

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570192

研究課題名（和文）リン脂質フリッパーゼを制御する新規キナーゼの生理機能解析

研究課題名（英文）Role of novel kinases that regulate the function of phospholipid flippases

研究代表者

山本 隆晴（YAMAMOTO TAKAHARU）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：80312346

研究成果の概要（和文）：酵母遺伝学的スクリーニングを利用して、Dnf1/2リン脂質フリッパーゼを制御する新規因子として α -アレスチンの一つであるArt5を同定することに成功した。Art5はDnf1/2と結合することにより、生体膜のリン脂質非対称分布を調節する可能性を見出した。また、酵母フリッパーゼキナーゼFpk1/2の植物ホモログPHOTキナーゼの機能を、酵母内で発現させて解析する方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Our yeast genetic screening successfully identified Art5, one of α -arrestins, as a novel regulator of Dnf1/2 phospholipid flippases. We found that Art5 may condition phospholipid asymmetry of biomembranes, mediated by its binding with Dnf1/2. In addition, we developed a novel method to analyze functions of PHOT kinases, plant homologues of yeast Fpk1/2 flippase kinases, by producing them in the living yeast system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：生体膜、リン脂質非対称分布、リン脂質フリッパーゼ、細胞内小胞輸送、フリッパーゼキナーゼ、モデル生物、出芽酵母、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の細胞膜を構成するリン脂質は二重層の内外で非対称に分布している。例えば、フォスファチジルエタノールアミン(PE)やフォスファチジルセリン(PS)等のアミノリン脂質は細胞膜内層に、フォスファチジコリン(PC)やスフィンゴ脂質は細胞膜外層に多く分布する。この膜リン脂質非対称分布は、リン脂質が二重層を横切る運動(フリップ・フロップ)によって形成される。細胞膜

の外層から内層にリン脂質をフリップするフリッパーゼのひとつとして、type 4 P-type ATPaseが示唆されている。ヒトでは14のtype 4 P-type ATPaseが同定されている。このうち、進行性家族性肝内胆汁うっ滞の原因遺伝子として知られているATP8B1は、肝細胞の胆管側に局在する。また、ATP8B3の遺伝子産物は精子の頭部に局在する。しかし、これらの遺伝子産物の詳細な生理機能はほとんど解明されていない。

一方、真核細胞のモデル細胞である出芽酵母にも5つのtype 4 P-type ATPase (Dnf1, Dnf2, Dnf3, Drs2, Neol)が存在し、遺伝子破壊株を用いた解析からtype 4 P-type ATPaseがフリッパーゼであることを支持する結果が得られている。Dnf1とDnf2は細胞膜で重複した機能を持ち、これらの遺伝子破壊株では、蛍光標識リン脂質 (NBD標識リン脂質)の細胞内への取り込みが減少していることがHolthuisのグループによって報告された(Pomorski T., *et al.*, Mol. Biol. Cell, 2003, 14:1240-1254)。また、精製したTGN (trans-Golgi network)にPSをフリップする活性があり、TGNに局在するDrs2の遺伝子破壊株ではその活性が減少していることがGrahamのグループによって示された(Natarajan P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101:10614-10619)。さらに、申請者が属するグループを含め複数のグループにより、高等生物に先行してtype 4 P-type ATPaseの生理機能が解明されつつある。太田のグループや申請者が属するグループは、Dnf1/Dnf2が出芽時における極性成長に関与していることが明らかにした(Iwamoto, K., *et al.*, Genes Cells, 2004, 9:891-903; Saito, K., *et al.*, Mol. Biol. Cell, 2004, 15:3418-3432)。また、Drs2はTGNや初期エンドソームに局在し、Grahamのグループにより低分子量GTPase Arf1を介したTGNからの小胞形成に関与していること(Chen, C. Y., *et al.*, J. Cell Biol., 1999, 147:1223-1236)や、申請者らにより低分子量GTPase Ypt31/32やArf GAP (GTPase-activating protein)を介した初期エンドソームからTGNへのリサイクリング経路を制御していることが明らかとなっている。

