

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 27 年度博士課程 進学
氏名 水池 彩
指導教官 堀内 裕之

論文題目

Saccharomyces cerevisiae におけるオルガネラ間リン脂質輸送機構の研究

生体膜は、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール、糖脂質など様々な脂質を主要構成成分とする脂質二重層により構成される。生体膜を構成する脂質の組成は細胞内で均一ではなくオルガネラごとに異なっており、このことがオルガネラの構造と機能に重要であると考えられている。一方で、生体膜構成脂質は特定のオルガネラでのみ合成されるため、オルガネラ間での脂質分子の方向性をもった輸送により、脂質の不均一分布が作り出され、維持されると考えられている。

リン脂質は生体膜構成成分の中で最も多く存在する脂質であり、生合成に関する酵素はほぼ全て同定されている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の CDP-DAG 経路では、小胞体でホスファチジルセリン (PS) 合成酵素 Pss1 により CDP-DAG とセリンから合成された PS はミトコンドリアあるいはエンドソームへ輸送され、PS 脱炭酸酵素 Psd1、Psd2 によりホスファチジルエタノールアミン (PE) に変換される。さらに PE の一部は小胞体に輸送され PE メチル化酵素 Pem1、Pem2 による 3 段階のメチル化を受けてホスファチジルコリン (PC) となる。このようにリン脂質合成酵素は様々なオルガネラに局在しており、リン脂質の合成にはそのオルガネラ間輸送が必須であるが、リン脂質のオルガネラ間輸送機構は未解明である。

PSD1 の破壊株ではミトコンドリアの PE が不足し、呼吸機能欠損となるため、非発酵性炭素源培地での生育が悪化する。*psd1Δ* 株の生育はエタノールアミンの添加により回復することから、ケネディ経路を介して小胞体で合成された PE がミトコンドリアに供給されると考えられる。ミトコンドリアへの PE 輸送に関わる遺伝子の同定を目的として、当研究室の小林により *psd1Δ* 株の非発酵性炭素源培地での生育を高発現すること

により回復させる遺伝子の探索が行われ、*SEC14* ホモログの一つである *SFH1* が単離された。*Sec14* は *in vitro* でホスファチジルイノシトール (PI) と PC を輸送する活性を有する生育に必須のタンパク質である。*S. cerevisiae* には *Sec14* のホモログとして *Sfh1*~*Sfh5* の 5 種が存在する。*Sfh1* は *in vivo*、*in vitro* で PI、PC、PE を脂質結合ポケットに挿入することが示唆されているが、*Sec14* と異なり、*in vitro* での PI、PC 輸送活性は非常に低いことが報告されており、その機能は未解明である。小林は、*SFH1* の高発現による *psd1Δ* 株の呼吸機能の回復には *Psd2* による PE 合成が重要であること、*Sfh1* が細胞内で PE に結合していることを明らかにし、*Sfh1* がエンドソームからの PE 輸送を担う可能性を提唱した。このような背景のもと、本研究では細胞内リン脂質輸送機構の解明を目的として、*Sfh1* 及び *Sec14* ファミリータンパク質の機能解析を行った。

第 1 章 *Sfh1* の機能の解析

まず、*SFH1* の高発現がリン脂質合成酵素の量や活性に影響を及ぼすか解析を行った。ウエスタン解析により *SFH1* を高発現しても *psd1Δ* 株において *Pss1*、*Psd2* のタンパク質量は変化しないことが明らかになった。また、*SFH1* を高発現しても細胞破碎液中の *Psd2* 活性は変化しないことが確認された。さらに、*PSD2* の高発現は *psd1Δ* 株の生育を回復させるのに対して、*PSS1* の高発現は生育を悪化させたことから、*SFH1* の高発現により *Pss1* を増加あるいは活性化させる可能性は低いと考えられた。これまでに小林により *Sfh1* が *in vitro* で *Pss1* 活性を上昇させないことが確認されていることと合わせて、*Sfh1* は PS、PE 合成酵素を増加あるいは活性化させるわけではないことが示唆された。

これまでに *Sfh1* の PC、PE との結合に欠損を持つ変異体 *Sfh1*ST を高発現しても *psd1Δ* 株の非発酵性炭素源培地での生育は回復しないことが示されている。そこで、*Sfh1*ST を酵母から精製し、その結合リン脂質種について解析を行ったところ、野生型の *Sfh1* では PC、PE、PS との結合が観察されたのに対して、*Sfh1*ST は PC、PE だけでなく PS との結合能も低下している傾向にあることが示唆された。

次に、*Sfh1* のリン脂質輸送能を明らかにするため、蛍光標識された NBD-リン脂質の人工膜間の輸送を FRET (fluorescence resonance energy transfer) による消光を利用して解析した。その結果、*Sfh1* は *in vitro* で NBD-PS を輸送する活性を有するのに対して、*Sfh1*ST はその輸送活性が低下していることが示唆された。*Sfh1* は NBD-PC の輸送活性も有していたが、*Sfh1*ST を用いた場合には輸送活性の低下は見られなかった。

これまでに蛍光顕微鏡観察によって *Sfh1* は細胞質と核に局在することが示されているが、*Sfh1* の膜局在について生化学的に解析を行った。ショ糖密度勾配遠心による細胞抽出液の分画の結果から、*Sfh1* の一部は *Psd2* の局在するエンドソームに局在する可能

