

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570174

研究課題名（和文）細胞の極性形成における膜リン脂質の役割

研究課題名（英文）The role of membrane phospholipids in establishment of cell polarity

研究代表者

鎌田 このみ (KAMADA KONOMI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：80312354

研究成果の概要（和文）：細胞を構成する膜はリン脂質の二重層から成っているが、二つの層ではリン脂質の組成が異なる。モデル生物として出芽酵母を用い、リン脂質層間移行の仕組み及びその役割を解析した。細胞膜におけるリン脂質層間移行に関連する新たな因子や、膜の流動性に関する膜タンパク質を同定することに成功した。また、細胞内小器官エンドソームでリン脂質の層間移行を担うフリッパーゼ Drs2 の機能と小胞形成との関係を Rcy1 が仲介している可能性を示すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：In most eukaryotic cells, cell membranes are composed of two layers that have different composition of phospholipids. We have investigated molecular mechanisms and roles of translocation of phospholipids between two layers in yeast. We identified some novel factors involved in translocation of phospholipids in the plasma membrane and a membrane protein implicated in fluidity of the plasma membrane. Moreover, an F-box protein Rcy1 is suggested to function as a mediator between vesicle formation and translocation of phospholipids catalyzed by Drs2 in endosomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞・脂質・極性形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜リン脂質の非対称性の制御

細胞を構成する膜は脂質二重層から成るが、二つの層ではリン脂質の組成が異なること（膜リン脂質の非対称性）が知られていた。一般に、細胞膜では外層にホスファチジルコリン(PC)とスフィンゴミエリン(SM)が、内層にはホスファチジルセリン(PS)とホスファチ

ジルエタノールアミン(PE)が多い。リン脂質の非対称性は、全ての真核細胞の細胞膜で共通に観察されており、また、各オルガネラ膜もそれぞれ固有のリン脂質の非対称性を持つと考えられていた。この非対称性は、非細胞質側から細胞質側層への動き（フリップ）を触媒するフリッパーゼ及び逆の動き（フロップ）を触媒するフロッパーゼにより形成・

維持される。フリッパーゼは触媒サブユニットが type4 P 型 ATPase であることが示されていた。

真核単細胞のモデル生物である出芽酵母には、type4 P型ATPaseとして、Neo1, Drs2, Dnf1, Dnf2, Dnf3の5つが存在する。これらの中で主に細胞膜に局在するDnf1とDnf2が、細胞膜のリン脂質のフリップに参与し (Pomorski *et al.* 2003)、主に後期ゴルジ体やエンドソームに局在するDrs2がリン脂質のトランスロケースとして機能することが、生化学的に明らかにされていた (Natarajan *et al.*, 2004; Alder-Baerens *et al.*, 2006)。このように、出芽酵母において、フリッパーゼの実体やそれによるリン脂質の非対称性について、明らかになりつつあった。私たちは、出芽酵母の細胞極性に関わる因子として、膜タンパク質Cdc50を同定し (Misu *et al.* 2003)、Cdc50とそのホモログLem3, Crf1は、それぞれDrs2, Dnf1/2, Dnf3の非触媒サブユニットとして機能することを明らかにしていた (Saito *et al.* 2004)。また、Cdc50-Drs2からなるフリッパーゼは、細胞内小胞輸送の過程の一つ、endocytic recyclingにおいて重要な役割を果たしていること (Furuta *et al.* 2007)、また、主に細胞膜に局在するLem3-Dnf1/2が、極性成長の制御に参与していることを明らかにしていた (Saito *et al.* 2007)。

(2) 細胞の極性形成

細胞の極性形成は、細胞が固有の機能を果たすため、また細胞が生存していくために不可欠である。極性形成に参与する因子の多くは真核生物でよく保存されており、そのメカニズムは普遍的に保たれていると考えられるが、その詳細は不明な点が多く残っていた。

出芽酵母の極性形成過程である出芽のメカニズムについては、これまでに多くの研究がなされており、参与する因子も多数わかってきていた。広く真核生物に保存され、極性形成の情報伝達のキープレーヤーとして中心的な役割を果たすことがわかっていた small GTPase Cdc42は、正の制御因子(GEF)と負の制御因子(GAP)により調節される。私たちは、Lem3-Dnf1/2によるリン脂質 (PE と PS) のフリップと Cdc42の局在とが密接に関連していること、さらに、PS と PE が *in vitro* で GAPを活性化することを示し、PE や PS が GAP

