

学位論文題名

Endocytic recycling in yeast is regulated by
putative phospholipid translocases
and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway

(リン脂質トランスロケースと Ypt31/32-Rcy1 複合体による
エンドシティックリサイクリング経路の制御)

学位論文内容の要旨

目的と背景

生体膜を構成するリン脂質は通常二重層の内外で非対称に分布しており、一般に動物細胞ではホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンが外層に、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンが内層に多く分布している。細胞膜におけるこれら膜リン脂質の非対称性の破綻は細胞に様々な変化を及ぼす。例えば、ヒト赤血球膜では ATP 非存在下においてホスファチジルセリンが外層に露出し、赤血球の形態が通常の円盤状から金平糖状に変形する。また、アポトーシスによる膜リン脂質の非対称性の破綻は、内層に存在するホスファチジルセリンを細胞外層に露出させ、食細胞に対する食作用を誘発するシグナルとなる。このように膜非対称性の保持は細胞を維持していく上で重要な役割を果たす。近年、これらリン脂質の非対称性の制御は細胞内小胞輸送にも重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。真核細胞内は膜によって隔てられた細胞内小器官によって満たされているため、細胞内小胞輸送により各細胞内小器官が特定の蛋白質や因子を効率的にやり取りし、緊密な連絡網を保つことは細胞の機能維持にとって必要である。

膜リン脂質非対称性を制御するリン脂質トランスロケースは、膜脂質配向性の変化と細胞内小胞輸送の両方に関与する蛋白質として報告されているが、その機能については未だ不明な点が多い。出芽酵母において、リン脂質トランスロケースとして P 型 ATPase である *DRS2*、*DNF1*、*DNF2*、*DNF3* 及び *NEO1* (*DRS2* ファミリー) が同定されている。出芽酵母は迅速かつ的確な細胞生物学、分子遺伝学的手法を用いることが可能なため、分子細胞生物学領域でモデル生物として多くの研究室で使われている。また、我々の研究室では以前、*NEO1* を除くこれら P 型 ATPase の機能的サブユニットとして *CDC50*、*LEM3* 及び *CRF1* (*CDC50* ファミリー) を同定した。Cdc50p は Drs2p と、Lem3p は Dnf1p 並びに Dnf2p と、Crf1p は Dnf3p とそれぞれ複合体を形成する。

本論文ではリン脂質非対称性と細胞内小胞輸送との関連性を解明するため、Drs2p ファミリーと Cdc50p ファミリーに注目し、これらの細胞内における機能について解析を行った。

結果

我々は先ず、*CDC50* 遺伝子に変異を導入し、同時に *LEM3*、*CRF1* 遺伝子を欠損させることで高温感受性を示すようになる *cdc50-ts lem3Δ crf1Δ* 株を作成した (以下、*cdc50-ts* 株と

記す)。次に *cdc50-ts* 株の高温感受性を高発現により抑圧する、つまりその遺伝子を高発現させることで、*cdc50-ts* 株が高温でも増殖可能となる遺伝子を探索したところ、*YPT31/32* を同定した。*YPT31/32* は Rab/Ypt ファミリーに属する Small GTPase であり、細胞内小胞輸送、特にゴルジ体から細胞膜への輸送経路であるエキソサイトーシス、細胞膜から初期エンドソームを経由しゴルジ体へと至り再び細胞膜へ戻るといったリサイクリングを繰り返すエンドシティックリサイクリング経路に関与するとされていることから、我々は *cdc50-ts* 株における細胞内小胞輸送に着目した。出芽酵母においてはゴルジ体から細胞膜に至るエキソサイトーシス、細胞膜から液胞に至るエンドサイトーシス、ゴルジ体から後期エンドソームを経由し液胞へ至る VPS 経路、それと前述のエンドシティックリサイクリング経路が存在している。しかし、*cdc50-ts* 株においてエキソサイトーシス、エンドサイトーシス、VPS 経路には異常は認められなかった。エンドシティックリサイクリング経路によって細胞内を移動する v-SNARE として Snc1p が知られている。Snc1p の GFP 融合タンパク質の *cdc50-ts* 株における局在を蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、GFP-Snc1p が細胞の出芽部位や細胞分裂部位周辺の異常な構造物として観察された。この GFP-Snc1p を含んだ構造物は既知の初期エンドソームマーカーと共局在を示したことから、初期エンドソームに由来する構造物であることが示された。電子顕微鏡観察の結果、*cdc50-ts* 株には出芽部位や細胞分裂部位周辺に異常な膜構造物が蓄積しており、さらに免疫電子顕微鏡観察により Snc1p がこれらの異常な膜構造物に局在していることが示された。これら観察された膜構造物は後期ゴルジ体からの小胞形成に異常が生じている変異株に特徴的に観察される構造物と酷似していたことから、*cdc50-ts* 株では初期エンドソームからゴルジ体へ至る経路のうち、初期エンドソームからの小胞形成が正常に行われていない可能性が示唆された。

