

学 位 論 文 題 名

The Functional Relationship between the Cdc50p-Drs2p
Putative Aminophospholipid Translocase and
the Arf GAP Gcs1p in Vesicle Formation in the Retrieval
Pathway from Yeast Early Endosomes to the TGN

(リン脂質輸送体 Cdc50-Drs2 と Arf GAP Gcs1 による
初期エンドソームから TGN への小胞輸送機構の解析)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

[目的と背景]

細胞内小胞輸送機構の異常が様々な疾患を引き起こす事が明らかになって来ているが、輸送小胞の形成機構にはまだ不明な点が多く残されている。生体膜は脂質二重層より形成されており、脂質二重層を構成するリン脂質は膜の内外で非対称に分布することが知られている。このリン脂質の非対称性は脂質を細胞外側から細胞質側に能動的に輸送するアミノリン脂質トランスロケース (APLT) により制御されると考えられている。APLT 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 *DRS2*, *DNF1*, *DNF2*, *DNF3*, *NEO1* が存在する。我々の研究室では出芽酵母において *NEO1* 以外の APLT は *CDC50* family と複合体を形成することをこれまでに見出している。すなわち、Drs2p は Cdc50p と、Dnf1p、Dnf2p は Lem3p (Ros3p) と、そして Dnf3p は Crf1p と複合体を形成する。これらのうち、Cdc50p-Drs2p は細胞内において主に endosome や後期ゴルジ体 (TGN) 構造に局在する。*cdc50Δ*細胞では細胞膜から early endosome、TGN を介して細胞膜に recycle される v-SNARE である Snclp が細胞内に蓄積することから (野生株では主に細胞膜に局在)、Cdc50p-Drs2p は early endosome-TGN 間輸送において機能することが考えられた。しかしながら、Cdc50p-Drs2p がどのように early endosome-TGN 間輸送に関わるのか未だ明らかではない。細胞内小胞輸送において輸送小胞が形成されるには低分子量 G 蛋白質 Arf を介してコート蛋白質が膜上に集積する必要がある。これまでの報告により Drs2p が Arf1p 機能に関与することが示唆されているため、本研究では early endosome-TGN 間輸送における Cdc50p-Drs2p と Arf1p の関連性をより詳細に解析した。

[結果]

遺伝子同士の機能の関連性を簡単に調べる酵母遺伝学的手法の一つとして、致死でない 2 つの変異の組み合わせにより致死性が引き起こされる合成致死というものがある。本研究

ではまず、*cdc50Δ*変異が *arf1Δ*変異と合成致死性を示すことを見出した。Arf1p の活性状態はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) と GTPase 活性化因子 (GAP) によって制御されており、出芽酵母では GEF として Gea1p, Gea2p, Sec7p, Syt1p, GAP として Gcs1p, Glo3p, Age1p, Age2p が知られている。*CDC50* とこれら Arf 制御因子について合成致死性を検討したところ、*gcs1Δ*変異のみが *cdc50Δ*変異と合成致死性を示した。このことから、Cdc50p-Drs2p が Arf1p 機能と関連すること、また Gcs1p は *cdc50Δ*変異株において重要であることが示唆された。

他の Arf GAP が存在するにも関わらず *cdc50Δ gcs1Δ*が合成致死性を示すことは非常に興味深く、次にこの合成致死性の原因について検討した。そのために *P_{GAL1}-CDC50 gcs1Δ*変異株を作製した。この株は Cdc50p の発現を *GAL1* promoter により制御しているため、galactose 培地では生育できるが、glucose 培地では致死となる。Cdc50p の発現を抑制して (Cdc50p-depleted) 8 hr 後の *gcs1Δ*変異株の表現型を観察した。Cdc50p-depleted *gcs1Δ*変異株について様々な輸送経路を検討したところ、endocytosis, exocytosis, cis Golgi から endoplasmic reticulum (ER)、ER から TGN, late endosome を経て vacuole までの輸送経路などはほぼ正常に機能していた。これに対して、GFP-Snc1p に加え、early endosome と TGN 間を recycle する t-SNARE である GFP-Tlg1p は細胞内の膜構造に異常に蓄積していた。この GFP-Tlg1p を含む膜構造は TGN marker である Sec7p を含まなかったことから、early endosome 由来の構造であると考えられる。すなわち、Cdc50p-Drs2p と Gcs1p は early endosome からの輸送に関わることが示唆された。次に Cdc50p-Drs2p と Gcs1p がどのように小胞輸送に関わるのかについて検討した。輸送小胞が形成されるにはコート蛋白質である clathrin がアダプター蛋白質である AP-1 を介して膜上に集積する必要があるが、出芽酵母では AP-1/clathrin がどのような機構で膜上に集積するか明らかにされていない。野生株、Cdc50p-depleted、あるいは *gcs1Δ*変異株では AP-1 は dot 状の構造に存在するが、Cdc50p-depleted *gcs1Δ*変異株では細胞質に異常に分散して存在していた。

[考察]

本研究では *CDC50* が輸送小胞の形成に関わる Arf の制御因子 *GCS1* と合成致死性を示すことを明らかとした。Cdc50p-depleted *gcs1Δ*変異株では AP-1 の局在が異常になること、そして early endosome からの小胞形成に強い異常が認められることから、Cdc50p-Drs2p と Gcs1p は特に early endosome 膜上に AP-1 を集積することで小胞形成に関わると考えられる。これまで、リン脂質の非対称性を制御する Cdc50p-Drs2p が細胞内小胞輸送に関わることが示唆されてきたが、どのような機構で関わるのかについては不明であった。今回の結果から、Cdc50p-Drs2p が Gcs1p と協調的に AP-1 を介して小胞輸送に関わることが示唆されるという非常に興味深い知見を得た。

