

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07288

研究課題名(和文)脂質非対称センシング機構の解明および応用研究の基盤形成

研究課題名(英文)Elucidation of sensing mechanism of lipid asymmetry and establishment of bases for its application

研究代表者

小原 圭介(Obara, Keisuke)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：30419858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞膜脂質非対称の状態変化を感知するセンサータンパク質Rim21に着目して研究を行った。その結果、Rim21の脂質非対称センサーモチーフが酸性脂質と相互作用することを通して脂質非対称の状態変化を感知することを示唆したほか、Rim21が受ける糖鎖修飾の役割を解明した。また、脂質非対称の状態変化を生きた酵母細胞で検出可能なバイオセンサーを作製し、さらに系統的な変異解析によってS/N比を向上させた。Rim21が発するシグナル伝達は真菌感染症の創薬標的と成り得るが、そのシグナル伝達の活性化や不活性化機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行ったRim21による脂質非対称感知機構に関する提案は、タンパク質と脂質の相互作用に関する新たなパラダイムと成り得る。

本研究で開発した脂質非対称バイオセンサーは、生きた細胞での脂質非対称変化の追跡という、これまで不可能であったアプローチを可能とする。今後、動植物細胞で利用可能なバイオセンサーの開発などを通して、脂質非対称研究のボトルネックであった生細胞でのリアルタイム解析を達成し、分野の発展に大きく貢献する可能性がある。

本研究で明らかにしたRim101経路の不活性化機構は、真菌感染症の創薬に寄与する知見となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on Rim21, the sensor protein for altered lipid asymmetry in the plasma membrane. We suggested that Rim21 senses alterations in lipid asymmetry through interaction between lipid asymmetry sensor motifs in Rim21 and acidic lipids in the plasma membrane. We also elucidated the function of N-glycosylation of Rim21. A biosensor that can report the state of lipid asymmetry in living yeast cells was developed in this study. Moreover, we succeeded in improving the S/N ratio of this prototype biosensor by mutagenesis approach.

Rim21 invokes a signal transduction pathway called the Rim101 pathway, and this pathway is a good potential drug target. We revealed that activation of this pathway is regulated by antagonistic action of ubiquitination and deubiquitination. In addition, we elucidated the mechanism and the biological significance of attenuation of the Rim101 pathway.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：脂質非対称 細胞膜 出芽酵母 バイオセンサー 真菌感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 細胞膜の脂質二重層では、内外層で脂質組成が大きく異なる。その様な脂質非対称は、様々な膜現象に密接に関わり、細胞の生存に必須である。私達は、脂質非対称の状態変化を感知して適応反応を引き起こすセンサータンパク質 Rim21 を同定した。Rim21 が脂質非対称を感知する分子機構は完全には解明されていなかった。
- (2) 脂質非対称の状態を生きた細胞でモニターするツールが存在せず、当該研究分野のボトルネックとなっていた。脂質非対称センサーRim21 を用いることで、その様な脂質非対称バイオセンサーを開発できる可能性が有り、期待されていた。
- (3) Rim21 が発するシグナルは Rim101 経路によって伝達される。Rim101 経路は病原性真菌類が宿主内で増殖し、病原性を発揮するのに必要であるため、真菌感染症の新たな創薬標的として有望である。しかし、Rim101 経路の活性化や不活性化の仕組みには不明な部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

- (1) Rim21 が脂質非対称の状態を感知する分子機構を解明することを目指した。
- (2) Rim21 を用いて生きた細胞で脂質非対称の状態をモニターできるバイオセンサーの開発を目的とした。
- (3) Rim101 経路の活性化・不活性化機構を明らかにし、真菌感染症の創薬に寄与する知見を取得することを目指した。