の活性化を通して Cdc42を不活性化し局在を変化させ、極性成長方向を調節するというモデルを提唱していた (Saito *et al.* 2007)。

私たちは上述したように、出芽酵母における膜リン脂質の動態を制御するフリッパーゼが Cdc50ファミリーと type4 P 型 ATPase の複合体からなることを明らかにしてきた。従って、以後の大きな課題は、フリッパーゼの働きが細胞機能の中で具体的にどのような事象に関わっているのかを解明することと考えていた。

2. 研究の目的

フリッパーゼによる膜リン脂質の層間移行が、細胞の極性形成にどのように関わっているのかをさらに詳細に解明することを目的とした。私たちのグループ及び他のグループによる研究から、通常細胞膜内層に偏って存在する PE 及び PS が、出芽時には (すなわち極性成長する部位では) 細胞膜外層に露出していることがわかっていた (Iwamoto *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2007)。しかしながら、PE 及び PS がどのようにして外層に移行 (フロップ) するのかについては、全くわかっていない。そこで、このフロップに参与する因子を同定し、また、細胞膜における PE 及び PS の内層への偏在が初めにどのように形成されるのかも明らかにしようと考えた。

また、細胞の極性成長時には、細胞膜や細胞壁を構成する成分およびその合成酵素などが成長部位に輸送されることが必要である。輸送には、小胞輸送が参与しており、エキソサイトーシスおよびエンドサイトーシス、さらにエンドサイトーシスされたものが再び細胞膜に運ばれるためのリサイクリングが活発に行われていることが知られている。これまでに、エンドサイトーシス-リサイクリング経路において Cdc50-Drs2 フリッパーゼが機能していることを明らかにしているが (Furuta *et al.* 2007)、その詳細を分子レベルで明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) PE のフロップあるいはフリップに参与する因子の探索

細胞膜フリッパーゼの調節サブユニット Lem3 を欠失した変異株 (*lem3Δ*) は基質である PE が細胞膜外層に露出した状態が継続するため、PE に特異的に結合するペプチド

Duramycin に感受性になる。そこで、*lem3Δ* 株のゲノム上にランダムに変異を導入した。Duramycin に対する感受性が緩和される株を探索し、同定された遺伝子について解析を行った。

(2) PS のフロップあるいはフリップに関与する因子の探索

① *lem3Δ* 変異株の Papuamide B (Pap B) 感受性を緩和する変異の探索

② *lem3Δ* 変異株の Pap B 感受性を過剰発現で緩和する遺伝子探索

細胞膜フリッパーゼの調節サブユニット Lem3 を欠失した変異株 (*lem3Δ*) は基質である PS が細胞膜外層に露出した状態が継続するため、PS に特異的に結合する薬剤 Papuamide B (Pap B) に感受性になる。そこで、*lem3Δ* 株に①ゲノム上にランダムに変異を導入、②酵母ゲノムの過剰発現ライブラリーを導入し、それぞれ Pap B に対する感受性が緩和される株を探索し、同定された遺伝子について解析を行った。

(3) PS に特異的に結合するプローブ LactC2 を用いた細胞内 PS 局在の解析

Lactadherin の C2 ドメイン (Lact-C2) は、PS に特異的に結合することが知られており、GFP を融合した GFP-LactC2 を細胞内で発現させると、細胞質に面した層に PS が共存している膜が標識される。膜輸送に関わる様々な遺伝子の変異株内で GFP-LactC2 を発現させることにより、細胞内小胞輸送における PS の動態を解析した。