小胞輸送は高等動物では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。出芽酵母は細胞内の詳細な分子機構を容易に解析できる点で非常に有用であり、今回得られた知見が疾病の分子レベルでの理解につながることを期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 口 昌 幸
副 査 教 授 志 田 壽 利
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 田 中 一 馬

学位論文題名

The Functional Relationship between the Cdc50p-Drs2p Putative Aminophospholipid Translocase and the Arf GAP Gcs1p in Vesicle Formation in the Retrieval Pathway from Yeast Early Endosomes to the TGN

(リン脂質輸送体 Cdc50-Drs2 と Arf GAP Gcs1 による
初期エンドソームから TGN への小胞輸送機構の解析)

細胞内小胞輸送機構の異常は様々な疾患を引き起こすが、小胞輸送の制御機構にはまだ不明な点が多く残されている。近年、生体膜脂質二重層におけるリン脂質の非対称性が小胞輸送に関与することが示唆されているが、その役割については明らかとなっていない。分子遺伝学、細胞生物学的解析が容易に行える出芽酵母は高等動物の生命現象を理解する上で、非常に優れたモデル生物である。そこで、本研究は出芽酵母をモデル系に用いてリン脂質輸送体 Cdc50-Drs2 の小胞輸送における役割の解明を目的とした。

遺伝子同士の機能の関連性を簡単に調べる酵母遺伝学的手法の一つとして、致死でない 2 つの変異の組み合わせにより致死性が引き起こされる合成致死変異スクリーニングがある。申請者は *CDC50* がどの小胞輸送関連遺伝子と合成致死性を示すかを検討し、輸送小胞の形成に関与する *ARF1* とその制御因子 *GCS1* を同定した。*Arf1* は細胞内では様々な輸送経路に関与するので、より特異的な輸送経路に関与する *Gcs1* に着目して *cdc50Δ gcs1Δ* 二重変異の合成致死性の原因について検討した。そのために *P_{GAL1}-CDC50 gcs1Δ* 変異株を作製した。この細胞は *Cdc50* の発現を *GAL1* promoter により制御しているため、galactose 培地では生育できるが、glucose 培地では致死となる。*Cdc50* の発現を抑制して (*Cdc50*-depleted) 8 hr 後の *gcs1Δ* 変異細胞の表現型を観察した。*Cdc50*-depleted *gcs1Δ* 変異細胞では、endocytosis、exocytosis、後期ゴルジ体 (TGN) から late endosome を経て vacuole に至る経路などはほぼ正常に機能していた。これに対して、細胞膜から early endosome と TGN を経て細胞膜へ戻る v-SNARE である GFP-Snc1 と、early endosome、

TGN 間を recycle する t-SNARE である GFP-Tlg1 は細胞内の膜構造に異常に蓄積していた。よって、この二重変異細胞は early endosome-TGN 間輸送に異常があることが推測された。また、このとき GFP-Tlg1 を含む膜構造は TGN marker である Sec7 を含まないことから、early endosome 由来の膜構造であると考えられる。これらの結果から、Cdc50-depleted *gcs1Δ*変異細胞では early endosome から TGN へ至る輸送経路に異常があることが示唆された。小胞輸送において輸送小胞が形成されるには被覆蛋白質である clathrin がアダプター蛋白質である AP-1 や Gga を介して膜上に集積する必要があるが、出芽酵母ではアダプター蛋白質/clathrin がどのような機構で膜上に集積するか明らかにされていない。野生株、Cdc50-depleted、あるいは *gcs1Δ*変異細胞では AP-1、Gga2 はともに TGN あるいは endosome 由来の dot 状の構造に存在するが、Cdc50-depleted *gcs1Δ*変異株では Gga2 は正常に局在する一方で、AP-1 は細胞質に異常に分散して存在していた。これらの結果により、リン脂質の非対称性を制御する Cdc50-Drs2 が Gcs1 と協調的に AP-1 の early endosome 膜上への集積を制御することで、early endosome 膜からの輸送小胞の形成に関与することが示唆された。

口頭発表において、副査の志田壽利教授から Gcs1 が初期エンドソーム膜において特異的に機能する要因や蛋白質の輸送機構について質問があった。続いて副査の畠山鎮次教授から AP-1 の膜上への集積に対する Cdc50-Drs2 によるリン脂質の非対称性の関与の分子機構や初期エンドソーム膜における Arf1 と Ypt31/32 の関連性について質問があった。また、主査の野口昌幸教授から合成致死変異スクリーニングで得られた結果の解釈や Arf1 機能における Gcs1 の役割について質問があった。また、副査の田中一馬教授から Gcs1 の Arf1 を介さない機能や Gcs1 が認識する積荷蛋白質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や文献的知識を引用し、誠実で概ね妥当な回答を行った。

この論文は、リン脂質の非対称性を制御する Cdc50-Drs2 がどのように小胞輸送に関与するかを解明した点において高く評価され、今後、高等動物の小胞輸送に関わる疾患の病因解明につながることを期待される。

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。