

## 学位論文題名

## A study on the function of phospholipid flippases in the sorting of the tryptophan permease Tat2p

(トリプトファン輸送体Tat2pの細胞内輸送におけるリン脂質フリッパーゼの機能に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

膜リン脂質非対称性は真核生物の生体膜において広く認められる現象だが、その生理的意義はよくわかっていない。Type 4 P-type ATPase (P4 ATPase)は脂質二重層間で能動的にリン脂質を細胞質側へと輸送するフリッパーゼであると考えられており、膜リン脂質非対称性の形成に重要な役割を担っている。P4 ATPaseはその機能と局在に Cdc50 family protein を必要とし、これらのタンパク質は真核生物の間で酵母からヒトまで高度に保存されている。そのためリン脂質非対称性の基本的な生理機能を分子機構から理解するには、遺伝学や分子生物学的手法が幅広く適用でき、モデル生物として発達してきた出芽酵母を利用することが近道の一つである。

酵母ゲノムにコードされている P4 ATPase の内、Dnf1p、Dnf2p は CDC50 family protein の Lem3p と複合体を形成し、phosphatidylcholine (PC)や phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylserine (PS)といったリン脂質の輸送に関与すると考えられている。本研究は *lem3Δ* 変異株、および *dnf1Δ dnf2Δ* 二重変異株がアミノ酸の一つであるトリプトファン(Trp)の取り込み不全を示すという発見を端緒としている。また、PS 合成酵素の欠損株が Trp 取り込み不全を示すことも既に報告されており、Trp 取り込み機構の制御にフリッパーゼによるリン脂質の輸送が関与していることが推測された。酵母には Trp の取り込み機構として、高親和性 Trp 輸送体 Tat2p と低親和性 Trp 輸送体 Tat1p という 2 つのタンパク質が存在する。*tat2Δ* 変異と *tat1Δ* 変異は合成的な Trp の取り込み不全を引き起こすが、*lem3Δ* 変異は *tat1Δ* 変異とのみ合成的な Trp 取り込み不全を示した。加えて、*lem3Δ* 変異株における Trp の取り込みは Tat2p の高発現で回復したため、*lem3Δ* 変異株における Tat2p の制御異常が示唆された。しかしながら、Tat2p の転写活性や Tat2p 分子の Trp 取り込み活性には *lem3Δ* 変異の影響が見られなかった。そこで Tat2p に対する抗体を作製し、Tat2p の細胞内局在を検討したところ、*lem3Δ* 変異株では細胞膜上の Tat2p 量が減少していることがわかった。この Tat2p の誤局在の原因を遺伝学、生化学的に解析したところ、*lem3Δ* 変異株では Tat2p が trans-Golgi-network (TGN)から液胞へと、細胞膜を経由せずに、誤輸送されていると考えられた。この誤輸送は Tat2p のユビキチン化を抑制することで抑圧されたため、Lem3p-Dnf1p/2p はユビキチン化を介して、Tat2p の輸送を制御していることが示唆された。Tat2p のユビキチン化はその N 末端細胞質領域に対して起こる。そこでこの領域のリン脂質への結合性を検討したところ、Tat2p の N 末端細胞質領域が Lem3p-Dnf1p/2p の既知の基質である PC, PE, PS の内、PS を含むリポソームへと結合することを発見した。

この脂質結合性には Tat2p の N 末端細胞質領域内の塩基性アミノ酸残基が関与していることが推測されたため、該当する残基の alanine 置換体を作製したところ、リポソームへの親和性を低下させる変異を取得することができた。N 末端細胞質領域の脂質膜への結合が細胞内で生理機能を持ちうるかどうかを検討するため、この脂質結合変異を持つ Tat2p を *tat2Δ* 変異株に発現させてみたが、Trp を取り込むことはできなかった。この結果は *in vitro* で確認された脂質膜への結合が *in vivo* での Tat2p の機能に必要であることを示唆している。脂質結合変異体 Tat2p の機能不全の原因を探るために細胞内局在を検討したところ、細胞膜上の局在が減少していた。加えて、脂質結合変異 Tat2p の機能はそのユビキチン化を阻害することで回復することがわかった。これらの結果は N 末端細胞質領域の脂質結合性がユビキチン化を介する Tat2p の輸送制御に関与していることを示唆しており、Lem3p-Dnf1p/2p によるユビキチン化を介する Tat2p の輸送制御との相関を伺わせるものである。

以上の結果から、本研究ではタンパク質細胞内輸送制御における膜リン脂質非対称性の持つ未知の生理機能として新たなモデルを提唱する。Lem3p-Dnf1p/2p によって TGN 膜の細胞質側へ輸送された PS は、Tat2p の N 末端細胞質領域の膜への結合を強める。この結合はユビキチン化酵素と Tat2p との相互作用に干渉し、ユビキチン化を抑制することによって Tat2p の細胞膜への輸送を促す。その一方、*lem3Δ* 変異株では PS が TGN 膜の細胞質側に輸送されず、Tat2p の N 末端細胞質領域が膜から乖離する。膜から乖離した Tat2p の N 末端細胞質領域はユビキチン化酵素と相互作用しやすくなり、液胞へと輸送される。本研究の成果は、膜脂質によるタンパク質の細胞内輸送制御機構の観点から、良いモデルになると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬  
副 査 教 授 山 下 正 兼  
副 査 准教授 藤 田 知 道