(4) エンドソームにおけるフリッパーゼ機能の分子レベルでの解析

エンドサイトーシス-リサイクリング経路において、初期エンドソームで機能する Cdc50-Drs2 フリッパーゼは、同経路に関与することが知られている F-box タンパク質 Rcy1 と相互作用することがわかっていた (Furuta *et al.* 2007)。そこで、Rcy1 と Cdc50-Drs2 の関係を、遺伝学的、および細胞生物学的手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) PE のフロップあるいはフリップに関与する因子の同定と解析

lem3Δ 変異株のゲノム DNA にタグをつけた

マーカーをランダムに挿入することで変異を導入し、生じた変異により Duramycin 感受性を緩和した遺伝子を探索した。*lem3Δ* 変異により外層に過度に露出した PE 量が減少する変異が同定される、すなわち PE の外層への移行に関与する遺伝子 (フロッパーゼやその正の制御因子など) が同定されることが期待された。今回の探索では、*SOG2*、*MOB2*、*KIC1* という、細胞極性形成及び細胞質分裂に関与していることが知られている機能遺伝子群、RAM ネットワークに属する遺伝子が重複して得られた。そのうちの一つである *sog2-1* 変異について詳細な解析を行った。PE に特異的に結合するプローブを用いた顕微鏡観察から、*lem3Δ* 変異で増加する外層に露出する PE は、*sog2-1* 変異により減少すること、また、*lem3Δ* 細胞で見られる過剰な極性化も緩和されることがわかった。これらのことから、RAM ネットワークが細胞膜における PE の外層への移行に関わっていることが示唆された。

一方、ABC トランスポーターが PE フロップを触媒すると考えられているが、出芽酵母では ABC トランスポーターの Pdr5、Yor1、Snq2 がフロップ活性を持つことが示唆されていた。*lem3Δ* 変異にこれら 3 つの因子の変異を導入すると、Duramycin 感受性が部分的に緩和され、さらに細胞膜上に存在する残りの 5 つの ABC トランスポーターの変異も合わせて導入すると、Duramycin 感受性はより強く緩和された。このことから、これらの ABC トランスポーターが PE のフロップにおいて重複した機能を持つことを明らかにした。*sog2-1* 変異をこれらの ABC トランスポーターの変異と合わせて *lem3Δ* 細胞に導入すると、Duramycin 感受性を相乗的に強く抑圧したことから、Sog2 は ABC トランスポーターとは別の機構を介して PE のフロップに関わっていることを示唆する結果を得た。

(2) PS のフロップあるいはフリップに関与する因子の同定と解析

① *lem3Δ* 変異株の Pap B 感受性を緩和する変異の探索

lem3Δ 変異株のゲノム DNA にタグをつけたマーカーをランダムに挿入することで変異を導入し、生じた変異により Pap B 感受性を緩和した遺伝子を探索した。*lem3Δ* 変異により外層に過度に露出した PE 量が減少する変異が同定される、すなわち PE の外層への移

行に関与する遺伝子（フロッパーゼやその正の制御因子など）が同定されることが期待された。今回の探索では、Duramycin 耐性を緩和する変異を同定したときに得られた RAM ネットワークに属する遺伝子のうちの *SOG2*、*MOB2* に加え、*HYM1* も取得された。これらのことから、RAM ネットワークが細胞膜において、PE に加え、PS の外層への移行にも関わっていることが示唆された。

ABC トランスポーターの変異についても、*lem3Δ* 変異の Pap B 感受性を緩和できるか調べてみたところ。細胞膜上に存在する 8 つの ABC トランスポーターすべての変異を導入しても、Pap B に対する感受性はほとんど緩和されなかった。このことから、ABC トランスポーターは PS のフロップにはほとんど関与していない可能性が示唆された。

