

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06536

研究課題名（和文）ゴルジ体膜における脂質非対称性の生理的意義の解明

研究課題名（英文）Physiological significance of phospholipid asymmetry in Golgi membranes

研究代表者

田中 一馬（Tanaka, Kazuma）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：60188290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体膜は脂質二重層からなるが、脂質分子種は二重層間で非対称に分布しており、これはフリッパーゼと呼ばれる脂質を二重層間輸送するタンパク質によって形成される。本研究では、細胞内小器官の一つであるゴルジ体のフリッパーゼの機能について解析を進め、フリッパーゼが形成する脂質環境がゴルジ体のイオンホメオスタシスを始め様々な機能を制御することによりゴルジ体からの小胞輸送に働いていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞機能の異常はがんを始め様々な疾患の原因となることから、その分子機構の解明は重要な課題である。生体膜は脂質二重層によって形成され、脂質分子の動態は細胞膜や細胞内小器官の機能を制御すると考えられるが、未解明な点が多い。ゴルジ体は生体膜で囲まれた細胞内小器官の一つであり、タンパク質の細胞内輸送等に重要な役割を果たす。本研究は、フリッパーゼと呼ばれる脂質の動態を制御するタンパク質のうち、ゴルジ体に存在するものに焦点をあて、その機能について新しい知見を得たものである。

研究成果の概要（英文）：Phospholipids are asymmetrically distributed across bilayer membranes, and this phospholipid asymmetry is generated by phospholipid flippases. In this research, we analyzed functions of a flippase localized at Golgi membranes in budding yeast. Our results suggest that the flippase-regulated membrane environment is crucial for multiple Golgi functions, including ion homeostasis in Golgi, and that these flippase functions are essential for vesicle transport from the Golgi.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：脂質非対称性 フリッパーゼ ゴルジ体 小胞輸送 酵母

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜の脂質二重層では脂質の分子種が非対称に分布することが知られており、脂質の非対称性と呼ばれているが、その生理的な意義については明らかにすべきことが多く残されている。この脂質非対称性を形成するタンパク質として、フリッパーゼ (4型 P-type ATPase) が知られている。私達はフリッパーゼの機能解明を中心として脂質非対称性の生理的意義の解明に取り組んで来た。出芽酵母では5種類のフリッパーゼが存在するが、そのうち Neo1 はゴルジ体に局在してゴルジ体膜の脂質非対称性を制御していると考えられている。ゴルジ体やエンドソームに局在するフリッパーゼの欠損変異株では輸送小胞の形成が損なわれることが知られているが、フリッパーゼがどのように働いているのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、Neo1 フリッパーゼとその関連遺伝子の解析を中心に、ゴルジ体膜における脂質非対称性の生理的意義を解明する。Neo1 遺伝子は生育に必須であるが、私達は neo1 変異株の致死性を抑圧する変異として cfs1 変異を得ている。Cfs1 タンパク質は PQ-loop family に属する7回膜貫通タンパク質で、Neo1 と同様にゴルジ体に局在するがその機能は不明である。neo1 cfs1 二重変異株は野生株と同様に増殖し、ゴルジ体からの小胞輸送も正常に生じるが、Neo1 及び Cfs1 遺伝子が酵母にとって不要な遺伝子であるとは考えづらいため、neo1 cfs1 二重変異株ではゴルジ体膜における脂質非対称性の制御機構に何らかの異常が生じている可能性が考えられる。neo1 cfs1 変異株の解析を更に進めることにより、neo1 cfs1 変異株に生じているゴルジ体の機能異常を明らかにする。

3. 研究の方法

豊富な遺伝学的解析手法を用いることが出来る出芽酵母を用いて、Neo1、Cfs1 と遺伝学的に相互作用する遺伝子を単離して、それらの変異株の表現型について、細胞増殖やゴルジ体の機能を中心に細胞生物学的に解析する。

4. 研究成果

上述したように、neo1 変異は増殖に必須であり、cfs1 変異はその致死性を抑圧する (図1上図: 本研究では Neo1 の発現は YPGA 培地で抑制されるように制御されている)。ゴルジ体からの小胞輸送は細胞膜タンパク質である Snc1-pm の局在観察により検討した。neo1 変異株では Snc1-pm は細胞内のゴルジ体に蓄積するが、これは cfs1 変異により抑圧される (図1下図)。本研究の開始当初、私達は neo1 cfs1 変異と合成致死となる遺伝子変異をスクリーニングして erd1 変異を得ていた。図1に示すように、neo1 cfs1 erd1 変異株は致死性を示し、Snc1-pm も再びゴルジ体に蓄積するようになる。Erd1 は他のグループにより、ゴルジ体内腔から細胞質へとリン酸 (Pi) を輸送するタンパク質として報告されている (Snyder et al., 2017)。従って、neo1 cfs1 変異株ではゴルジ体のリン酸イオンのホメオスタシス制御に何らかの異常が生じているものと考えられた。

