

細胞膜脂質非対称センサー及び その下流シグナル経路の解明

学位論文内容の要旨

細胞膜の脂質は二重層を形成しているが、その内層と外層では脂質組成が異なることが知られ、脂質非対称と呼ばれている。脂質非対称の維持および変化は、膜の安定性、小胞輸送、細胞極性、細胞周期などの生命現象において重要であり、非対称の破綻はアポトーシス、血液凝固などに関係する。したがって、脂質非対称は厳密に制御される必要があり、細胞は変化に応答するシグナル伝達機構を備えていることが考えられる。しかしながら、そのような脂質非対称のホメオスタシスを維持する機構はこれまで全く不明であった。

近年、脂質の二重層間の輸送(フリップ・フロップ)を行い、脂質非対称の規定に大きく寄与するトランスロカーゼ(フリッパーゼとフロッパーゼ)と呼ばれる分子が同定されてきている。当研究室では、スフィンゴ脂質の骨格部分であるスフィンゴイド塩基のフロッパーゼ(細胞質側から細胞質外側への輸送を行うトランスロカーゼ) *Rsb1* を酵母で同定した(Kihara and Igarashi, *J. Biol. Chem.* 277, 30048-54, 2002)。その後の解析によって、グリセロリン脂質のトランスロカーゼの欠損によってグリセロリン脂質非対称が損なわれると、通常低く保たれている *Rsb1* の発現が転写レベルで大きく上昇するという発見がなされ(Kihara and Igarashi, *Mol. Biol. Cell* 15, 4949-59, 2004)、このことはグリセロリン脂質非対称変化を感知するセンサーやその下流シグナル経路が存在することを示唆していた。本論文では、トランスポソンの挿入により脂質非対称変化(グリセロリン脂質のフロッパーゼ *pdr5* 欠損変異)が誘発する *Rsb1* 発現上昇が損なわれた酵母変異株を単離し、その原因遺伝子の解析を行うことによって、細胞膜脂質非対称変化を感知するセンサーやその下流のシグナル経路の解明を試みた。

まず、*RSB1* のプロモーター下にレポーター遺伝子としてプリン塩基合成に関わる *ADE2* を融合させ、さらにフロッパーゼ *pdr5* 欠損変異を導入した。*Ade2* タンパク質の発現が低いと赤色のプリン中間物質が蓄積するので、細胞の色を指標に *RSB1* プロモーター活性を判別することが可能である。その細胞のゲノム中のランダムな位置にトランスポソンを挿入することにより、グリセロリン脂質フロップ変化が誘発する *Rsb1* の発現上昇が損なわれた酵母変異株を単離した。さらなる解析の結果、フロップ変化が誘発する *Rsb1* 発現上昇に必要な因子として、*Rsb1* の発現制御が既知である転写因子 *Pdr1* に加え、新たに転写因子 *Mot3*、タンパクキナーゼ *Mck1*、pH 応答に関わる *Rim* 経路の因子 *Rim13*、*Rim20*、*Rim21* の5つを同定した。

そのうち、*Rim13*、*Rim20*、*Rim21* はいずれも細胞外 pH 変化に応答する *Rim* 経路の因子であ

り、下流の転写因子 Rim101 の活性化に必要であることが知られていた。*rim101* 欠損変異細胞の Rsb1 量を調べると、*rim13*, *rim20*, *rim21* 欠損変異細胞のものと同程度に減少することが明らかとなった。このことから、Rim13, Rim20, Rim21 は Rim101 を介して Rsb1 発現誘導を制御することが示唆された。さらに、Rim101 の活性化には、Rim13, Rim20, Rim21 に加えて、それ以外の Rim 因子や ESCRT 複合体のいくつかの因子が必要とされる。それらの因子が一つでも欠損するとフロップ変化による Rsb1 の発現上昇が損なわれたことから、Rim 経路はフロップ変化が誘発する Rsb1 の発現上昇に必要であることが示された。

また、Rsb1 の発現上昇は、*pad5* 遺伝子欠損によるフロップの変化だけではなく、逆向きの細胞質層から細胞外層への輸送（フリップ）の変化によって誘導される。*mot3*, *mck1*, *rim101* 欠損変異を導入するとフリップ変化による Rsb1 の発現誘導も損なわれたことから、Mot3, Mck1, Rim 経路はフロップ変化とフリップ変化両方の非対称変化シグナルに関わることが明らかとなった。さらに、Mot3, Mck1, Rim 経路の経路間における関係を検討したところ、それぞれの経路が独立に Rsb1 の発現誘導を制御することが示唆された。

本論文では、Rim 経路が Rsb1 の非対称変化による発現誘導に必要であることを明らかにした。さらに、その Rim 経路自身がグリセロリン脂質の非対称変化によって活性化を受けるという制御機構を見いだした。また、Rim101 による Rsb1 の発現調節機構の解析を行い、Rim101 は転写抑制因子 Nrg1 の発現を抑制することにより、Rsb1 の発現を正に制御していることを明らかにした。