② *lem3Δ* 変異株の Pap B 感受性を過剰発現で緩和する遺伝子探索と解析

lem3Δ 変異株の Pap B 感受性を過剰発現で緩和する遺伝子の探索を行い、6 回膜貫通領域を持ち、細胞膜に局在するタンパク質 Sfk1 をコードする *SFK1* 遺伝子を同定した。Sfk1 の機能について、その欠失変異株 *sfk1Δ* などを用いて解析を行い、以下のことを明らかにした。1) *sfk1Δ* 株では、リン脂質アナログ NBD-リン脂質の細胞膜でのフリッパーゼ活性が野生型株より上昇しており、またこのフリッパーゼ活性は ATP 非依存的な活性を含んでいた。2) *lem3Δ* 変異により生じる過剰に極性化した形態異常は、*SFK1* 遺伝子の過剰発現でも、*sfk1Δ* 変異のどちらによっても抑圧された。3) *lem3Δ* 変異株で見られる、PE の芽の先端部での外層への蓄積は、*SFK1* 遺伝子の過剰発現により消失し、*sfk1Δ* 変異により、芽の先端部のみでなく、細胞全体で観察されるようになった。4) *sfk1Δ* 変異は、*lem3Δ* 変異株の種々の薬剤の生育許容濃度を著しく低下させた（より感受性にした）。5) *sfk1Δ lem3Δ* 二重変異株は、野生型株に比べ細胞膜の流動性が上昇していた。これらのことから、Sfk1 は、細胞膜においてフリッパーゼと関連して機能し、膜の性質変化（流動性や透過性）を制御する因子である可能性が示唆された（図 1）。これらの知見は、リン脂質の層間輸送が膜の物性に関与するというを示唆しており、膜の物性と極性形成についての関わりを今後さらに明らかにする手がかりとなると期待される。

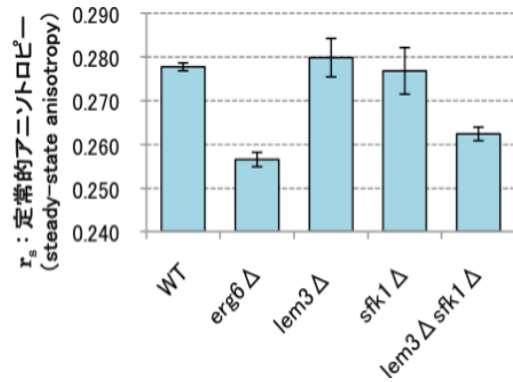


図 1. それぞれの細胞の細胞膜を TMA-DPH でラベルし、定常的アノトロピーを測定した。数値が小さいほど膜内での脂質の揺らぎ（膜の流動性）が大きいと考えられる。WT:野生型 *erg6Δ*:エルゴステロール合成に異常を示す変異株であり、膜の流動性が高まっていることが知られている。

(3)PS に特異的に結合するプローブ LactC2 を用いた細胞内 PS 局在の解析

PS に結合する蛍光プローブ GFP-LactC2 を野生型細胞内で発現させると、ほぼ細胞膜のみにシグナルが観察される。このことは、細胞膜においては、細胞質側層に PS が偏って局在するというこれまでの生化学的実験による報告と一致している。PS は ER で合成された後通常の膜輸送経路により細胞膜へ運ばれると考えられるが、その通過点である ER 膜やゴルジ体膜は GFP-LactC2 により染色されない。そこで、PS がどのようにして細胞膜の細胞質側層へ移行するのかを調べる目的で、ER-ゴルジ体間、あるいはゴルジ体-細胞膜間の輸送に欠損をもつ種々の変異株を用いて調べた。ゴルジ体から細胞膜への分泌小胞は合成されるが、細胞膜への融合が阻害される *sec6* 温度感受性変異株 (*sec6-ts*) では、高温条件下で輸送小胞が細胞内に蓄積する。*sec6-ts* 株で GFP-LactC2 を発現させると、蓄積した輸送小胞が GFP-LactC2 により染色された（図 2）。このことから、ゴルジ体では非細胞質側層に存在した PS が、輸送小胞形成時、あるいは輸送小胞上で細胞質側層に移行することが示唆された。現在、この移行にフリッパーゼがどのように関与しているのかを解析している。PS の層間移行が小胞輸送における役割を明らかにできると期待される。

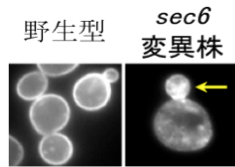


図2. 制限温度 37 度における GFP-LactC2

(4) エンドソームにおけるフリッパーゼ機能の分子レベルでの解析

① Cdc50 のフリッパーゼ複合体における役割

type4 P 型 ATPase Drs2 と結合する Cdc50 は、Drs2 のゴルジ体及びエンドソームへの局在に必要であることがわかっていたが、Cdc50-Drs2 複合体の局在は正常であるが、機能を欠損している Cdc50 変異体を探索し、解析することにより、フリッパーゼ活性にも必要であることを示した (Takahashi *et al.*, 2011)。