以上のように、type 4 P-type ATPaseがフリッパーゼとして機能していることが明らかになりつつあるが、特に、その活性制御機構や膜リン脂質非対称分布が果たす生理機能の詳細は未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

(1) type 4 P-type ATPaseの生理機能を解明するために、その活性制御因子を同定し、機能を解析することは重要である。そこで、本研究ではtype 4 P-type ATPaseの制御因子を遺伝学的に同定することを目的の一つとした。

(2) Arf1/2 GTPaseの活性制御因子であるGcs1はCdc50-Drs2フリッパーゼと遺伝学的相互作用を示すことを既に見出している。本研究では、Gcs1がCdc50-Drs2フリッパーゼによる初期エンドソームからの小胞形成に関わるメカニズムを、特に、脂質結合の側面か

ら明らかにすることを目的の一つとした。

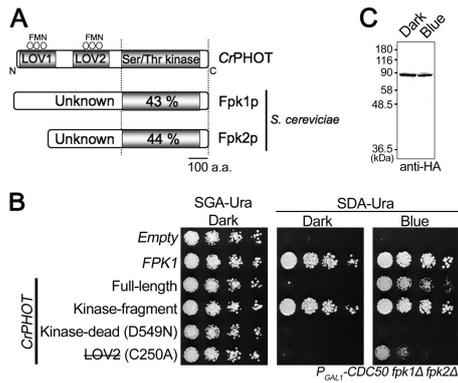
(3) 出芽酵母Fpkキナーゼの変異体は高等生物のホモログの機能解析に活用できる可能性が高い。本研究では、Fpkキナーゼと最も高い相同性を示す高等生物のキナーゼである植物PHOTキナーゼの活性制御機構を解析するための、出芽酵母実験系を構築することを目的の一つとした。

3. 研究の方法

(1) Cdc50-Drs2フリッパーゼは同じLem3-Dnf1フリッパーゼの上流因子であるFpk1キナーゼと遺伝学的相互作用を示す。即ち、*cdc50*欠損変異あるいは*drs2*欠損変異は*fpk1*欠損変異と合成致死性を示す。このことを利用すれば、Lem3-Dnf1フリッパーゼの制御因子を同定することが可能である。具体的には、Cdc50の発現をガラクトース誘導プロモーターにより制御できる*fpk1*欠損変異体を用いて、*cdc50 fpk1*合成致死性を多コピーで抑圧する遺伝子をスクリーニングした。

(2) ArfGAP Gcs1はC末側にALPS (amphipathic lipid-packing sensor) motifと呼ばれる膜認識領域を持つ。面白いことに、*gcs1*欠損変異は*cdc50*欠損変異と合成致死性を示すのに対し、ALPS motifの変異は*cdc50*欠損変異と合成致死性を示さなかった。即ち、この結果は初期エンドソームからの小胞形成にはALPS motif以外の領域が関与していることを示唆している。Gcs1の一次構造を調べると、ALPS motifの下流に、さらにALPS motifと近い配列を持つことに気がついた。そこで、その領域に変異を導入し、*cdc50*欠損変異と合成致死性を示す変異の探索を行った。

(3) Fpkキナーゼと相同性を示すキナーゼを高等生物のデータベースから探索すると、植物のPHOTキナーゼが見出される。PHOTキナーゼはLOV (light-oxygen and voltage)ドメインにより青色光依存的に活性化される。京都大学・長谷研との共同研究により、面白いことに、クラミドモナスPHOTは出芽酵母で発現させても青色光に依存して活性を示すことを見出した。このことを利用すれば、PHOTキナーゼの活性制御に必要な領域を、出芽酵母遺伝学的手法により同定することが可能である。具体的には、Cdc50の発現をガラクトース誘導プロモーターにより制御できる*fpk1 fpk2*欠損変異体で、ランダムに変異を導入したクラミドモナスPHOTを発現させ、青色光非依存的に増殖できる変異を探索した。



