

学位論文題名

Mutational analysis of the Lem3p-Dnf1p putative phospholipid-translocating P-type ATPase reveals novel regulatory roles for Lem3p and a carboxyl-terminal region of Dnf1p independent of the phospholipid-translocating activity of Dnf1p in yeast

(Lem3p-Dnf1 P型 ATPase リン脂質輸送体の変異解析により明らかとなった、Lem3p および Dnf1p COOH 末端領域が有するリン脂質輸送活性に依存しない新たな機能)

学位論文内容の要旨

目的と背景

真核細胞において、細胞膜を構成するリン脂質は、脂質二重層の内層、外層に非対称に分布していることが知られている。リン脂質の非対称分布の制御の一部は、P-type ATPaseであるアミノリン脂質トランスロケース (APLT) によって行われていると考えられており、細胞極性形成など様々な細胞機能において重要であることが明らかにされつつある。APLTホモログであるATP8B遺伝子の異常によって先天性胆汁鬱滞症が引き起こされると考えられているが、その病態を分子レベルで理解するためには、ATP8B遺伝子がコードするAPLTの細胞機能を明らかにする必要がある。

申請者が所属する研究室では出芽酵母の細胞極性を制御する遺伝子の一つとしてCDC50を同定し、CDC50の機能を解析するとともに、Cdc50のホモログであるLem3がATP8Bの出芽酵母ホモログであるDnf1/Dnf2と複合体を形成していること、また、Lem3はDnf1/Dnf2の小胞体から極性部位への輸送に関わっていることを明らかにしてきた。本論文ではLem3が持つ新たな生理機能を解明することを目的に、新規*lem3*変異の取得を試み、得られた変異体の解析を行った。

方法と結果

Lem3とDnf1/Dnf2との複合体形成はER外への輸送に必要なであるが、Lem3はDnf1/Dnf2と細胞膜上でも複合体を形成しているので、Lem3は複合体内でも何らかの機能を有していると推定される。出芽酵母*lem3*および*cdc50*二重欠失変異体 (*lem3Δcdc50Δ*) がほぼ致死となる現象を利用し、*cdc50Δ*株を用いて*lem3*温度感受性変異のスクリーニング

を行った。PCRを用いて変異を誘発した*lem3*を*lem3Δcdc50Δ*に導入し、温度感受性増殖を示した株のうち、正常なDnf1-EGFPの局在を示す株を検索した。その結果、*cdc50Δ*増殖阻害を示すが、Dnf1-EGFPの正常な細胞内局在を示す変異株を3株得た (*lem3-50*,*lem3-112*,*lem3-116*)。取得した変異体の変異部位を調べたところ、*lem3-112*には生物種を超えて広く保存されている316番目のアルギニン残基がトリプトファンに置換されている部位が存在した。このため316番目アミノ酸の単独変異株、*lem3(R316W)*を作成したところ、*cdc50Δlem3(R316W)*の2重変異株も増殖欠損を示した。次に*lem3-112*、*lem3-116*、*lem3(R316W)*におけるDnf1-EGFPおよびDnf2-EGFPの局在を野生株と比較検討したところ、これらではDnf1-EGFPは野生株に等しい局在を示すが、Dnf2-EGFPの局在はERにとどまることがわかった。出芽酵母では*cdc50Δdnf1Δ*では増殖欠損を示すが、*cdc50Δdnf2Δ*は増殖欠損を示さないことから、*lem3*変異体にはDnf1に関連した機能の欠損があることを示唆するものと考えられた。次にLem3(R316W)は野生型Lem3蛋白と同様にDnf1と複合体を形成している事を免疫沈降実験で確認し、Lem3(R316W)は野生株のLem3と同様にDetergent insoluble fraction (いわゆるラフト画分) に輸送されていることも確認した。Lem3(R316W)とDnf2も複合体は形成できているが、これらの複合体は小胞体にとどまることから、ER quality controlを受けていると考えられた。さらに蛍光標識したリン脂質を細胞外部から添加し、細胞形質膜外層から内層への輸送(フリップ)によって取り込まれた蛍光標識リン脂質を定量することにより、*lem3*変異体のAPLT活性を測定した結果、これらの*lem3*変異体はDnf1の細胞膜におけるリン脂質輸送活性に影響を与えないことがわかった。以上の結果から、Lem3はDnf1/Dnf2の局在制御、またリン脂質輸送活性制御以外にDnf1と関係する新たな機能を持つことが示唆された。