② F-box タンパク質 Rcy1 と Cdc50-Drs2 との関係

酵母 Two-hybrid 法を用いて、Rcy1 が Drs2 の C 末端細胞質領域 (Drs2-C) に結合することを見いだした。また、大腸菌で生産した Rcy1 と Drs2-C を用いて、両タンパク質が直接結合することを示した。さらに、Rcy1 との結合能を失う Drs2-C 変異を探索し、塩基性のアミノ酸に富んだ領域が Rcy1 との結合に重要であることを明らかにした。また、これらの変異を利用し、Rcy1 と結合できない Drs2 は、Drs2 欠失変異株 (*drs2Δ*) の低温におけるリサイクリング欠損を相補できなかったことから、Rcy1 との結合が、Drs2 の機能に重要であることが示された。また、Rcy1 が小胞のコートタンパク質である AP1 複合体に結合することが知られている Laa1 との相互作用が示され、小胞形成における Drs2 の機能との関わりが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Takahashi Y., Fujimura-Kamada K., Kondo S., Tanaka K.
Isolation and characterization of novel mutations in *CDC50*, the non-catalytic subunit of the Drs2p phospholipid flippase
J. Biochem., 149:423-432, 2011, 査読有

2. Tanaka K., Fujimura-Kamada K., Yamamoto T.
Functions of phospholipid flippases.

J Biochem., 149:131-143. 2011, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 三岡哲夫、鎌田このみ、田中一馬
How is the plasma membrane phosphatidylserine (PS) asymmetry generated in *Saccharomyces cerevisiae*?
BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (合同大会), 2010 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド

2. 花松久寿、鎌田このみ、田中一馬
Yeast phospholipid translocase Drs2-Cdc50 functions with an F-box protein Rcy1 in endocytic recycling.
BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (合同大会), 2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド

3. 田中一馬、鎌田このみ、山本隆晴
Regulation and functional significance of phospholipid asymmetry.
第 27 回内藤コンファレンス, 2010 年 7 月 1 日, シャトレーゼ ガトーキングダムサッポロ

4. 鎌田このみ、花松久寿、斉藤康二、塩路慧能、鈴木理紗、田中一馬
The functional analysis of phospholipid flippase in endocytic recycling.
第 27 回内藤コンファレンス, 2010 年 7 月 1 日, シャトレーゼ ガトーキングダムサッポロ

5. 鎌田このみ、花松久寿、斉藤康二、塩路慧能、鈴木理紗、田中一馬
The functional analysis of phospholipid flippase in endocytic recycling.
Sapporo International Cancer Symposium 2010 "Membrane Traffic and Cancer", 2010 年 6 月 28-29 日、北海道大学学術交流会館

6. 田中一馬、鎌田このみ、山本隆晴
膜脂質非対称性の制御機構と細胞機能
日本農芸化学会 2010 年度大会 シンポジウム「微生物における脂質シグナリング」
2010 年 3 月 30 日、東京大学

7. 田中一馬、鎌田このみ、山本隆晴
Regulation of phospholipid asymmetry by flippases and their cell functions.
第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム「膜リン脂質トポロジーの生物学/Biology of phospholipid dynamics」
2009 年 10 月 24 日, 神戸ポートピアホテル

8. 田中一馬、鎌田このみ、山本隆晴

Cellular functions of phospholipid
flippases.
The fourth iCeMS International Symposium,
2009年5月28日, ホテルフジタ京都

9. 田中一馬、鎌田このみ、山本隆晴
脂質の膜脂質二重層間輸送が制御する細胞
機能

第31回日本分子生物学会・第81生化学会
大会・合同大会 シンポジウム「モデル生物
を用いた脂質生物学：様々な生物における膜
脂質の多様な生物機能」2008年12月10日,
神戸ポートアイランド

10. 田中一馬、鎌田このみ、山本隆晴
Roles of flippases in yeast endocytic
recycling.
Flippase 2008, November 6, 2008, Centro
Stefano Francini, Monte Verita, Ascona,
Switzerland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 このみ (KAMADA KONOMI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：80312354