

学位論文題名

Cdc50p, a Protein Required for Polarized Growth,
Associates with the Drs2p P-Type ATPase Implicated in
Phospholipid Translocation in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母の細胞極性を制御する Cdc50は、
リン脂質輸送体である P 型 ATPase Drs2 と結合する)

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

細胞極性、すなわち非対称的な細胞骨格構造、細胞内輸送、生体膜構造などの形成・維持は、酵母から哺乳動物細胞まですべての真核生物において見られる普遍的な現象であり、これらが秩序だてて進行していくことが生命の維持にとって必要である。細胞極性の形成にはアクチン細胞骨格が特に重要な役割を果たしており、細胞が増殖する際や外界からの刺激に応答する際にダイナミックに再構成されることが知られている。一方この再構成が正常に進行しないと細胞内の秩序は失われ、細胞増殖、接着、運動などに異常が生じるが、これらの異常は癌細胞において顕著に観察される。

一方、真核生物のモデル系として広く分子細胞生物学研究に用いられている出芽酵母は、文字通り出芽によって増殖する。この出芽という現象において細胞極性は非常に重要な意味を持っており、この過程はアクチン細胞骨格の再構成によって支えられている。アクチン細胞骨格の再構成による細胞極性形成の分子機構は真核生物細胞において普遍的に保存されていることから、細胞生物学的、分子遺伝学的な解析が迅速かつ確実に行える出芽酵母をモデル系として細胞極性形成の分子機構の研究を行うことは、医学・生物学上大変有意義なことである。

我々の研究室では以前、出芽酵母の細胞極性形成を制御する遺伝子の一つとして *CDC50* を同定した (*Mol. Biol. Cell*, 2003, 14, 730-747)。*Cdc50* は非常に類似した蛋白質が酵母からヒトまで広く存在し、そのアミノ酸配列から 2 回膜貫通型蛋白質であると予想されている。*cdc50* 遺伝子欠損株 (*cdc50Δ* 株) は低温で小さな芽を出した状態で増殖が停止し、細胞極性形成を制御するアクチン繊維やその関連因子の細胞内分布に異常が生じる。出芽酵母には *CDC50* と相同性の高い *LEM3* と *CRF1* が存在し (*CDC50* ファミリー)、これらすべての遺伝子を欠損した細胞は致死になることから、これらが生命の維持に重要な分子であり、機能を重複している可能性が高い。しかしその詳細な機能は全く不明である。本研究では *Cdc50* の機能を解明することを目的に、*Cdc50* の関連因子の探索を行い、さらに *Cdc50* と関連因子との相互作用について解析した。

【結果】

先ず、*cdc50Δ* 株で高発現させるとその低温感受性を抑圧する、つまり低温でも増殖できるようになる遺伝子を探索し、その抑圧遺伝子の一つとして *NEO1* を同定した。*NEO1* がコードする蛋白質は P 型 ATPase に属するアミノリン脂質トランスロケース (APT) に分類されている。APT に分類される蛋白質は広

く真核生物に存在し、出芽酵母にはそのファミリーとして *NEO1* の他に *DRS2*、*DNF1*、2、3 が存在する (*DRS2/NEO1* ファミリー)。一般に真核生物の細胞形質膜を構成する脂質二重層はその内外で様々な脂質が非対称に分布している。膜脂質非対称性は脂質が二重層を横切る動きによって成立しており、この動きには能動的に脂質を運ぶ輸送分子が働いていると考えられている。APT は外層 (細胞外側) から内層 (細胞質側) にリン脂質を運ぶ働き (フリップ活性) があることが示唆されている分子群である。

