

## 学 位 論 文 題 名

Isolation and characterization of novel mutations in CDC50,  
the non-catalytic subunit of Drs2p phospholipid flippase

(Drs2p リン脂質フリッパーゼの非触媒サブユニットCDC50の新規変異体の単離と解析)

## 学位論文内容の要旨

## 目的と背景

すべての真核生物は不均等、非対称な構造をしており、これを細胞の極性という。細胞の極性は細胞形態の維持・形成や運動などに重要な役割を果たす。癌細胞では細胞極性に異常が生じ、運動能が亢進していることが知られており、細胞極性のメカニズムを解明することは、癌の浸潤、転移などの解明につながることを期待されている。細胞極性の形成にはタンパク質や脂質などの秩序だった配置に働く細胞内小胞輸送が関与する。最近、エンドサイトーシスにより細胞膜から細胞内に取り込まれた蛋白質が、エンドソームを介して再度細胞膜へ輸送されるリサイクリング経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。一方、生体膜を構成するリン脂質は通常二重層の内外で組成が異なることが知られており、リン脂質の非対称性と呼ばれている。このリン脂質の非対称性の制御因子として、P 型 ATPase のサブファミリーである P4-ATPase が同定されており、リン脂質を細胞膜外層から内層へ転移(フリップ)するフリッパーゼとして機能する。出芽酵母では Drs2, Dnf1, Dnf2, Dnf3, Neol1 の 5 つのタンパク質が存在し、Drs2 ファミリーと呼ばれる。出芽酵母は、遺伝学的・生化学的実験手法が確立されており、モデル生物として有用である。研究室では出芽酵母を用いて、細胞極性形成を制御する因子として同定した Cdc50、その相同タンパク質 Lem3, Crf1 (Cdc50 ファミリー) が Drs2, Dnf1 と Dnf2、そして Dnf3 とそれぞれ複合体を形成することを明らかにしてきた。Cdc50-Drs2 複合体は主にエンドソーム/ゴルジ体に局在し、リサイクリング経路に関わることがわかっており、これまでに、Cdc50 は Drs2 のエンドソーム/ゴルジ体への局在に必要であることが示されている。さらに、Drs2 の ATPase 反応に貢献し、フリッパーゼのサブユニットとして機能する可能性についても議論されているが、詳細は明らかとなっていない。本論文ではリン脂質フリッパーゼの分子機能を解明する目的で、Cdc50 の Cdc50-Drs2 複体内での役割を解析した。

## 結果

まず、Drs2 と複合体を形成するが機能不全となる Cdc50 変異体を探索した。Drs2 と複合体を形成しない Cdc50 は小胞体に留まることが既にわかっていたので、緑色蛍光タンパク質 GFP を CDC50 に融合した CDC50-GFP プラスミドを作製した。PCR により変異を誘発した CDC50-GFP プラスミドを *cdc50 Δ lem3 Δ crf1 Δ* 株に導入し、低温 (25℃) では増殖可能だが高温 (37℃) では増殖できない温度感受性変異株 (ts 株) を選択した。このうち、高温でも Cdc50-GFP がゴルジ体/エンドソームに正しく局在する株を選択し、6 つの *cdc50-ts* 変異 (*ts1-10*, *ts3-7*, *ts4-7*, *ts7-27*, *ts8-10* および *ts9-4*) を得た。これらの変異部位を同定したところ、膜貫通領域内またはその近傍にアミノ酸置換が生じていた。以後、6 つの変異株のうち、より強い増殖欠損を示した 2 つの ts 変異体 (*ts7-27* と *ts9-4*) について詳細に解析を行った。

Cdc50-ts 変異体が Drs2 と実際に複合体を形成しているかを調べた。Drs2 に赤色蛍光タンパク質 mRFP1 を融合した Drs2-mRFP1 と Cdc50-ts-GFP を同時に発現する株を作製し、その局在を観察したところ、Cdc50-ts-GFP シグナルを含むドットの大部分は Drs2-mRFP1 シグナルと重複し、両タンパク質が共局在することが示された。また、Drs2 にエピトープ

タグを融合した Drs2-13myc を Cdc50-ts-GFP と同時に発現する株を作製し、免疫沈降実験を行った。高温で培養した細胞の細胞抽出液から Drs2-13myc と Cdc50-ts-GFP は共免疫沈降され、Cdc50-ts は Drs2p と複合体を形成することが示された。

