

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14645

研究課題名(和文)膜の品質管理機構の解明を目指す - 細胞膜上の異常膜ドメインの解消機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the resolution mechanism of abnormal membrane domain on the plasma membrane

研究代表者

三岡 哲生 (Mioka, Tetsuo)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：60754538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はリン脂質ホスファチジルセリンが合成できない出芽酵母の変異株において、細胞膜上に膜タンパク質が存在しない新奇な膜ドメインが発生すること、さらにこの細胞膜上の異常な膜ドメインに、酵母のリソソーム様オルガネラである液胞が接触することを見出した。本研究ではこの接触が積極的な膜ドメインの解消に寄与している可能性を検討したが、当初の仮説に反し、むしろ液胞と膜ドメインの接触は長時間安定的に持続する事が明らかとなった。本研究ではこの接触の生理的意義の全容解明には至らなかったものの、何らかの異常な膜に対しての新規の細胞応答である可能性が示唆され、膜ドメイン自体の幾つかの基本的性質を明らかにする事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜上で脂質やタンパク質がどのように動き、分布しているかは、細胞機能の理解にとって重要な問いであり未だに理解の途上である。本研究では、こうした分布が異常になる巨大な細胞膜領域の発見を起点として、この新規な膜領域の基本的性質や細胞内への影響を調べた。その結果、細胞膜上に発生した異常な膜領域に対して、液胞と呼ばれる小器官が細胞内部から接触し、それが長時間維持されるという新規な細胞内現象を観察することができ、またその性質の一端についても明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In phosphatidylserine-deficient yeast mutant cells, we found that a novel membrane domain with no membrane protein is generated in the plasma membrane, and that vacuoles, the lysosome-like organelle of yeast, contact this unusual membrane domain. In this study, we investigated the possibility that this contact actively contributes to the resolution of the abnormal membrane domain. As a result, contrary to our initial hypothesis, the contact between the vacuole and the membrane domain is stable for a long time. Although we did not fully understand the physiological significance of this contact, we suggested that it may be a novel cellular response to some kind of abnormal membrane structure and clarified some properties of the membrane domain itself.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質 生体膜 リン脂質 ステロール 膜ドメイン 出芽酵母

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は多様な脂質から成る脂質二重層で構成されている。本研究代表者はリン脂質のひとつホスファチジルセリン (PS) を合成できない出芽酵母の変異株 (PS 欠損株) において、膜タンパク質が分布できないという特異な性質を持つ細胞膜ドメインが高温培養下で発生することを見出し、この新規なドメインを void zone と呼称し解析を進めてきた (図1)。また、酵母のリソソーム様オルガネラである液胞が細胞内部から、細胞膜上に発生した void zone に接触する様子も捉えられており、液胞は細胞内分子の分解の場として機能することから、この液胞の接触が void zone のような異常な膜ドメインの積極的な解消・除去に寄与しているという仮説の着想に至った。

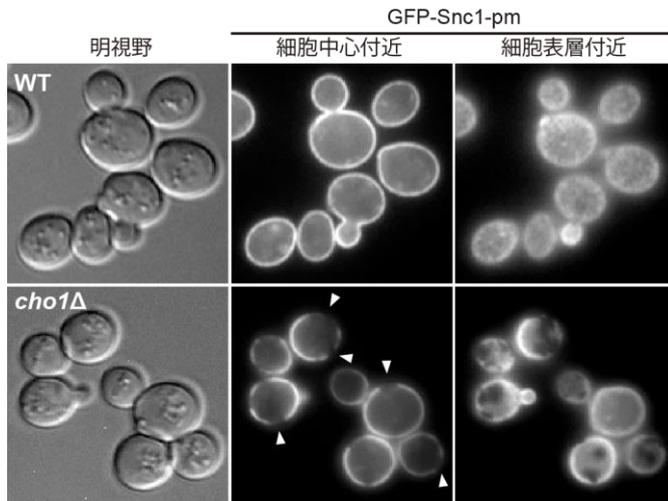


図1: PS 欠損株の細胞膜に発生する異常な膜領域 "void zone"

上段が野生株、下段が PS 欠損株で、どちらも GFP を融合した細胞膜局在型膜貫通タンパク質 (GFP-Snc1-pm) を発現している。このタンパク質は野生株では細胞膜上に均一な分布を示すのに対し、PS 欠損株では矢頭で示す領域 (void zone) への分布が阻害されており暗い領域として観察される。