一方、Ypt31p/32p のエフェクターとして Rcy1p が報告されている。Ypt31p/32p は Rcy1p を初期エンドソーム膜へと移送する過程を制御するとされており、*rcy1Δ* 株では *cdc50-ts* 株と同様に初期エンドソームが細胞内に異常蓄積することが報告されている。興味深いことに *rcy1Δ* 株の低温感受性は *CDC50* と *DRS2* を同時に過剰発現させることにより抑圧され、同時に Snc1p の異常局在も正常に戻された。さらに共免疫沈降実験の結果、Rcy1p は Cdc50p-Drs2p 複合体と結合していることが明らかとなった。次に *rcy1Δ* 株における Cdc50p の局在を調べたところ、Cdc50p は Snc1p と同様の箇所に蓄積しているのが観察された。このことから Rcy1p 欠損下では Cdc50p-Drs2p は初期エンドソーム膜に局在しているにも関わらず、Cdc50p-Drs2p の機能は失われていることが示唆された。

考察

本研究では、Drs2p-Cdc50p 複合体が初期エンドソーム膜上で膜リン脂質の配向性を制御することで小胞形成に機能している可能性が示唆された。Drs2p-Cdc50p 複合体と Ypt31p/32p-Rcy1p との関係性については次のような仮説が立てられた。すなわち、(1) 活性化された Ypt31p/32p が初期エンドソーム膜上に Rcy1p を移動させる。(2) 膜に移動した Rcy1p は Drs2p-Cdc50p 複合体と結合することでリン脂質トランスロケースによるフリップ活性を引き起こす。これにより膜リン脂質の非対称性が増強される。(3) この膜リン脂質の非対称性は小胞形成時における膜の形態変化や、小胞形成に必要な被覆分子の集合を促す。これまで Ypt/Rab ファミリーが小胞形成機構に関与していることは報告されているが、Ypt/Rab ファミリーがリン脂質トランスロケースを介して小胞形成を制御している可能性を示したのは本研究が初めてである。初期エンドソームからの小胞形成に必要な被覆分子の探索や、実際にエンドソーム膜上において膜リン脂質配向性の変化がどのように小胞形成機構に関与しているかについては今後の機能解析が期待される。小胞輸送の異常は細胞極性形成不全や癌細胞の浸潤・転移に密接に関連している。本論文で出芽酵母を用いて得

られた知見がヒトにおける細胞内小胞輸送を解析するためのきっかけとなり、種々の疾患を解明する上で有効に活用され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 志 田 壽 利
副 査 教 授 野 口 昌 幸
副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway

(リン脂質トランスロケースと Ypt31/32-Rcy1 複合体による
エンドシティックリサイクリング経路の制御)