neo1 cfs1 erd1 変異株における小胞輸送異常が何に起因するのかを解析したところ、本変異株ではゴルジ体の膜上に存在して輸送小胞の形成に重要な役割を果たすフォスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) が存在していないことが明らかとなった (図2)。Osh2p-PH は PI4P を検出するタンパク質であるが、野生株では主としてゴルジ体に局在する。ところが neo1 変異株では Osh2p-PH はゴルジ体には局在せず、細胞膜への局在が観察された。この局在異常は cfs1 変異により抑圧されるが、neo1 cfs1 erd1 変異株では Osh2p-PH はゴルジ体に局在しなかった。PI4P はフォスファチジルイノシトール 4-キナーゼである Pik1 により産生される。Pik1 の局在を調べたところ、neo1 変異株、neo1 cfs1 erd1 変異株共に Pik1 は野生株と同様にゴルジ体に局在した (図2)。これらの結果から neo1 変異株や neo1 cfs1 erd1 変異株では Pik1 の活性が低下していることが示唆された。neo1 cfs1 erd1 変異株におけるゴルジ体膜上での PI4P の産生欠損は本変異株でのゴルジ体からの小胞輸送異常を説明できるものと考えられる。

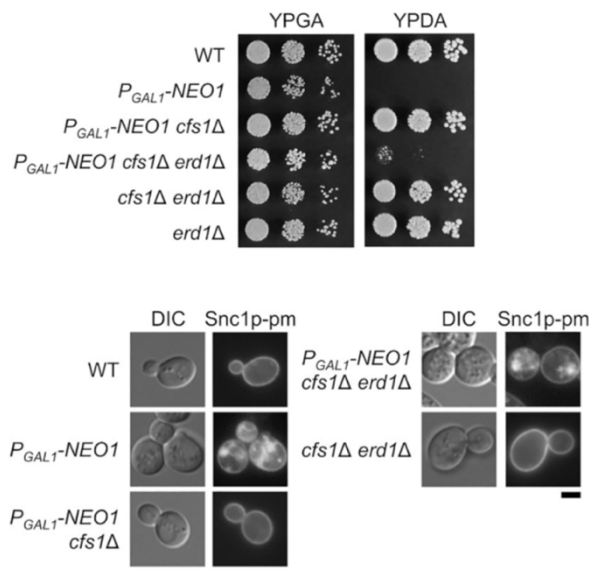


図1 neo1Δ cfs1Δ erd1Δ 株における増殖及び小胞輸送の欠損

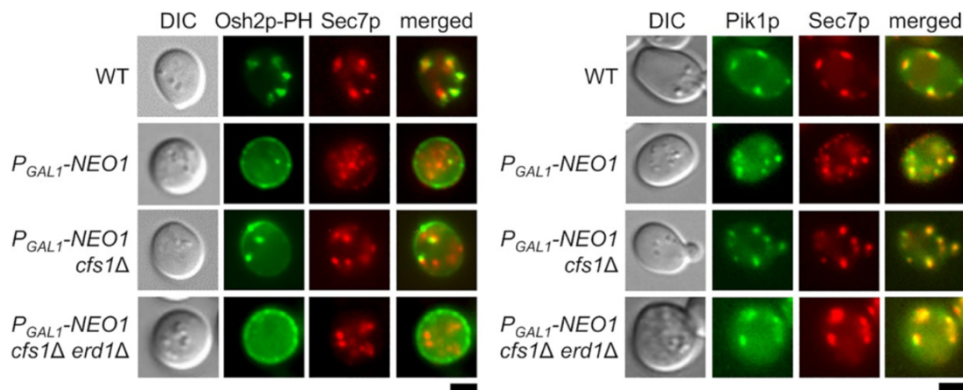


図2 *neo1Δ cfs1Δ erd1Δ*株における phosphatidyl inositol 4-phosphate (PI4P)の局在

neo1 cfs1 変異株ではゴルジ体においてリン酸イオンのホメオスタシス異常が生じていることが示唆されたことから、他のイオンについても検討した。*neo1 cfs1* 変異株は、1M NaCl といった高塩濃度ストレスに対して増殖感受性を示し、*Sncl1-pm* をゴルジ体に蓄積した(図3:ゴルジ体は *Sec7* ゴルジ体マーカーにより示されている)。興味深いことに、*neo1 cfs1* 変異株のこの高NaClに対する感受性は、培地へのKClの添加によって抑圧されることが明らかとなった(図4、A:増殖欠損の抑圧、B:小胞輸送欠損の抑圧)。これらの結果は、*neo1 cfs1* 変異株では、ゴルジ体の機能が、リン酸イオンやナトリウム/カリウムイオンのバランスの乱れに対して脆弱になっていることを示している。

