cdc50-Drs2 複合体の輸送活性に関する質問があった。続いて副査の田中教授より脂質が及ぼす蛋白質の活性制御の可能性について質問があった。また主査の野口教授より脂質異常疾患における細胞骨格制御機構に関連した質問があった。これらに対して申請者は、自己の研究結果と文献的知識を基に誠実に、概ね妥当な回答を行った。

本研究は、膜を構成する脂質本体 (ステロール) と動態 (リン脂質膜非対称性) による生体膜環境制御メカニズムの一端を明らかにしたものとして高く評価され、今後、脂質異常による疾患発症メカニズムの解明に役立つ可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。