次に、Dnf1のホモログであるDrs2のCOOH末端がその機能に必要な不可欠であるとの報告を受け、Dnf1のCOOH末端を欠失した変異体 (*dnf1 Δ(1465-1571)-3HA*) を作成したところ、*dnf1 Δ(1465-1571)-3HA* は*cdc50 Δ*との2重変異で増殖欠損を示した。しかし、*dnf1 Δ(1465-1571)-EGFP*は野生型と同様の局在を示した。さらに、前述の*lem3*変異体と同様の方法でDnf1 $\Delta(1465-1571)$ -3HAのAPLT活性を測定した結果、これも野生型と同様の活性を示した。この結果から、Dnf1のCOOH末端も細胞内局在やリン脂質輸送活性の制御以外にCdc50と関係する新たな機能を持つ可能性が示唆された。

考察

本研究では出芽酵母の P-type ATPase の一つである Dnf1 と複合体を形成する Lem3 が、同じく P-type ATPase の一つである Drs2 と複合体を形成する Cdc50 と関連する新たな機能を持つことを示し、また Dnf1 の COOH 末端領域も同様の機能を持つ可能性を示唆した。Cdc50-Drs2 複合体はゴルジ体やエンドソームに局在して小胞輸送(エンドサイトーシスーリサイクリング経路)に関わっている事が示唆されている。Lem3-Dnf1 複合体も一部がエンドソームと考えられる部位に局在していること、また Lem3-Dnf1 複合体を過剰発現させると Cdc50-Drs2 複合体の代替機能を果たすことができることから、Lem3-Dnf1 複合体も小

胞輸送に関わっている可能性が考えられる。今回新たに見出した Lem3 と Dnf1 の COOH 末端領域における機能は、この小胞輸送に関わるものなのかもしれない。

結語

Lem3 や Dnf1 は広く真核細胞に保存された遺伝子であり、またその遺伝子異常は疾患の原因遺伝子であることも示唆されているため、その生理機能について今後の解析が期待される。本研究で得られた成果は、今後ヒト APLT の機能解析に役立ち、疾患の原因究明にも寄与することが期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 島山 鎮次
副査 教授 野口 昌幸
副査 教授 近藤 哲
副査 教授 田中 一馬

学位論文題名

Mutational analysis of the Lem3p-Dnf1p putative phospholipid-translocating P-type ATPase reveals novel regulatory roles for Lem3p and a carboxyl-terminal region of Dnf1p independent of the phospholipid-translocating activity of Dnf1p in yeast

(Lem3p-Dnf1 P型 ATPase リン脂質輸送体の変異解析により
明らかとなった、Lem3p および Dnf1p COOH 末端領域が有する
リン脂質輸送活性に依存しない新たな機能)

真核細胞において、細胞膜を構成するリン脂質は、脂質二重層の内層、外層に非対称に分布していることが知られている。リン脂質の非対称分布の制御の一部は、P-type ATPaseであるアミノリン脂質トランスロケース (APLT) によって行われていると考えられており、細胞極性形成など様々な細胞機能において重要であることが明らかにされつつある。またAPLTをコードする遺伝子の異常は様々な疾患の原因となっていると考えられているが、病態の分子メカニズムを解明するためには、APLTの細胞内機能を明らかにする必要がある。