4. 研究成果

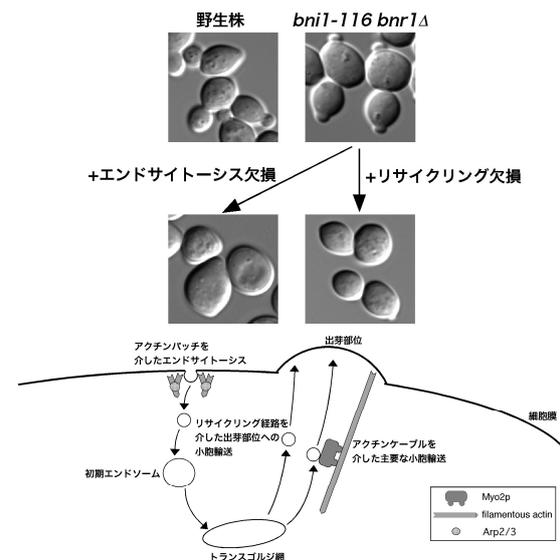
(1) *cdc50 fpk1* 合成致死性を多コピーで抑圧する遺伝子をスクリーニングしたところ、 α -アレスチンである Art5 を同定した。高等生物の β -アレスチンは受容体タンパク質のダウンレギュレーションに関わるなどの機能が明らかになってきたが、下等生物から高等生物まで広く保存されている α -アレスチンの機能はほとんど未知であった。最近、出芽酵母 α -アレスチンがアミノ酸トランスポーターなどのダウンレギュレーションに関わることが明らかになってきた。多コピー Art5 は *cdc50 fpk1* 合成致死性のみならず、*cdc50 dnf1* 合成致死性や *neo1* 致死性を抑圧することが明らかとなった。面白いことに前者は Dnf2 依存的、後者は Dnf1 と Dnf2 両者特異的であった。即ち、Art5 は Dnf1 あるいは Dnf2 を介して機能を果たしている可能性が示唆された。実際、リコンビナント Art5 タンパク質が Dnf1、Dnf2 と結合することも見出した。Art5 はユビキチンリガーゼである Rsp5 と結合する PY motif を持つ。PY motif に変異を導入すると Art5 の抑圧効果が失われたので、Rsp5 との結合が Art5 の機能に重要であることが示された。実際、Dnf1、Dnf2 フリッパーゼがユビキチン化されることを明らかにし、それに対する Art5 の効果を検討中である。さらに本研究を進展させることにより、フリッパーゼの制御機構を明らかにできるのみならず、高等生物における α -アレスチンの生理機能を理解するための基本情報を得られると期待する。

(2) Gcs1 の ALPS motif 変異と、その C 末側の領域の変異を組み合わせると、*cdc50* 変異と合成致死性を示すことを明らかにした。すなわち、Cdc50-Drs2 が制御する初期エンドソームからの小胞形成において、ALPS motif と重複した機能を持つ領域がその C 末側に存在することが示唆された。ALPS motif はリポソームとの結合において、直径依存性を示し、より小さなリポソームと強く結合する。ALPS motif の変異は小さなリポソームとの結合を弱めるが、本研究で同定された変異はその結

合能をさらに弱めた。以上の結果は、Gcs1 が ALPS motif とその C 末側領域を介して、初期エンドソームを特異的に認識している可能性が高いことを示している。この点をさらに解明することにより、Cdc50-Drs2 と Gcs1 が制御する初期エンドソームからの小胞形成の分子メカニズムを解明することができると考えている。また本研究で得られた結果は、動物細胞のホモログである ArfGAP1 の C 末の生理機能を推測する上で、とても有用であると考えられる。

(3) 出芽酵母発現系を用いて、青色光非依存的に活性を示す PHOT キナーゼ変異をスクリーニングしたところ、LOV2 ドメインの N 末側に集中して変異を同定することができた。この領域は PHOT のキナーゼ活性制御に関わる新規領域である可能性が高く、さらに構造学的な解析を進めることにより、PHOT の未知の活性制御機構を解明できる可能性が高い。また、本研究により、PHOT の酵母発現系が PHOT の分子機能解析に非常に有用であることが示された。

