

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06561

研究課題名(和文)細胞膜脂質非対称の感知およびシグナル出力機構の解明

研究課題名(英文)Sensing mechanism and signal output of plasma membrane lipid asymmetry

研究代表者

小原 圭介(Obara, Keisuke)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：30419858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂質非対称センサーRim21が細胞膜の脂質非対称変化を感知して、シグナル伝達を発火させる仕組みを研究した。その結果、Rim21のC末端細胞質領域に存在するセンサーモチーフおよびその周辺の荷電アミノ酸残基が、Rim21Cと細胞膜の相互作用に重要な役割を担っていることを強く示唆した。Rim21による脂質非対称モニタリングの分子機構に迫る成果である。一方、細胞外のpH上昇、高塩濃度、高浸透圧などの細胞外物理化学ストレスが、細胞膜の脂質非対称変化をもたらす、Rim21に感知される可能性を示した。物理化学変数のセンサーという細胞膜の役割として新たな側面を浮き彫りにする発見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜脂質非対称の調節は、細胞の生存に必須な基本的な性質であるにも関わらず、その状態がどのようにモニターされているかは未知のままである。本研究は、その様な細胞の基本機能の一端を明らかにする点で重要である。また、Rim21の様な多重膜貫通タンパク質が可溶性領域を触角の様に用いて膜表面の状態をモニターする例は知られておらず、本研究は「タンパク質-生体膜相互作用」の新たなパラダイムとなり得る。細胞膜が、細胞外物理化学変数の変化に対して巨大なセンサーとして働き、脂質非対称などの状態変化を通して各種センサータンパク質群に提示することを示唆し、細胞膜の役割そのものに新たな一面が加わる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated into the mechanism of lipid asymmetry sensing by the sensor protein Rim21 and how activated Rim21 evokes signal transduction pathway. As a result, we suggested that some charged amino acid residues within and near the "sensor motif" which is located in the C-terminal cytosolic region of Rim21 (Rim21C) play pivotal roles in interaction between the plasma membrane inner leaflet and Rim21C. This is a great progress that may open the door for elucidation of molecular mechanism underlying lipid asymmetry sensing.

We also found that alterations in some physicochemical variants outside the cell, e.g. pH and salt concentration, may affect the state of lipid asymmetry. Of them at least pH elevation and high salt stress, was found to be sensed by Rim21 through alterations in lipid asymmetry. This finding deserves attention in that it sheds light on a novel aspect of the plasma membrane as a sensor structure for physicochemical variants.

研究分野：Cell Biology

キーワード：Plasma membrane lipid lipid asymmetry yeast

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 真核生物の細胞膜脂質二重層では、その内外層で脂質組成が大きく異なる。その様な「脂質非対称」を維持し、適切に調節することは細胞の生存に必須である。私は、以前に真核生物のモデルである出芽酵母を用いて、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。
- (2) 脂質非対称センサーRim21 が脂質非対称の変化や乱れを感知する分子機構は不明のままであった。特に、膜の状態を Rim21 がモニターするためには Rim21 と細胞膜との相互作用が重要だと予想されるが、その実態はほとんど明らかになっていなかった。
- (3) 脂質非対称の変化を感知して活性化した Rim21 が次のタンパク質にその情報を出力し、シグナル伝達を開始する仕組みは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、Rim21 が脂質非対称変化を感知する分子機構の解明を目指した。特に、細胞膜と Rim21 相互作用を主眼に置いた。
- (2) 脂質非対称変化を感知して活性化した Rim21 が、次のタンパク質群にシグナルを出力してシグナル伝達を開始する仕組みの解明も目指した。このシグナル伝達では、ユビキチンリガーゼである Rsp5 が必須であることが知られている。そこで、ユビキチン化反応を足掛かりとして、Rim21 によるシグナル出力機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

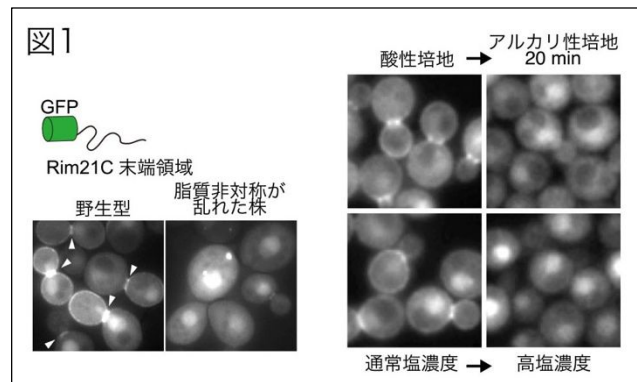
- (1) Rim21 と細胞膜あるいは生体膜を構成する脂質分子との相互作用を *in vivo*, *in vitro* の両面から調べた。*In vivo* では、Rim21 内の脂質非対称センサーモチーフ(代表者が以前に同定)を含む C 末端細胞質領域(Rim21C)を GFP 融合した融合した GFP-Rim21C の挙動を蛍光顕微鏡下で追跡した。GFP-Rim21C は、通常は主に細胞膜に結合しているが、脂質非対称が乱れている変異体(Rim21 が活性化する状態)では細胞膜から解離して細胞質中に拡散することが知られている。細胞を様々な環境で培養したり、Rim21C 部分に点変異を導入したりすることで、この挙動に影響を与えるような状況を調べた。
- (2) *In vitro* では、Rim21 の組換えタンパク質を作製し、lipid overlay assay により脂質との相互作用を調べた。
- (3) Rsp5 のターゲットにしばしば存在する PxxY モチーフに注目した。Rim21 には PxxY モチーフに類似した配列があるためこの箇所の変異解析を行った。シグナル伝達の評価はシグナル伝達の最終段階で起こる転写因子 Rim101 の切断、Rim20 を基盤とするシグナル複合体の形成などを指標にして行った。