生体膜を構成するリン脂質は通常二重層の内外で非対称に分布しており、リン脂質の非対称性の制御は細胞内小胞輸送において重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。細胞内小胞輸送は細胞機能を保つ上で必要不可欠である一方、細胞内小胞輸送を介した微生物の感染が報告されている。膜リン脂質非対称性を制御するリン脂質トランスロケースは、膜脂質配向性の変化と細胞内小胞輸送の両方に関与する蛋白質として報告されているが、その機能については未だ不明な点が多い。出芽酵母において、リン脂質トランスロケースとしてP型ATPaseである *DRS2*、*DNF1*、*DNF2*、*DNF3* 及び *NEO1* (*DRS2* ファミリー) が同定されている。出芽酵母は迅速かつ的確な細胞生物学、分子遺伝学的手法を用いることが可能なため、分子細胞生物学領域でモデル生物として多くの研究室で使われている。以前、我々の研究室では *NEO1* を除くこれらP型ATPaseの機能的サブユニットとして *CDC50*、*LEM3* 及び *CRF1* (*CDC50* ファミリー) を同定した。Cdc50はDrs2と、Lem3はDnf1並びにDnf2と、Crf1はDnf3とそれぞれ複合体を形成する。本研究では細胞内小胞輸送の制御機構における生体膜リン脂質非対称性の生理的意義を解明するため、Drs2、およびCdc50ファミリーの細胞内機能の解析を試みた。

先ず、*CDC50* 遺伝子に変異を導入し、同時に *LEM3*、*CRF1* 遺伝子を欠損させることで高温感受性を示すようになる *cdc50*-温度感受性変異 *lem3* 欠損 *crf1* 欠損株を作成した(以下、*cdc50*-温度感受性株と記す)。次に *cdc50*-温度感受性株の高温感受性を高発現により抑圧する遺伝子を探索したところ、*YPT31/32* を同定した。*YPT31/32* は Rab/Ypt ファミリーに属する Small GTPase であり、細胞内小胞輸送に関与するとされていることから、*cdc50*-温度感受性株における細胞内小胞輸送に着目した。その結果、*cdc50*-温度感受性株においては初期エンドソームからの小胞形成に異常が生じている

可能性が示唆された。一方、最近 Segev らのグループによって Ypt31/32 は Ypt31/32 のエフェクターである Rcy1 を初期エンドソーム膜へと移送する過程を制御し、初期エンドソームから後期ゴルジ体へと至る経路に関与するという報告がなされた。共免疫沈降実験の結果、Rcy1 は Cdc50-Drs2 複合体と結合していることが明らかとなった。また、*rcy1* 欠損株における Cdc50 の局在を調べたところ、Cdc50 は初期エンドソームに蓄積して観察された。このことから *RCY1* 欠損下では Cdc50-Drs2 複合体の機能は失われていることが示唆された。本研究により Cdc50-Drs2 複合体と Ypt31/32-Rcy1 との関係性については次のような仮説が立てられた。すなわち、(1) 活性化された Ypt31/32 が初期エンドソーム膜上に Rcy1 を移動させる。(2) 膜に移動した Rcy1 は Cdc50-Drs2 複合体と結合することでリン脂質トランスロケースによるフリップ活性を引き起こす。これにより膜リン脂質の非対称性が増強される。(3) この膜リン脂質の非対称性は小胞形成時における膜の形態変化や、小胞形成に必要な被覆分子の集合を促す。

口頭発表において、副査の野口昌幸教授から Cdc50-Drs2 複合体と Rcy1 との膜を介した結合についての質問があった。続いて副査の志田壽利教授から哺乳動物細胞における Ypt31/32、Rcy1、及び Cdc50-Drs2 複合体ファミリーの機能についての質問があった。主査の畠山鎮次教授からは Cdc50-Drs2 複合体と Rcy1 が結合して機能する上で他の因子が関与している可能性についての質問があった。副査の田中一馬教授からは Cdc50-Drs2 複合体が初期エンドソームに対して特異的に機能しているメカニズムについての質問があった。これらに対し申請者は、自己の研究成果と文献的知識を基に概ね妥当な回答を行った。

この論文は、Ypt/Rab ファミリーがリン脂質トランスロケースを介して小胞形成を制御している可能性を初めて示した点で高く評価され、今後膜リン脂質の非対称性の生理機構と細胞内小胞輸送との関連性の解析が、小胞輸送が関与する疾患や感染症の発症機構の解明に繋がることが期待される。

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。