さらに *CDC50* ファミリーと *DRS2/NEO1* ファミリーとの関係を遺伝学的に調べたところ、*CDC50* と *DRS2*、また *LEM3* と *DNF1* がそれぞれ機能的に同等であることが示唆された。また、*Drs2* と *Cdc50* は細胞内の後期ゴルジ体やエンドソーム膜に共局在し、*drs2* 遺伝子欠損株 (*drs2Δ* 株) は *cdc50Δ* 株と同様に低温感受性を示し、細胞極性形成の異常を示した。一方、*Dnf1*、*Dnf2* および *Lem3* はいずれも主に極性成長部位の細胞形質膜に局在し、*DNF1* 遺伝子および *DNF2* 遺伝子と *LEM3* 遺伝子をそれぞれ欠損した細胞では、細胞形質膜におけるリン脂質のフリップ活性が低下することが示唆されている。これらの知見から、*Drs2* と *Cdc50* が、また *Dnf1* および *Dnf2* と *Lem3* が、それぞれ物理的にも近いところで機能しているのではないかと考え、免疫沈降実験を行った。その結果、確かにこれらがそれぞれ結合していることが示された。さらに *Dnf3* と *Crfl* も結合していることが示された。一方 *Neo1* は *Cdc50* ファミリーのいずれの分子とも結合していなかった。さらに *CDC50* ファミリー遺伝子を欠損すると、それぞれの *DRS2/NEO1* ファミリーの結合パートナーは本来の局在部位に移行できずに、小胞体に留まることが示された。また、*Lem3* が *Dnf1* の局在部位での機能自体にも関与することが示唆された。*Cdc50* ファミリーには ATPase のモチーフがないことを考えると、これらは APT の正常な局在や生理機能に必須な調節サブユニットとして機能している可能性が高い。

先述のとおり *Drs2* と *Cdc50* は通常主に細胞内のオルガネラ膜に局在しているが、エンドサイトーシス不全の遺伝子変異株ではそれらの多くが細胞形質膜に局在することが示された。従って、これらは細胞内オルガネラ膜と細胞形質膜間を行き来し、様々なオルガネラ膜で他の APT 複合体と重複した役割を果たすことができることが示唆された。さらにこのエンドサイトーシス不全の遺伝子変異株を利用し、多くの *Drs2-Cdc50* 複合体が細胞形質膜に存在する条件で、そのフリップ活性を細胞形質膜上で測定することを試みた。蛍光標識したリン脂質を外部から添加し、細胞形質膜外層から内層にフリップによって取り込まれるこれらの量を調べた結果、確かに *Cdc50-Drs2* 複合体はアミノリン脂質のフリップに関与していることが示唆された。

[考察]

本研究では、細胞極性形成を制御する新規分子として同定されていた出芽酵母 *Cdc50* が、リン脂質のフリップに関与する APT の一つである *Drs2* と結合していることを示し、その調節サブユニットとして機能している可能性を示唆した。他の *Cdc50* ファミリー分子も同様に他の *Drs2/Neo1* ファミリー分子と結合していることも示された。*Cdc50* ファミリーは酵母から動物細胞まで広く保存されており、APT のこのような複合体形成は広く一般的な現象であると考えられる。このように真核生物の APT に調節サブユニットが存在することを示したのは本研究が初めてである。また、*drs2Δ* 株および *cdc50Δ* 株では細胞内の小胞輸送に異常が認められ、これらの遺伝子欠損株におけるアクチン繊維やその関連因子の細胞内分布の異常は、この小胞による蛋白質輸送の異常が原因かもしれない。APT によるフリップ活性がどのように小胞輸送に関与しているのかなど、その細胞内機能は不明であり今後の機能解析が期待されるが、小胞輸送の新たな制御機構の存在を示唆しているという点で非常に興味深い。高等動物で小胞輸送は、例えば、上皮細胞の非対称性の維持や神経細胞における神経伝達物質のシナプス小胞開口分泌などに深く関与しており、小胞輸送の異常は癌細胞の湿潤・転移や

神経疾患などに密接に関連している。細胞内の詳細な分子機構を容易に解析できるという点で、酵母で得られる知見はヒトなどで有効に活用できるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 志 田 壽 利

副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

Cdc50p, a Protein Required for Polarized Growth, Associates with the Drs2p P-Type ATPase Implicated in Phospholipid Translocation in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母の細胞極性を制御する Cdc50は、
リン脂質輸送体である P 型 ATPase Drs2と結合する)

