

Fpk1p Fpk2p 蛋白質リン酸化酵素による 脂質二重層非対称性の制御

学位論文内容の要旨

【背景と目的】真核生物の細胞膜において、リン脂質は二重層の内層と外層とで非対称に分布する事が知られている。一般にフォスファチジルセリン(PS)とフォスファチジルエタノールアミン(PE)は細胞膜の内層に分布し、フォスファチジルコリンやスフィンゴミエリン、glycolipid は外層に分布する。リン脂質非対称性は ATP 依存性のトランスポーターによって維持されているとされ、4 型の P-type ATPase は、フリップと呼ばれる外層から内層へのリン脂質の輸送に関わっていると考えられている。出芽酵母において、4 型の P-type ATPase には 5 つのメンバーがあり、それぞれ Drs2p, Neolp, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p である。Dnf1p と Dnf2p は細胞膜に局在し、Dnf1p と Dnf2p の欠失は細胞膜上のフリップ活性を低下させる。Drs2p はエンドソームとゴルジ体に局在し、ゴルジ体と輸送小胞上でのフリップに関わる事が示されている。Drs2p や Dnf1p/Dnf2p/Dnf3p は、それぞれ Lem3p-Cdc50p ファミリーと複合体を形成する事が最近報告されている。

現在この領域ではリン脂質の非対称性の調節機構や、その上流のシグナルを明らかにする事が重要になってきている。最近 Cdc50p-Drs2p が Ypt31p/32p(Rab ファミリーの small GTPases)のエフェクターである Rcy1p と相互作用し、Ypt31p/32p-Rcy1p が Cdc50p-Drs2p を調節することでエンドソーム-ゴルジ体間の輸送小胞の形成を促進している事が明らかにされている。しかしながら Dnf1p と Dnf2p はいずれも Rcy1p とは相互作用しないことが分かっている。これは Lem3p-Dnf1p/Dnf2p が Ypt31p/32p-Rcy1p 経路とは異なる経路で制御される事を示唆する。そこで本研究は、Dnf1p/Dnf2p の機能に関わる遺伝子を、cdc50Δ欠損株の合成致死スクリーニングにより探索する事を目的に開始した。

【方法と結果】

cdc50Δ欠損株の合成致死スクリーニングを施行し、他のいくつかの遺伝子と共に同定した遺伝子 YNR047w を FPK1 と名付けた。Fpk1p はセリン・トレオニンキナーゼであり、キナーゼ活性を減衰させる点変異も CDC50 と合成致死となる事が分かった。また FPK1 のキナーゼドメインとよく似た配列をもつ遺伝子 KIN82 を FPK2 と名付けた。Cdc50p-depleted fpk1Δ 二重変異株における成長阻害は FPK2 を欠損させる事でさらに憎悪し、また Cdc50p-depleted fpk1Δ fpk2Δ 三重変異株はエンドシティックリサイクリング経路に異常が生じ、リサイクリングマーカである Snc1p と Tlg1p が細胞内の異常構造物中で共局在することが示唆された。これらは Fpk1p/Fpk2p が相補的な機能を有し、それぞれ Cdc50p-Drs2p と機能的に関連する事を示唆する。

fpk1Δ fpk2Δ 二重欠損株は Duramycin に対して増殖感受性を示し、またビオチン化した Ro09-0198 を使用して細胞膜上のフォスファチジルエタノールアミン(PE)を可視化したと

ころ、細胞分裂後期においても細胞膜外層に局在する事が分かった。これらの結果は *fpk1Δ fpk2Δ* 二重欠損株における細胞膜上の PE が、野生株と比較して外層に多く局在する事を示唆するものである。次に *fpk1Δ fpk2Δ* 二重欠損株における細胞膜上のフリッパーゼ活性を、蛍光ラベルしたリン脂質を使用して検討した。その結果、*fpk1Δ fpk2Δ* 二重欠損株におけるフリッパーゼ活性は野生株と比較して低く、PE のみならずフォスファチジルコリン(PC) やフォスファチジルセリン(PS) に対しての活性も低かった。さらに Fpk1p の点変異を用いた実験により、フリッパーゼ活性は Fpk1p のリン酸化能依存的であることも分かった。

これらの結果は、*dnf1Δ dnf2Δ* 二重欠損株や、Dnf1p/Dnf2p の subunit である *lem3Δ* 欠損株で見られる phenotype とよく似ており、Fpk1p/Fpk2p が Dnf1p-Lem3 や Dnf2p-Lem3 と同様の機能を持つことを示唆した。そこで私は、*fpk1Δ fpk2Δ* 二重欠損株における Dnf1p/Dnf2p の発現量を検討したところ、野生株と *fpk1Δ fpk2Δ* 二重欠損株で大差ないことが分かった。また Dnf1p/Dnf2p の局在部位をショ糖濃度勾配遠心法や顕微鏡観察において検討したところ、野生株と *fpk1Δ fpk2Δ* 二重欠損株で変わらないという結果が得られた。一方で mRFP-Fpk1p と Dnf1p-GFP が同じ局在パターンを示す事から、Fpk1p/Fpk2p が直接 Dnf1p/Dnf2p を制御していると言う仮説が立てられるに至った。

そこで私は *in vitro* キナーゼアッセイを行い、精製した Fpk1p が 5 種類のフリッパーゼ (Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p, Drs2p, Neolp) をそれぞれリン酸化するか検討した。その結果、Dnf1p と Dnf2p が Fpk1p により効率よくリン酸化されることが判明した。一方で Neolp はほとんどリン酸化されなかった。

以上の結果から、Fpk1p/Fpk2p は Dnf1p/Dnf2p をリン酸化することでその機能を活性化し、リン脂質二重層非対称性の制御を行っていることを示唆する。