この現象はこのタンパク質に限定したのではなく、ほぼ全ての膜貫通タンパク質に共通することが別の解析によって示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞膜上に発生した異常な性質を持つ膜ドメイン void zone が、液胞の接触によって積極的に解消・分解・除去されている可能性を検討すること、また void zone の基本的な性質や形成・消失に関わる因子を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

様々な出芽酵母の変異株 (遺伝子破壊・修飾) を作出し、蛍光顕微鏡観察やタイムラプスイメージングを主として行った。void zone の発生頻度の解析、void zone の時空間的挙動の解析、液胞の挙動の解析、void zone の形成に必要な遺伝子の探索などを行った。

### 4. 研究成果

〈研究の主な成果〉

本研究では出芽酵母の PS 欠損株において膜貫通タンパク質が正常に分布できない領域が細胞膜に温度依存的に発生することを見出し、この領域を void zone と呼称し様々な解析を行った。ここでは主な研究成果の一部を示す。

#### (1) void zone には非対称性が存在する

細胞膜における膜貫通型タンパク質は、そのほぼ全てが void zone から排除されていることが示唆された。そこで次に、膜貫通ドメインを持たずに、脂質修飾によって細胞膜に局在する膜表面性タンパク質の void zone に対する分布についての観察を行った。細胞質側から細胞膜内層にアンカーされる Ras2 と、細胞外に分泌された後に細胞膜外層にアンカーされる Gas1 について調べたところ、前者のような細胞膜内層にターゲティングされるタンパク質は膜貫通型タンパク質と同様に void zone から排除されて細胞膜に分布していたのに対し、GPI アンカータンパク質である Gas1 は void zone から排除されずに細胞膜にほぼ一様に分布していた (次ページ図2)。この結果は、細胞膜上に発生した void zone では、膜貫通型タンパク質や内層からアンカーする膜表面性タンパク質の分布が阻害される一方、外層からアンカーするタンパク質はその影響を受けないことを示唆している。

生細胞において void zone のような性質を持つ巨大な細胞膜ドメインが発生することは、これまでに報告されていない全く新規な現象である。更に人工膜における膜ドメイン研究においてもこうした性質を持つドメインは発見されておらず、脂質二重層で構成される膜全般に関する新しい知見を得ることができた。

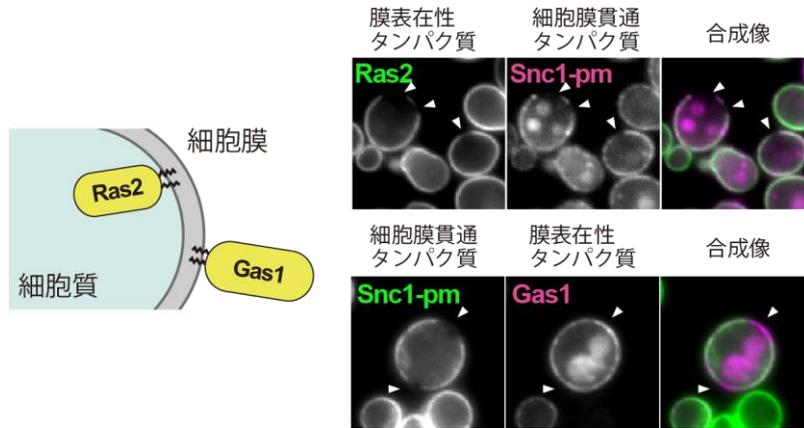


図 2 : void zone における膜表在性タンパク質の分布の非対称性

膜表在性タンパク質のうち、Ras2 などの細胞膜内層に局在するものは void zone から排除されているのに対し、GPI アンカータンパク質である Gas1 は void zone の影響を受けずに分布していた。

(2) void zone と液胞の接触は長時間持続する

void zone に対する液胞の接触動態を調べるため、細胞膜と液胞を同時に蛍光で観察できる系でタイムラプスイメージングなどを行い以下の知見を得ることができた。

- ① void zone と接触する液胞膜上においてもタンパク質分布の分離が起こっていることが示唆された。
- ② タイムラプスイメージングによって細胞膜から離れた場所にあった液胞が、void zone に向かって移動し、接触する過程を捉えることができた (図 3)。
- ③ タイムラプスイメージングによって、void zone に接触した液胞は void zone と共に長時間 (1 時間以上) 接触したままであることが分かった。
- ④ 細胞外 pH の違いが void zone と液胞との接触頻度に影響を与える可能性が示唆された。

void zone と液胞との接触動態の解析の結果、当初の予想に反して液胞による速やかな void zone の解消は認められなかった。60-90 分に渡るタイムラプスイメージングの結果、void zone が発生している間は一度接触した液胞が解離する様子が見られなかった。このことから、可能性の一つとして、液胞の接触はより長い時間をかけて void zone の解消に寄与していること、また別の可能性として、void zone が解消するまでの間に細胞膜を保護するために液胞が接触しているといった役割も考えられる。