3. 研究の方法

- (1) Rim21 は細胞膜に局在する多重膜貫通タンパク質である。私達は、Rim21 が柔軟性の高い細胞質領域 (Rim21C) を触角の様に用いて、細胞膜内層との相互作用を繰り返しながら脂質非対称の状態をモニターするという「触角仮説」を提唱している。そこで、Rim21C の組換えタンパク質と脂質分子との相互作用を *in vitro* 実験系により明らかにする。また細胞膜脂質の組成や非対称性が変化した出芽酵母変異体を用いて、GFP-Rim21C の挙動を追跡し、*in vivo* で Rim21C が相互作用する脂質分子種や膜の状態を明らかにする。
- (2) GFP-Rim21C を脂質非対称バイオセンサーの雛形として、これに対する系統的な変異解析を行い、脂質非対称変化に応じた細胞膜への着脱をより高い S/N 比で検出できる改良版を作製する。脂質非対称バイオセンサーを用いて、様々な環境ストレスに曝した出芽酵母細胞を観察し、環境ストレスと細胞膜脂質非対称の関係を明らかにする。
- (3) 出芽酵母の脱コビキチン化酵素の遺伝子の欠損株やその多重変異株における Rim101 経路の活性化レベルを調べる。またシクロヘキシミドチェイス実験により、Rim101 の半減期を調べ、Rim101 経路のアテニュエーションの仕組みに迫る。

4. 研究成果

- (1) GST-Rim21C 組換えタンパク質を大腸菌およびコムギ胚芽の無細胞系を用いて精製した。それを用いて各種脂質分子をスポットしたメンブレンに対する lipid overlay assay を行い Rim21C が相互作用しうる脂質分子種を探索した。その結果、Rim21C はホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルイノシトール(4,5)-2リン酸、ホスファチジン酸といった負電荷を有する脂質と結合することが明らかになった。一方、ホスファチジルイノシトール(3)-リン酸、ホスファチジルイノシトール(4)-リン酸、フィトスフィンゴシン 1-リン酸も負電荷を有するが、これらの脂質には結合しなかった。したがって、負電荷を有する脂質の中でもある程度の選択性が存在することが明らかになった。ホスファチジルエタノールアミンは負電荷を有さないが、内層にそのほとんどが存在し、非対称分布を示す代表的な脂質である。そこで、Rim21C とホスファチジルエタノールアミンの結合を調べたが結合しなかった。しかし、ホスファチジルエタノールアミンを先の結合した酸性脂質に混在させると Rim21C への結合力が強まった。プロトンを受容可能なアミノ基を有するホスファチジルエタノールアミンは、近傍の酸性脂質の脱プロトン化を促し、平衡を負に傾けることで Rim21C に対する親和性を高めていると考えられる。これら結合した酸性脂質やその結合を増強したホスファチジルエタノールアミンは、いずれもほとんどが内層に存在する脂質であるため、*in vivo* でも Rim21C を相互作用しうるトポロジー関係にある。脂質非対称が変化して、酸性脂質やホスファチジルエタノールアミンが内層から減少することで、Rim21C が細胞膜内層から解離して脂質非対称シグナルが発せられると予想される。この成果を、NMR 解析などで実証することも試みたが、必要量の組換え Rim21C タンパク質の合成が不可能であった。そこで、昆虫細胞を用いた Rim21C の大量精製を目指し、その実験系を構築した。

研究の過程で、Rim21 が非典型的な糖鎖付加モチーフで N 型糖鎖修飾を受けることを見出した。その糖鎖修飾は、細胞膜上での Rim21 の特定の膜環境への局在化に関わることを見出した。

- (2) GFP-Rim21C を脂質非対称バイオセンサーの雛形として、荷電アミノ酸残基や菌類で保存されたモチーフなどに注目して系統的な変異解析を行った。その結果、菌類に保存された機能未知の WEW モチーフの W 残基を A や S に置換（ここではそれぞれ WA 変異、WS 変異と呼ぶ）することで、通常時は雛形よりも細胞膜により高い親和性で結合し（細胞膜からのシグナルが明瞭に検出しやすい）脂質非対称が変化した変異体では雛形と同様に細胞膜から解離することを見出した。すなわち、脂質非対称変化に対する細胞膜からの解離をより明瞭に検出できる改良版バイオセンサーの作製に成功した。また、WA 変異もしくは WS 変異を導入した Rim21C をタンデムに連結した上で GFP に融合することで、この傾向をより強めることが出来た。すなわち、検出の S/N 比の異なるバイオセンサーシリーズの作製に成功した。