細胞極性の形成、すなわち細胞が非対称な構造を持つことは、酵母からヒトまですべての真核生物の生命活動に必要不可欠である。細胞極性形成の異常は、上皮組織の機能不全、がん細胞の運動能亢進および神経細胞の形成不全などを引き起こすことが知られている。細胞生物学的、分子遺伝学的な解析が迅速かつ確実に行える出芽酵母は高等動物の細胞極性形成の分子機構を理解する上で、真核生物のモデル系として非常に優れている。申請者の研究室では以前、出芽酵母の細胞極性形成に関与する分子の一つとして膜貫通型蛋白質である Cdc50 が同定された。cdc50 遺伝子欠損株は低温で生育できない低温感受性を示し、細胞極性形成を制御するアクチン繊維やその関連因子の細胞内分布に異常が生じる。Cdc50 は何らかの形で細胞極性形成に関与すると考えられるが、その機能はほとんど分かっていなかった。

本研究では Cdc50 の機能を解明することを目的に、Cdc50 の関連因子の探索を行った。cdc50 欠損株で高発現させるとその低温感受性を抑圧する、つまり低温でも増殖できるようになる遺伝子を探索し、その抑圧遺伝子の一つとして NEO1 を同定した。Neo1 は P 型 ATPase に属するアミノリン脂質輸送体 (APT) に分類されている。APT に分類される蛋白質は広く真核生物に存在し、出芽酵母には Neo1 の他に Drs2、Dnf1、2、3 が存在する (Drs2/Neo1 ファミリー)。一般に真核生物の生体膜脂質二重層はその内外で様々な脂質が非対称に分布しており、その非対称性の形成、維持には能動的に脂質を内外に運ぶ輸送分子が働いていると考えられている。APT は外層 (細胞外側) から内層 (細胞質側) へリン脂質を運ぶ働き (フリップ活性) があることが示唆されている。

出芽酵母には Cdc50 と相同性の高いパラログとして Lem3 と Crf1 が存在する (Cdc50 ファミリー)。Cdc50 ファミリーと Drs2/Neo1 ファミリーの関係を遺伝学的解析、細胞内局在および欠損株の表現型などから調べた結果、これらのファミリーが互いに細胞内で非常に

近いところで機能していることが示唆された。免疫沈降実験を行った結果、Cdc50 が Drs2 と、Lem3 が Dnf1 もしくは Dnf2 と、Crif1 が Dnf3 とそれぞれ特異的に結合していることが示された。一方 Neo1 と Cdc50 ファミリーとの特異的な結合はみられず、Neo1 は単独もしくは他の結合パートナーと機能していることが示唆された。Cdc50 ファミリーを欠損すると、それぞれの Drs2/Neo1 ファミリーの結合パートナーは本来の局在部位に移行できずに、小胞体に留まることが示された。また、Lem3 が Dnf1 の局在部位での機能自体にも関与することが示唆された。Cdc50 ファミリーには特徴的なドメインなどが無いことを考えると、これらは APT の正常な局在や生理機能に必要な調節サブユニットとして機能している可能性が高い。さらに Drs2-Cdc50 複合体のフリップ活性をこれらの大部分が細胞形質膜に局在する条件で、外部から添加した蛍光標識リン脂質がフリップにより取り込まれた量を測定することにより調べた。Cdc50-Drs2 複合体はアミノリン脂質の輸送に関与しており、特にファスファチジルセリンに対するフリップ活性が高いことが示唆された。

本研究により、真核生物の APT であると考えられている分子群に調節サブユニットが存在することが初めて示された。Cdc50 ファミリーは酵母からヒトまで広く保存されており、APT のこのような複合体形成は広く一般的な現象であると考えられる。Cdc50 や Drs2 を欠損した細胞では細胞極性形成に重要な役割を果たす小胞輸送に異常が生じることから、APT によるアミノリン脂質のフリップが何らかの形で小胞輸送に関与していると考えられる。

口頭発表において、副査の志田壽利教授から CDC50 と NEO1 との間に見出された遺伝学的相互作用の意味や様々なリン脂質輸送体の働きについて質問があった。続いて主査の畠山鎮次教授からアミノリン脂質輸送体と疾患との関連やリン脂質が膜非対称性を持つ生物学的な意義について質問があった。また副査の田中一馬教授からアミノリン脂質輸送体がフォスファチジルコリンを内層に輸送する意義について質問があった。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、真核生物の APT 分子群の複合体形成を初めて明らかにし、生理機能や細胞内機能にまで結果、考察が及んでいる点において高く評価され、今後高等動物の APT 分子群の機能並びに細胞極性形成に関わる小胞輸送との関連やその異常による病態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。