先行研究から、Cdc50-Drs2 はリサイクリング経路において、初期エンドソームからゴルジ体への小胞形成に関わり、その機能には Drs2 のフリッパーゼ活性が重要であることがわかってきた。野生型細胞は細胞壁成分キチンの合成酵素 Chs3 がエンドソーム/ゴルジ体と細胞膜間を循環するため、キチン結合薬剤 Calcofluor White (CW) に感受性を示す。Chs3 のゴルジ体から細胞膜への輸送が停止する *chs6Δ* 変異細胞では CW 耐性となるが、Drs2 の機能欠損が加わり、初期エンドソームからゴルジ体への輸送が滞ると、Chs3 はバイパス経路により細胞膜に到るため、CW 感受性となることが知られている。*cdc50-ts chs6Δ* 変異株は *drs2Δ chs6Δ* 変異株と同様、CW 感受性を示したことから、*cdc50-ts* 変異では Drs2 の機能が欠損することが示唆された。

出芽酵母のリサイクリング経路マーカーとして v-SNARE である Snc1 が知られており、Cdc50 ファミリー欠損細胞 (*cdc50Δ lem3Δ crf1Δ*) では Snc1 が初期エンドソームに蓄積することが示されている。*cdc50Δ lem3Δ crf1Δ* 株で mRFP-Snc1 及び Cdc50-ts-GFP を発現させ、これらの局在を観察した。野生型 Cdc50-GFP を発現した細胞は、mRFP-Snc1 は主に芽出部位の細胞膜に局在したが、*cdc50-ts-GFP* を発現した細胞では mRFP-Snc1 が細胞内に蓄積した。また、*cdc50-ts lem3Δ crf1Δ* 株で mRFP-Snc1 と Drs2-GFP の局在を観察したところ、*cdc50-ts* 株では mRFP-Snc1 が細胞内の膜構造のみに存在する細胞の割合が顕著に増加しており、そのような細胞では Drs2-GFP と mRFP-Snc1 の両シグナルが重なっていた。これら2つの結果により、高温において Cdc50-ts-Drs2 複合体はフリッパーゼ機能を失い、初期エンドソームからの小胞形成ができないことが示唆された。

#### 考察

本研究では、Cdc50 の新規の変異体を取得・解析することにより、Cdc50 が Drs2 のリン脂質フリッパーゼ活性に関わるサブユニットとして機能することを初めて細胞レベルで示すことに成功した。最近の報告において、Drs2 がフリッパーゼとして機能する際に必要な ATP 加水分解サイクルへの Cdc50 の関与が示唆され、Cdc50 の2つの膜貫通部位が特に重要である可能性が議論されていたが、今回取得した Cdc50-ts 変異体は膜貫通部位の近傍にアミノ酸置換が生じており、この部位が Drs2 の ATP 加水分解サイクルの遂行を通したフリッパーゼ機能に何らかの関わりがあると推測される。今後、試験管内再構築実験などにより、Cdc50 の Drs2 フリッパーゼ機能への寄与の詳細、また、初期エンドソームからの小胞形成における役割が明らかとなることが期待される。小胞輸送の異常は、細胞運動や細胞極性形成の異常を介して癌細胞の浸潤・転移などに関連する可能性があり、本研究で出芽酵母を用いて得られた知見がヒトにおける細胞運動や細胞極性形成のメカニズムの解明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  | 平野 | 聡  |
| 副査 | 教授  | 志田 | 壽利 |
| 副査 | 准教授 | 濱田 | 淳一 |
| 副査 | 教授  | 田中 | 一馬 |

## 学位論文題名

### Isolation and characterization of novel mutations in CDC50, the non-catalytic subunit of Drs2p phospholipid flippase

(Drs2p リン脂質フリッパーゼの非触媒サブユニットCDC50の新規変異体の単離と解析)

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、これはリン脂質を細胞膜外層から内層へ転移（フリップ）するリン脂質フリッパーゼの働きにより形成されると考えられている。リン脂質フリッパーゼの異常により種々の疾患が引き起こされるが、フリッパーゼの細胞機能については不明な点が多い。すでに出芽酵母をモデル系に用いて、細胞極性形成を制御するタンパク質として同定した *Cdc50* が、*Drs2* フリッパーゼと複合体を形成していることが明らかにされている。*Drs2* は P 型 ATPase のサブファミリーである P4-ATPase であり、そのフリッパーゼ機能によるリン脂質二重層間の移動が輸送小胞の形成を促し、細胞内小胞輸送において働いていることが示唆されている。*Cdc50* は *Drs2* のエンドソーム/ゴルジ体への局在に必要であり、さらに、フリッパーゼのサブユニットとして *Drs2* の ATPase 反応に貢献する可能性についても議論されているが、詳細は明らかではない。本論文ではリン脂質フリッパーゼの分子機能を解明する目的で、*Cdc50* の *Cdc50*-*Drs2* 複体内での役割を解析した。