【考察】

本研究では、Fpk1p と Fpk2p がリン脂質二重層の非対称性の制御を行っている事を明らかにした。この制御には Fpk1p のリン酸化能が必須であると言う結果から、Fpk1p の基質はリン酸化されることでフリッパーゼ活性をもつ事が示唆される。*fpk1Δ fpk2Δ* 二重欠損株が *lem3Δ* 欠損株と似た phenotype を示す事や、Dnf1p/Dnf2p が Fpk1p によって効率よくリン酸化されることから、Fpk1p/Fpk2p は Dnf1p/Dnf2p の上流に位置し、その活性を制御している事が考えられる。

現在までに Rcy1p が Drs2p-Cdc50p の上流因子であり、Drs2p-Cdc50p の機能を制御していることが報告されている。本研究では 4 型の P-type ATPase に対する新たな制御機構を明らかにしているが、Fpk1p/Fpk2p が Dnf1p/Dnf2p のどのアミノ酸をリン酸化するのか、またリン酸化依存的に Dnf1p/Dnf2p のフリッパーゼ活性が上昇するのかは、今後解明すべき重要な課題である。本論文で出芽酵母を用いて得られた知見が、ヒトをはじめとする高等細胞におけるリン脂質二重層の非対称性を解析するための契機となり、種々の分子機序を解明する上で有効に活用される事が期待される。

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 准教授 濱 田 淳 一

学 位 論 文 題 名

Fpk1p Fpk2p 蛋白質リン酸化酵素による 脂質二重層非対称性の制御

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、この非対称性はリン脂質輸送体の働きにより形成されると考えられている。最近、細胞膜外側から細胞質側への脂質輸送に関わる因子として P4 型 ATPase に属するリン脂質トランスロケースの機能が注目されている。このリン脂質トランスロケースの異常により胆汁うっ滞症をはじめ種々の疾患が引き起こされるが、その制御機構についてはほとんど明らかにされていない。

出芽酵母において、このタイプのリン脂質トランスロケースとして *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明確な細胞生物学、分子遺伝学的手法を用いることができるため、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用されている。申請者が所属する研究室では *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) が同定されている。*Cdc50p* は *Drs2p* と、*Lem3p* は *Dnf1p* 並びに *Dnf2p* と、*Crflp* は *Dnf3p* とそれぞれ複合体を形成する。本研究ではリン脂質非対称性の細胞機能や制御機構を解明することを目的に、*CDC50* と機能的に関わる遺伝子を合成致死スクリーニングにより検索した。

同定した遺伝子 *YNR047w* を *FPK1* と名付けた。また *FPK1* と相同な遺伝子 *KIN82* を *FPK2* と名付けた。まず、*FPK1/FPK2* の機能を遺伝学的、細胞生物学的に解析した。*cdc50* 変異株ではエンドシティックリサイクリング経路に軽度の異常が見られるが、*cdc50 fpk1 fpk2* 変異株ではこれが強く増悪した。*LEM3-DNF1/2* の変異も *cdc50* 変異と合わさると似たような表現型を示すことから、*FPK1/2* は *LEM3-DNF1/2* と関連する機能を有することが示唆された。*Lem3p-Dnf1/2p* は主として細胞膜で働き、細胞膜の脂質輸送を制御している。フォスファチジルエタノールアミン(PE)に特異的に結合する Ro09-0198 用いて細胞膜上の PE を可視化したところ、*lem3* 株と同様 *fpk1 fpk2* 変異株において PE が細胞膜外側に露出していることが明らかとなった。加えて *fpk1 fpk2* 欠損株における細胞膜上のリン脂質トランスロケース活性を検討したところ、これも *lem3* 株と同様に低下していることが明らかとなった。

これらの結果から、Fpk1p/Fpk2p が Lem3p-Dnf1p や Lem3p-Dnf2p と同様の機能を持つことが示唆された。*fpk1 fpk2* 二重欠損株においては Dnf1p/Dnf2p の発現量および細胞内局在には変化がなかったこと、mRFP-Fpk1p と Dnf1p-GFP が同じ細胞内局在パターンを示すことから、Fpk1p/Fpk2p がリン酸化により直接 Dnf1p/Dnf2p を制御している仮説が考えられた。そこで精製した Fpk1p 蛋白質を用いて *in vitro* リン酸化アッセイを行った結果、Dnf1p と Dnf2p が Fpk1p により効率よくリン酸化されることが明らかとなった。

本研究により、Fpk1p と Fpk2p によるリン脂質二重層の非対称性の制御について次のような機能が考えられた。(1) Fpk1p と Fpk2p によるリン酸化により活性化された Dnf1p、Dnf2p は細胞膜上で脂質を輸送し、リン脂質の非対称性を制御する。(2) *cdc50* 欠損株においては、リン酸化により活性化された Dnf1p、Dnf2p がエンドソーム上のリン脂質非対称性も制御し、輸送小胞の形成を促進する。

発表後、副査の濱田淳一准教授から Fpk1p による Dnf1p のリン酸化部位とその役割について、また、動物細胞におけるリン脂質トランスロケースの機能について質問があった。続いて副査の志田壽利教授から Fpk1p によるリン酸化は Dnf1p/Dnf2p のトランスロケース活性を活性化するのかどうか、また、Fpk1p の他の基質についても質問があった。主査の野口昌幸教授からは Fpk1p の機能ドメインの解析および Fpk2p が合成致死スクリーニングで同定できなかった理由について質問があった。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誠実に、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、リン脂質トランスロケースの活性制御機構を始めて明らかにしたものとして高く評価され、今後膜リン脂質非対称性の調節機構とその破綻による疾患発症メカニズム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。