以上、本論文では脂質非対称シグナル経路という新しいコンセプトのホメオスタシス維持機構の解明に取り組み、グリセロリン脂質非対称変化による Rsb1 の発現誘導には、Rim 経路、Mot3 や Mck1 が関連する経路が必要であることを明らかにした。そのうち Rim 経路は、Nrg1 を介して脂質非対称変化による Rsb1 発現誘導に必要であると同時に、脂質非対称の変化によって活性化することを明らかにした。これらの結果は、Rim 経路が脂質非対称応答のシグナル経路であることを示している。Rim 経路の最も上流では、膜貫通型タンパク質 Rim21 と Dfg16 が pH センサーとして機能することが考えられている。脂質非対称変化による Rsb1 の発現誘導には Rim 経路の全ての因子が必要であったことから、最上流の Rim21 や Dfg16 が pH と脂質非対称を同一のものとして感知している可能性が高いと考えられる。脂質非対称が変化すると負電荷を持つリン脂質は細胞膜外層に分布するようになる。一方、pH の上昇も細胞膜近傍の電荷を負に変化させる。よって Rim21 や Dfg16 が、両者を表面電荷として同様に感知するのではないかと推察している。本論文で得られた脂質非対称シグナルの知見は、今後、脂質非対称が関連する様々な生理現象を理解していくうえで役に立つことが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 五十嵐 靖 之
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助教授 木 原 章 雄
副 査 助教授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

細胞膜脂質非対称センサー及び

その下流シグナル経路の解明

細胞膜は脂質二重層からなり、それを構成する脂質分子は外層と内層に偏って分布することから、脂質非対称と呼ばれている。この脂質非対称は、トランスロカーゼという酵素が、膜脂質の細胞質外層から細胞質層への移行（フリップ）、あるいは細胞質層から細胞質外層への移行（フロップ）を行うことによって維持されている。脂質非対称の維持は、細胞膜の安定性、細胞分裂、細胞骨格制御に必要であることや、その破綻がアポトーシスや血小板活性化に関わることが知られており、生命活動に極めて重要である。脂質非対称は様々な細胞応答と関わることから、非対称が変化した時にはそれを元に戻す機構が必要である。しかしながら、そのような脂質非対称の恒常性維持の機構はこれまで解明されていなかった。申請者の研究室では、グリセロリン脂質の非対称が損なわれると、スフィンゴイド塩基のトランスロカーゼ Rsb1 の発現が誘導されることを見いだしており、このことはグリセロリン脂質非対称変化を感知するセンサーやその下流シグナル経路が存在することを示唆していた。そこで申請者は、それらの同定と詳細な分子機構の解明を目指した。

申請者はまず、脂質非対称シグナル経路関連因子を同定するための酵母変異株スクリーニング系の構築を行った。プリン塩基合成に関わる ADE2 をレポーター遺伝子として用いることにより、RSB1 プロモーター活性を細胞の色に反映させて簡便に判別可能とした。そして、グリセロリン脂質非対称変化（フロップを行うトランスロカーゼ *pdr5* 欠損変異）により誘導される RSB1 プロモーター活性の増強がトランスポゾン挿入によって損なわれた酵母変異株を単離した。その結果、脂質非対称変化を感知するセンサーやシグナル経路に関連する因子として、転写因子 Mot3, タンパクキナーゼ Mck1, pH 応答に関わる Rim 経路の因子 Rim13, Rim20, Rim21 を同定した。さらにその後の解析により、他の全ての Rim 経路も Rsb1 発現誘導に関わることを明らかにした。また、それらの経路間の関係を調べ、Rim 経

路や, Mck1, Mot3 が関連する経路はそれぞれ独立に Rsb1 の発現を制御することを示唆した。さらに, Mot3, Mck1, Rim 経路はフロップ変化だけではなくフリップ変化による非対称変化が誘発する Rsb1 発現にも必要であることを明らかにした。

本研究では, 細胞外の pH 上昇により活性化されることが知られていた Rim 経路についてさらに詳細な解析が行われた。申請者は脂質非対称変化による Rsb1 発現誘導に Rim 経路が必要であったことから, pH だけではなく非対称変化によって Rim 経路が活性化する可能性について検討を行った。その結果, グリセロリン脂質非対称変化が Rim 経路を活性化することを明らかにした。この結果は, Rim 経路が脂質非対称が脂質非対称脂質非対称シグナル応答経路であることを強く示唆していた。さらに Rim21, Rim20, Rim13 が制御する転写因子 Rim101 の下流について解析を行い, Rim101 は転写抑制因子 Nrg1 の発現抑制を介して Rsb1 の発現を正に制御していることを明らかにした。

本論文は, 遺伝学的アプローチにより脂質非対称シグナル経路という新しいホメオスタシス維持の機構を明らかにしたものであり, 研究テーマ, 方法の両方においてオリジナリティが高い。脂質非対称シグナル経路の同定は, 脂質非対称が関わる様々な生命現象を理解していく上で今後重要な知見となる。また, Rim 経路の最上流の膜タンパク質 Rim21 と Dfg16 が pH と脂質非対称を表面電荷として感知するセンサーである可能性が考察されており, 今後の研究の発展が期待された。よって, 申請者は博士(薬学)の学位を受領するに十分な資質を有するものであることを認めた。