4. 研究成果

- (1) GFP-Rim21C の挙動を追跡したところ、これまでの知見どおりに脂質非対称が乱れた変異体で細胞膜から解離した(図 1)。また、細胞膜脂質の合成や代謝に関わる様々な酵素のコード遺伝子を欠損したところ(欠損できない必須遺伝子は温度感受性変異体やデグロン株を入手・作製)ホスファチジルセリン合成に関わる Cho1 のコード遺伝子を欠損した場合に GFP-Rim21C が細胞膜から解離した。また、GFP-Rim21C の変異解析を行ったところ、センサーモチーフ近傍の荷電アミノ酸残基や保存されたトリプトファン残基が細胞膜との結合に大きな影響を与えることが明らかになった。
- (2) Rim21C の組換えタンパク質について、コムギ胚芽抽出液を用いた *in vitro* 転写・翻訳システムにより合成・精製できることを見出した。収量はそれほど多くはなかったが、これまで大腸菌や昆虫細胞を用いた発現系では、組換えタンパク質がほとんど得られなかったことを考えると大きな一歩である。
- (3) 精製した Rim21C 組換えタンパク質を用いた lipid overlay assay により、Rim21C が負電荷を有する幾つかの脂質[ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、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リン酸など]に結合することが明らかになった。これらの脂質は、そのほとんどが内層に存在するため、実際の細胞内でも Rim21C 部分と結合可能なトポロジー関係にある。また、負電荷は有していないが、そのほとんどが内層に存在し非対称分布を示す典型例として挙げられるホスファチジルエタノールアミンを Rim21C が結合した脂質に混在させることにより、その結合力が強まることを見出した。ホ

スファチジルエタノールアミンのアミノ基が有するプロトン受容能により、負電荷を有する脂質の平衡がよりイオン化する方向に傾いたと考えられる。ホスファチジルエタノールアミンの非対称分布の新たな生理的意義を見出した可能性がある。

- (4) 細胞を様々な環境で培養して GFP-Rim21C の挙動を追跡したところ、外界のアルカリ化、塩ストレス、高浸透圧ストレス下で細胞膜から解離した(図1)。これらのストレスが細胞膜の脂質非対称に影響を与え、Rim21C 部分によって感知されている可能性が浮上した。そこで、これらのストレスに対する耐性を野生型と *RIM21* 欠損株で比較したところ、*RIM21* 欠損株は外界のアルカリ条件および塩ストレスに高感受性を示した。これら



のことから、外界のアルカリ化や塩ストレスは、脂質非対称に影響を与えることで Rim21 によって間接的に感知され、適応反応が引き起こされている可能性が示された。細胞膜そのものが外界の物理化学的ストレスに対するセンサーとなり、その状態変化として Rim21 などのセンサータンパク質に提示する、という細胞膜の新たな概念を生み出す可能性を秘めた大きな結果である。一方、*RIM21* 欠損株は高浸透圧ストレスに対しては感受性を示さなかった。高浸透圧ストレスは脂質非対称に影響を与えるものの、細胞膜のその他の状態変化(流動性や張力など)を通して別のタンパク質を通して感知されて適応反応が惹起されるのかも知れない。

- (5) Rim21 が発するシグナル伝達に必要なユビキチンリガーゼ Rsp5 は、ユビキチン化のターゲット分子の PxxY モチーフを認識して結合することが知られている。Rim21 には PxxY モチーフに類した配列が一箇所存在するためその部分に変異を導入した。すると Rim21 のシグナル伝達がほぼ完全に停止した。この PxxY 類似のモチーフが Rim21 のシグナル伝達に必要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Obara K, Higuchi M, Ogura Y, Nishimura K, Kamura T	4. 巻 25
2. 論文標題 Rapid turnover of transcription factor Rim101 highlights a flexible adaptation mechanism against environmental stress in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 651-662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12801	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, Kamura T	4. 巻 67
2. 論文標題 The Rim101 pathway mediates adaptation to external alkalization and altered lipid asymmetry: hypothesis describing the detection of distinct stresses by the Rim21 sensor protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 213-217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00294-020-01129-0	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 小原 圭介	4. 巻 5
2. 論文標題 細胞膜脂質非対称の感知と細胞応答	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 43-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小原圭介
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称センシング機構の解明とその応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小原 圭介、樋口 舞、嘉村 巧
2. 発表標題 転写因子Rim101の迅速な分解からみたストレス応答経路同士の相互作用
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小原 圭介
2. 発表標題 脂質非対称性の感知機構から見えてきた細胞膜の新たな役割
3. 学会等名 第72回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Obara K, Yasuda A and 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

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
2. 発表標題 脂質非対称性の感知機構から見てきた細胞膜の新たな役割
3. 学会等名 第72回日本生物工学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小原圭介、安田有那、嘉村巧
2. 発表標題 細胞膜脂質非対称と細胞外物理化学変数の関係
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>転写因子Rim101の迅速な分解によって浮き彫りになった出芽酵母の柔軟なストレス適応機構 https://www.bio.nagoya-u.ac.jp/paper/2020-36/04.html</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------