(4) 出芽酵母はアクチンケープルを利用して、細胞小胞を輸送し、細胞極性形成を行う。アクチンケープル形成欠損変異株は小さな芽を出した状態で成長を停止することを以前に見出していた。すなわち、小さな芽の形成に必要な小胞輸送にはアクチンケープルがなくても十分であることを示している。面白いことに、アクチンケープル形成欠損変異とエンドサイトーシス-リサイクリング経路の変異を組み合わせると、小さな芽の形成が阻害されることを見出した。



この結果は、エンドサイトーシス-リサイクリング経路は小さな芽の形成に必要な小胞輸送を制御していることを示唆している。初期エンドソームを介したリサイクリング経路は非常に複雑なシステムであり、本研究で見出さ

れた酵母変異体の系は、その複雑なシステムの解明に有用であると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Aihara Y, Yamamoto T, Okajima K, Yamamoto K, Suzuki T, Tokutomi S, Tanaka K, Nagatani A. (2012) Mutations in the N-terminal flanking region of the blue-light sensing domain LOV2 disrupt its repressive activity on the kinase domain in the *Chlamydomonas* phototropin. *J. Biol. Chem.* 287, 9901-9909, 査読有.
DOI:10.1074/jbc.M111.324723
- ② Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K., and Yamamoto T. (2011) Functions of phospholipid flippases. *J Biochem.*, 149, 131-43, 査読有.
DOI:10.1093/jb/mvq140
- ③ Yamamoto, T., Mochida, J., Kadota, J., Takeda, M., Bi, E., and Tanaka, K. (2010) Initial polarized bud growth by endocytic recycling in the absence of actin cable-dependent vesicle transport in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 21, 1237-1252, 査読有.
DOI:10.1091/mbc.E09-05-0412

[学会発表] (計9件)

- ① 山本 隆晴、細胞内小胞輸送におけるリン脂質フリッパーゼの役割、第48回日本生化学会北海道支部例会、平成23年8月5日、札幌医科大学
- ② 山本 隆晴、膜輸送におけるリン脂質フリッパーゼの役割、第63回細胞生物学会大会(招待講演)、平成23年6月28日、北海道大学
- ③ 武田 美代子、第63回細胞生物学会大会、The Role of Phospholipid Asymmetry in Vesicle Transport in the Early Endosome-to-TGN Retrieval Pathway、平成23年6月28日、北海道大学
- ④ 鉢呂 健、The role of phospholipid asymmetry in the localization of tryptophan permease Tat2p、第63回細胞生物学会大会、平成23年6月28日、北海道大学
- ⑤ Zahra Zendeboodi、Functions of the non-catalytic region of Gcslp in the phospholipid flippase-regulating membrane trafficking pathway、第63回細胞生物学会大会、2011. 6. 28、北海道大学
- ⑥ 山本 隆晴、第27回内藤コンファレンス、

Roles of phospholipid flippases and their related ArfGAP for protein trafficking、平成22年7月1日、シャトレーゼ ガトーキングダムサッポロ

- ⑦ 田中 一馬、Regulation and functional significance of phospholipid asymmetry、第27回内藤コンファレンス、平成22年7月1日、シャトレーゼ ガトーキングダムサッポロ
- ⑧ 田中 一馬、フリッパーズが制御する膜脂質非対称性とその細胞機能、第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、神戸ポートアイランド
- ⑨ 田中 一馬、Cellular functions of phospholipid flippases、The fourth iCeMS International Symposium、2009年5月28日、ホテルフジタ京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/molint/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 隆晴 (YAMAMOTO TAKAHARU)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：80312346

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

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

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

長谷 あきら (NAGATANI AKIRA)
京都大学・理学研究科・教授
研究者番号：40183082