申請者が所属する研究室では出芽酵母の細胞極性を制御する遺伝子の一つとしてCDC50を同定し、CDC50の機能を解析するとともに、Cdc50pのホモログであるLem3pがDnf1p/Dnf2pと複合体を形成していること、また、Lem3pはDnf1p/Dnf2pの小胞体から極性部位への輸送に関わっていることを明らかにしてきた。本研究ではLem3pが持つ新たな生理機能を解明することを目的に、新規*lem3*変異の取得を試み、得られた変異体の解析を行った。Lem3pとDnf1p/Dnf2pとの複合体形成はER外への輸送に必要であるが、Lem3pはDnf1p/Dnf2pと細胞膜上でも複合体を形成しているので、Lem3pは複体内でも何らかの機能を有していると推定される。出芽酵母*lem3*および*cdc50*二重欠失変異体 (*lem3 cdc50*) がほぼ致死となる現象を利用し、*cdc50* 株を用いて*lem3*温度感受性変異のスクリーニングを行った。その結果、*cdc50* 株の増殖阻害を示すが、Dnf1p-EGFPの正常な細胞内局在を示す変異株を3株得た

(*lem3-50,lem3-112,lem3-116*)。取得した変異体の変異部位を調べたところ、*lem3-112*には生物種を超えて広く保存されている316番目のアルギニン残基がトリプトファン残基に置換されている部位が存在した。このため316番目アミノ酸の単独変異株、*lem3(R316W)*を作製したところ、*cdc50 lem3(R316W)*の2重変異株も増殖欠損を示した。次に*lem3-112*、*lem3-116*、*lem3(R316W)*におけるDnf1p-EGFPおよびDnf2p-EGFPの局在を野生株と比較検討したところ、これらではDnf1p-EGFPは野生株に等しい局在を示すが、Dnf2p-EGFPの局在はERにとどまることがわかった。出芽酵母では*cdc50 dnf1*では増殖欠損を示すが、*cdc50 dnf2*は増殖欠損を示さないことから、*lem3*変異体にはDnf1pに関連した機能の欠損があることを示唆するものと考えられた。さらにLem3p(R316W)は野生型Lem3p蛋白と同様にDnf1pと複合体を形成している事を免疫沈降実験で確認した。Lem3p(R316W)とDnf2pも複合体は形成できているが、これらの複合体は小胞体にとどまることから、ER quality controlを受けていると考えられた。引き続き蛍光標識したリン脂質を細胞外部から添加し、細胞形質膜外層から内層への輸送(フリップ)によって取り込まれた蛍光標識リン脂質を定量することにより、*lem3*変異体のAPLT活性を測定した結果、これらの*lem3*変異体はDnf1pの細胞膜におけるAPLT活性に影響を与えないことがわかった。以上の結果から、Lem3pはDnf1p/Dnf2pの局在制御、またAPLT活性制御以外にDnf1pと関係する新たな機能を持つことが示唆された。

本研究では出芽酵母のP-type ATPaseの一つであるDnf1pと複合体を形成するLem3pが、同じくP-type ATPaseの一つであるDrs2pと複合体を形成するCdc50pと関連する新たな機能を持つことを示した。Cdc50p-Drs2p複合体はゴルジ体やエンドソームに局在して小胞輸送(エンドサイトーシスーリサイクリング経路)に関わっている事が示唆されている。Lem3p-Dnf1p複合体も一部がエンドソームと考えられる部位に局在していること、またLem3p-Dnf1p複合体を過剰発現させるとCdc50p-Drs2p複合体の代替機能を果たすことができることから、Lem3p-Dnf1p複合体も小胞輸送に関わっている可能性が考えられる。今回新たに見出したLem3pにおける機能は、この小胞輸送に関わるものなのかもしれない。

Lem3pやDnf1pは広く真核細胞に保存された遺伝子であり、またその遺伝子異常は疾患の原因遺伝子であることも示唆されているため、その生理機能について今後の解析が期待される。本研究で得られた成果は、今後ヒトAPLTの機能解析に役立ち、疾患の原因究明にも寄与することが期待される。

口頭発表において、副査の野口昌幸教授から今回検討した変異部位とは異なる変異の影響について、またAPLTの研究と疾患の関連についての質問があり、続いて副査の近藤哲教授から本研究と癌との関連における今後の展望についての質問があった。引き続き主査の畠山鎮次教授から小胞輸送と免疫系との関連、また論文に記載されている実験の手技についての質問があった。最後に副査の田中一馬教授からLem3pがCdc50pの代替機能を果たす機序についての質問があった。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、APLTと複合体を作る蛋白の機能を詳細に解析した点において高く評価され、今後APLTの異常による疾患の分子レベルでの病態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。