## 学 位 論 文 題 名

### A study on the function of phospholipid flippases in the sorting of the tryptophan permease Tat2p

(トリプトファン輸送体Tat2pの細胞内輸送におけるリン脂質フリッパーゼの機能に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

細胞内小胞輸送は、すべての細胞活動を支える基本的な細胞機能である。近年の研究により、細胞内小胞輸送に関与するタンパク質については多くのものが同定されており、その機能や作用機構が詳細に解析されている。一方で、細胞内小胞輸送は一方の膜から他方の膜への小胞を介した脂質の輸送機構であるにも関わらず、脂質が細胞内小胞輸送の機能や制御にどのように関与しているのかについては多くが未解明のまま残されている。

本論文は、このような状況で、出芽酵母をモデル系に用いて、膜脂質の非対称性を制御するフリッパーゼの細胞内小胞輸送における機能について解析し、フリッパーゼによる脂質輸送がトリプトファン輸送体の細胞膜への正常な輸送に必要であることを示したものである。

膜リン脂質非対称性は真核生物の生体膜において広く認められる現象であるが、その生理的意義はよくわかっていない。フリッパーゼは、脂質二重層間で能動的にリン脂質を細胞質側へと輸送する。フリッパーゼはATPase活性を有し脂質輸送を促進する触媒サブユニットと、触媒サブユニットの機能と局在に重要な役割を果たす非触媒サブユニットから成っている。これらのタンパク質は真核生物の間で酵母からヒトまで高度に保存されている。酵母のフリッパーゼのうち、Dnf1p、Dnf2p触媒サブユニットはLem3p非触媒サブユニットと複合体を形成し、フォスファチジルコリンやフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリンといったリン脂質の輸送を促進すると考えられている。

著者は、まず、*lem3Δ* 変異株がトリプトファンの取り込み不全を示すことを見出した。遺伝学的な解析手法を用いて、*lem3Δ* 変異株では、Tat2p と呼ばれるトリプトファン輸送体が細胞膜へ輸送されずに液胞へと誤輸送されていることを明らかにした。これは、フリッパーゼが膜タンパク質の選別輸送を制御することを明確に示した最初の例である。

次に著者は、*lem3Δ* 変異株において Tat2p が誤輸送されるメカニズムについて解析を行った。そのメカニズムとしては、(1) 細胞膜より高速にエンドサイトーシスされている、(2) 後期ゴルジ体から細胞膜ではなくエンドソームへと輸送されている、の二つの可能性が考えられる。著者は、後期ゴルジ体からエンドソームへの輸送に関与する遺伝子の変異体を用いて、(2) の可能性が正しいことを明らかにした。更に著者は、この誤輸送がどのようにして起こるのかについて、タンパク質輸送経路の制御に重要な役割を果たす、ユビキチン化が関与しているのではないかと推察した。そこで、ユビキチン化に関わる遺伝子の変異体を用いて検討したところ、Tat2p は、*lem3Δ* 変異株では、後期ゴルジ体においてユビキチン化を受けることにより、液胞へと誤輸送されることを明らかにした。これらの結果は、後期ゴルジ体における脂質の非対称性がカーゴタンパク質のユビキチン化に関与することを始めて示した結果であり、高く評価される。

著者は更にこのユビキチン化が何故起こるのかについて研究を進めた。Tat2p は N 末端側の細胞質領域でユビキチン化を受けることが知られていることから、この N 末端領域が膜脂質に結合

する可能性について検討したところ、フォスファチジルセリンを含むリボソームへと結合することを見出した。フォスファチジルセリンは負電荷を帯びた脂質であることから、この脂質結合性には Tat2p の N 末端細胞質領域内の塩基性アミノ酸残基が関与していることが推測された。そこで該当するリジンあるいはアルギニン残基のアラニン置換体を作製したところ、リボソームへの親和性を低下させる変異を取得することができた。この脂質結合変異を持つ Tat2p を *tat2Δ* 変異株に発現させたところ、トリプトファン取り込み能が低下しており、これは、変異 Tat2p がゴルジ体でユビキチン化を受けて液胞へ誤輸送されていること、すなわち、*lem3Δ* 変異株における Tat2p と同様のことが生じていることを著者は明らかにした。これらの結果は、カーゴタンパク質と膜脂質の結合が、ユビキチンリガーゼによるユビキチン化を制御することを始めて示したものであり、非常に新規性が高い研究成果である。

これを要するに、著者は、フリッパーゼによる脂質輸送が、膜タンパク質のユビキチン化を制御することにより、その選別輸送を支配するとの新知見を得たものであり、細胞内小胞輸送の研究領域に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。