このバイオセンサーシリーズを用いて、様々な環境ストレス下での出芽酵母細胞でも脂質非対称の状態をモニターした。すると、環境の pH 上昇や塩濃度の上昇などに応じて、脂質非対称バイオセンサーの細胞膜からの解離が観察された。これらのストレスが脂質非対称の変化をもたらし、それを通して Rim21 が感知している可能性を示している。そこで、実際にアルカリ環境下で脂質非対称の形成・維持に必要な脂質分子の内外層間反転移動の速度を測定したところ大きく減少していた。また、アルカリ性培地や高塩濃度培地では、RIM21 欠損株は顕著な生育阻害を示した。これらのことから、環境の pH 上昇や塩ストレスは脂質非対称の変化など細胞膜の性質に変化をもたらし、それを Rim21 が感知して適応反応を引き起こしていることが示唆された。

- (3) 私たちはこれまでに Rim101 経路の活性化にユビキチンリガーゼ Rsp5 によるユビキチン化が必須であることを見出してきた。本研究では、脱ユビキチン化反応に着目して研究を行った。すると、ある脱ユビキチン化酵素遺伝子の欠損株で Rim101 経路が恒常的に活性化していることを見出した。すなわち、Rsp5 によるユビキチン化と脱ユビキチン化酵素による脱ユビキチン化反応の拮抗作用によって、Rim101 経路の過剰・不必要な活性化が抑制されている様子が浮き彫りになった。

また、Rim101 経路では最終的に転写因子である Rim101 が切断されて活性化する。本研究では、Rim101 が半減期約 15 分という短寿命なタンパク質であること、ユビキチン-プロテアソームシステムがこの迅速な分解に関わることを見出した。さらに、活性化した Rim101 が蓄積すると細胞はアルカリストレスや塩ストレスに対する耐性を獲得したが、重金属に対して超高感受性になった。このことは、Rim101 の迅速な分解は、細胞が重金属ストレスなど他のストレスに柔軟に対応するために必要であることが示唆された。活性化したシグナル伝達経路のアテニュエーションによって他のストレスに備える、という細胞に備わった柔軟なストレス耐性の仕組みを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Makuta H, Obara K, Kihara A	4. 巻 VOL 161
2. 論文標題 Loop 5 region is important for the activity of the long-chain base transporter Rsb1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvw059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Obara K, Kihara A	4. 巻 VOL 474
2. 論文標題 The Rim101 pathway contributes to ER stress adaptation through sensing the state of plasma membrane.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 51-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20160580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Obara K, Kotani T, Nakatogawa H, Kihara A, Kamura T	4. 巻 VOL 45
2. 論文標題 N-glycosylation of Rim21 at an unconventional site fine-tunes its behavior in the plasma membrane.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.19021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安田有那、小原圭介、嘉村巧
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称バイオセンサー開発の試み
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小原圭介、嘉村巧
2. 発表標題 ユビキチン化を介した細胞膜脂質非対称シグナリング
3. 学会等名 第2回ユビキチン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原圭介、安田 有那、嘉村巧
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称バイオセンサーの開発
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原 圭介
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称センサーが細胞内外のストレスを感知する仕組み
3. 学会等名 日本遺伝学会第89回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小原 圭介
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称の感知機構と細胞応答の解明
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Obara K, Nishino K, Kihara A
2. 発表標題 Sensing mechanism of alterations in plasma membrane lipid asymmetry and external alkalization.
3. 学会等名 14th International Congress on Yeasts (ICY14) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小原 圭介、西野 佳菜子、内堀 健矢、山内 佐織、木原 章雄
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称センシング機構と細胞応答
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 安田 有那、小原 圭介、嘉村 巧
2. 発表標題 細胞外刺激と細胞膜脂質非対称の関係性の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原 圭介、嘉村 巧
2. 発表標題 細胞膜の脂質非対称性を感知する仕組み
3. 学会等名 新学術領域「数理シグナル」第3回若手ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Obara K, Yasuda A, Kamura T
2. 発表標題 Development of a biosensor for the plasma membrane lipid asymmetry.
3. 学会等名 29th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----