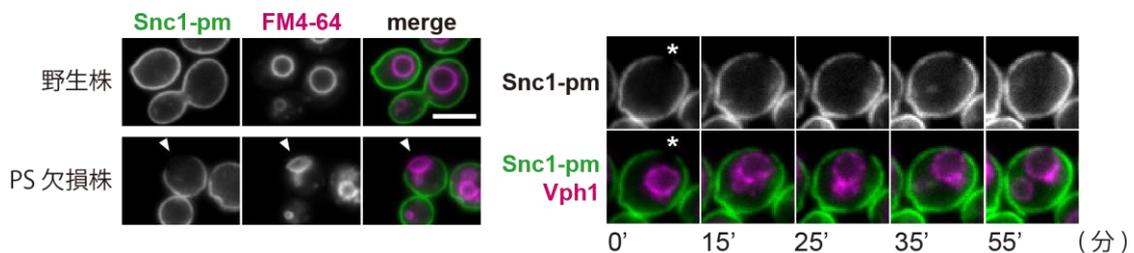


図 3 : void zone と液胞の接触動態

左図 : 脂溶性色素 FM4-64 で液胞膜を染色した様子。PS 欠損株に発生する void zone (矢頭) の約 40-50% において、液胞が接触した像が観察された。

右図 : 液胞に局在するタンパク質 Vph1 を液胞のマーカースとしてタイムラプスイメージングを行った。void zone (アスタリスク) は長時間安定して細胞膜上に発生しており、離れて存在していた液胞が時間と共に接触していく様子が観察された。

(3) void zone の形成はエネルギー依存的である。

上述したように、液胞の接触による void zone の積極的な解消は見られなかったが、ATP の枯渇や glucose の欠乏状態を誘導することによってそれまで形成されていた void zone が消失する現象が確認された。人工膜における膜ドメインとは異なり、生体膜における void zone はエネルギーに依存して形成・維持されることが示された。

〈得られた成果の国内外における位置づけとインパクト〉

本研究の対象とした異常な細胞膜ドメインである void zone は、本研究の研究代表者が初めて見出したものである。人工膜においては類似した性質の巨大な膜ドメインが報告されていたが、生細胞では短寿命かつナノスケールの膜ドメインしか観察されておらず、このことは人工膜研究と生体膜研究における大きなギャップの一つでもあった。また近年、異なるオルガネラ膜が接触する現象がメンブレンコンタクトサイトとして様々なオルガネラ間で報告されているが、本研究での void zone-液胞接触のように細胞膜とリソソーム様オルガネラとの接触はこれまでに知られておらず、更に野生株では見られず変異株においてのみ発生するといった点も類を見ない特徴である。

本課題では新規性の高い 2 つの現象を対象に解析を行い、様々な基礎的知見を得ることができた。研究期間中に得られた知見は原著論文として投稿、発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三岡哲生、田中一馬
2. 発表標題 出芽酵母のリン脂質PS欠損株に発生する新規細胞膜ドメイン"void zone"の解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三岡哲生、田中一馬
2. 発表標題 出芽酵母のリン脂質PS欠損株に発生する巨大膜ドメイン"void zone"の解析
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三岡哲生、田中一馬
2. 発表標題 出芽酵母のリン脂質PS欠損株に生じる巨大膜ドメイン"void zone"の解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三岡哲生、田中一馬
2. 発表標題 出芽酵母のリン脂質PS欠損株に発生する巨大膜ドメイン"void zone"の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuo Mioka, Kazuma Tanaka
2. 発表標題 Characterization of a huge membrane domain "void zone" generated in phosphatidylserine-deficient yeast cells
3. 学会等名 第14回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三岡哲生
2. 発表標題 出芽酵母のリン脂質PS欠損株に発生する新規細胞膜ドメイン“void zone”の解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----