フリッパーゼの変異株で見られるゴルジ体からの輸送小胞の形成欠損に対して、フリッパーゼによる脂質輸送が直接的に輸送小胞の形成に関わるとのモデルが提唱されてきたが、証明はされていない。これに対して、私達の実験結果は、フリッパーゼによって制御されるゴルジ体膜の脂質非対称性の制御が、PI4Pの産生やイオンホメオスタシスといったゴルジ体の諸機能を制御しており、フリッパーゼはこれらの制御を介して間接的に輸送小胞の形成に関わっている可能性を示唆している。細胞膜とは異なり、ゴルジ体を含む内膜では脂質非対称性における脂質分布を観察する技法は大きく限られている。加えて、ゴルジ体からの輸送小胞の形成は試験管内で再構成されておらず、フリッパーゼの関与の検討は難しい。ゴルジ体におけるフリッパーゼの脂質輸送がゴルジ体のどのような機能を制御するのか、具体的に明らかにされるべく今後も研究が続けられる必要がある。

<引用文献>

Snyder NA, et al., G3 (Bethesda), 7:3913-3924, 2017.

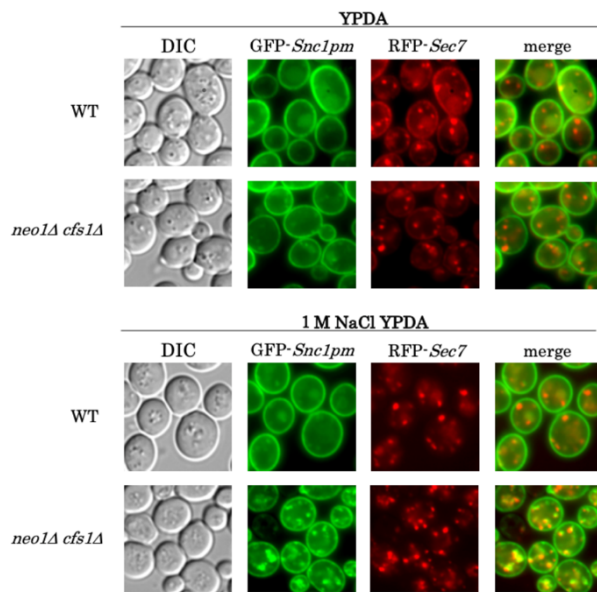


図3 *neo1Δ cfs1Δ*株における 1M NaClによる小胞輸送の欠損

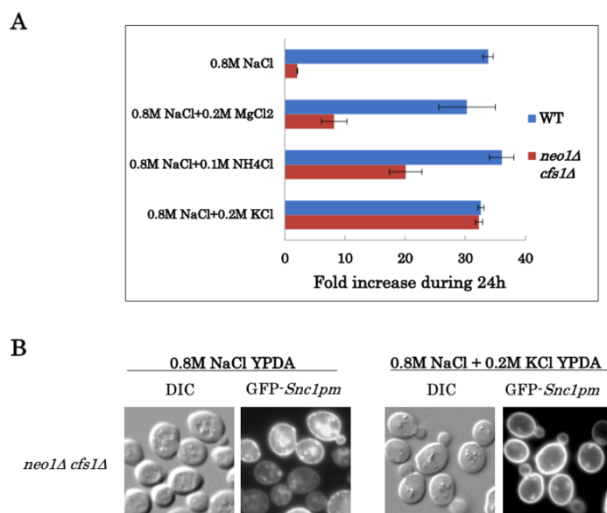


図4 0.2M KClによる0.8M NaClが引き起こす増殖及び小胞輸送欠損の抑圧

ゴルジ体におけるフリッパーゼの脂質輸送がゴルジ体のどのような機能を制御するのか、具体的に明らかにされるべく今後も研究が続けられる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyasaka Mamoru, Mioka Tetsuo, Kishimoto Takuma, Itoh Eriko, Tanaka Kazuma	4. 巻 15
2. 論文標題 A complex genetic interaction implicates that phospholipid asymmetry and phosphate homeostasis regulate Golgi functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0236520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0236520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮坂 衛、三岡 哲生、田中 一馬
2. 発表標題 出芽酵母Neo1フリッパーゼとその関連遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
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
研究分担者	三岡 哲生 (Mioka Tetsuo) (60754538)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教 (10101)	削除：2021年2月26日
研究分担者	岸本 拓磨 (Kishimoto Takuma) (70585158)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任講師 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------