まず、*Drs2* と複合体を形成するが機能不全となる *Cdc50* 変異体を探索した。緑色蛍光タンパク質 GFP を *CDC50* に融合した *CDC50*-GFP プラスミドを作製した。PCR により変異を誘発した *CDC50*-GFP プラスミドを *cdc50*  $\Delta$  *lem3*  $\Delta$  *crf1*  $\Delta$  株に導入し、低温（25℃）では増殖可能だが高温（37℃）では増殖できない温度感受性変異株（ts 株）を選択した。このうち、高温でも *Cdc50*-GFP がゴルジ体/エンドソームに正しく局在する株を選択し、6 つの *cdc50*-ts 変異を得た。これらの変異部位を同定したところ、膜貫通領域内またはその近傍にアミノ酸置換が生じていた。以後、6 つの変異株のうち、より強い増殖欠損を示した 2 つの ts 変異体（*ts7-27* と *ts9-4*）について詳細に解析を行った。

まず、*Cdc50*-ts 変異体が *Drs2* と実際に細胞内で複合体を形成しているかを調べた。*Drs2* に赤色蛍光タンパク質 mRFP1 を融合した *Drs2*-mRFP1 と *Cdc50*-ts-GFP を同時に発現す

る株を作製してその局在を観察したところ、Cdc50-ts-GFP シグナルを含むドットの大部分は Drs2-mRFP1 シグナルと重複し、両タンパク質が共局在することが示された。また、Drs2 にエピトープタグを融合した Drs2-13myc を Cdc50-ts-GFP と同時に発現する株を作製し、免疫沈降実験を行った。高温で培養した細胞の細胞抽出液から Drs2-13myc と Cdc50-ts-GFP は共免疫沈降され、Cdc50-ts は Drs2p と複合体を形成することが示された。

先行研究から、Cdc50-Drs2 はリサイクリング経路において初期エンドソームからゴルジ体への小胞形成に関わり、その機能には Drs2 のフリッパーゼ活性が重要であることがわかっていて、これら 2 つの Cdc50-ts 変異体が初期エンドソームからゴルジ体への小胞輸送に欠陥が生じているかどうかを確かめるために、細胞膜、初期エンドソーム、ゴルジ体を循環する Chs3 の Calcofluor White (CW) に対する感受性とリサイクリング経路マーカーである Snc1 の細胞内局在について検討した。これらの実験結果により、2 つの Cdc50-ts 変異体は高温において Cdc50-ts-Drs2 複合体におけるフリッパーゼ機能を失い、初期エンドソームからの小胞形成ができないことが示唆された。

本研究では Cdc50 の新規の変異体を取得・解析することにより、Cdc50 が Drs2 のリン脂質フリッパーゼ活性に関わるサブユニットとして機能することを初めて細胞レベルで示すことに成功した。小胞輸送の異常は細胞運動や細胞極性形成の異常を介して癌細胞の浸潤・転移などに関連する可能性があり、本研究で出芽酵母を用いて得られた知見がヒトにおける細胞運動や細胞極性形成のメカニズムの解明につながることを期待される。

発表後、副査の志田壽利教授より変異株においてフリッパーゼ活性を測定したかどうか、Drs2 のフリッパーゼ活性との関連で今回の Cdc50-ts 変異体で新しくわかったことについて質問があった。続いて副査の濱田淳一准教授より Cdc50-ts 変異体の変異部位により表現型の違いがあるのかどうか、また、フリッパーゼの変異と疾病との関係について質問があった。次に副査の田中一馬教授より他の P 型 ATPase と異なり、Drs2 が Cdc50 をサブユニットとして働かせていることの利点についての質問があった。最後に主査の平野聡教授より癌細胞と細胞極性、細胞内小胞輸送との関係における本研究の位置づけ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、フリッパーゼのサブユニットが細胞内で重要な機能を果たしていることを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形成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。