性が示唆された。以上の結果から、Sfh1 は小胞体で合成された PS をエンドソームに輸送することで Psd2 による PE 合成を亢進する可能性が考えられた。

SFH1 は破壊しても生育に影響をほとんど与えない。*S. cerevisiae* における PE 合成経路では Psd1 による PS の脱炭酸が主要であるため、Sfh1 が Psd2 への PS 輸送に関与している場合、*SFH1* を破壊しても Psd1 によって合成された PE が十分量存在するために生育に影響が出ないと予想された。そこで *psd1Δ* 株において *SFH1* を破壊したところ、乳酸培地における生育の悪化がみられ、*SFH1* が細胞内で生理的機能を有していることが示唆された。また、*psd1Δsfh1Δ* 株では *psd1Δ* 株と比較して PS、PE、PC の総量が減少し、PI が増加している傾向にあった。*SFH1* 破壊によりエンドソームへの PS 輸送効率が低下した結果、生産物阻害により PS 合成が低下し、余剰となった CDP-DAG が PI 合成に用いられた可能性が考えられる。

第 2 章 Sfh1 と Sec14 の機能の違いの解析

SFH1 は酵母の進化の過程で全ゲノム重複により生じた *SEC14* のパラログであると考えられており、*SEC14* と最も相同性、類似性を示す遺伝子であるが、*SFH1* を高発現しても *SEC14* の欠損を部分的にしか抑圧できない。一方で、*SFH1* は高発現により *psd1Δ* 株の乳酸培地での生育を回復させるのに対して、*SEC14* の高発現による生育の回復は弱い。内在性のタンパク質量が Sfh1 の約 20 倍であることを考え合わせると、*SEC14* は *SFH1* の機能をほとんど有さないと考えられる。そこで、Sfh1 と Sec14 のキメラタンパク質の解析から *SFH1* と *SEC14* の機能の違いが何に起因するのかを明らかにすることを試みた。

小林により Sfh1 の 112-185 領域を Sec14 の 110-183 領域に置換した Chimera2.5 と、Sec14 の 110-183 領域を Sfh1 の 112-185 領域に置換した Chimera2.5R が作製され、Chimera2.5 は Sfh1 の機能を喪失し、Chimera2.5R は Sfh1 の機能を獲得したことが確認された。これらのキメラタンパク質の *in vivo* 結合脂質解析を行った結果、Chimera2.5R は Chimera2.5 よりも PC、PE との結合能が高かったことから、Sfh1 の 112-185 領域がリン脂質との結合に重要であることが示唆された。さらにショ糖密度勾配遠心によりこれらのタンパク質の細胞内局在を解析したところ、Sec14、Chimera2.5 は主に細胞質やゴルジ体が存在する画分から検出されたのに対し、Sfh1 と Chimera2.5R はエンドソームが存在する画分から検出された。このことから、Sfh1 と Sec14 の機能の違いは、リン脂質との結合能に加え、局在の違いに起因する可能性が考えられ、さらに、Sfh1 の 112-185 領域がエンドソーム局在に重要であることが示唆された。

Sfh1 のエンドソーム膜との相互作用機構の解明を目的として *SFH1* の変異体プラス

ミドライブラリーを作製し、膜結合に欠損をもつ変異体を探索した。取得された変異体のうちの Sfh1^{K134E,G246D} はリン脂質との結合能に変化はみられなかったが *psd1Δ*株の乳酸培地での生育を回復させることができなかったことから、これらの残基が Sfh1 の膜局在と機能に重要である可能性が考えられた。

第3章 Sec14 及び Sec14 ファミリータンパク質の機能解析

Sec14 は、ゴルジ体の PI-4 キナーゼ Pik1 に PI を提示することで PI4P 合成を促進し、ゴルジ体からの小胞輸送に関与するというモデルが提唱されているが、Sec14 の PI 輸送能を失った変異体のみを発現する株も生育できたことから、Sec14 の機能は未だ確定していない。一方、*SFH* 遺伝子を全て破壊しても生育は可能であり、その機能には不明な点が多く残されている。Sec14 ファミリータンパク質の機能を明らかにするため、Sec14 ファミリータンパク質を全て欠損させる条件変異株として *SFH1~SFH5* を破壊した背景で *SEC14* の温度感受性変異 *sec14-1* を導入した株と Sec14 の分解を薬剤により誘導できるようにした株の2種を作製し、表現型の解析を行った。*SFH1~SFH5* を全てを破壊すると *sec14* 温度感受性変異株の高温感受性が悪化したことから、*SFH1~SFH5* が *SEC14* と生育に重要な機能を共有していることが示唆された。これら2種の変異株の細胞内微細構造を観察したところ、Sec14 の欠損株で見られる多重膜小胞の増加などの生体膜構造の異常が *SFH* 遺伝子の破壊により悪化することが明らかになった。さらに、Sec14 の欠損株はミトコンドリアの形態に異常を示すが、これも *SFH1~SFH5* の破壊により重篤化した。Sec14 ファミリータンパク質の欠損により細胞内及びミトコンドリアのリン脂質組成が変化し、さらにミトコンドリアのリン脂質量が低下したことから、Sec14 ファミリータンパク質がミトコンドリアのリン脂質組成と形態の維持に関与することが示唆された。

総括

第1章の結果から、Sfh1 は小胞体からエンドソームへ PS を輸送する機能を有することが示唆された。Sfh1 の高発現により *psd1Δ*株の非発酵性炭素源培地での生育が回復した理由としては、エンドソームへの PS の供給が増加し Psd2 による PE 合成の効率が上昇したことによるというモデルが考えられた。また、第2章の結果より、Sfh1 と Sec14 の機能の違いは、PC、PE などのアミノリン脂質との高い結合能と細胞内での局在に起因する可能性が考えられた。第3章の結果から、Sec14 ファミリータンパク質がミトコンドリアの形態維持においても重複した機能を有することが示唆された。