

## 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4月17日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580094

研究課題名（和文） GPI フリッパーゼと GPI 生合成の生理的意義の解析

研究課題名（英文） Analysis of the physiological significance of GPI flippase and synthesis

研究代表者

船戸 耕一 (FUNATO KOUICHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：30379854

研究成果の概要（和文）：グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）はタンパク質を細胞表面に繋ぎ止める糖脂質である。本研究では、GPI 中間体の小胞体内腔側への輸送を助けるフリッパーゼの候補タンパク質遺伝子 *ARV1* とその他の GPI 生合成遺伝子の変異株を用いた解析により、GPI 生合成が酵母の寿命や細胞死を調節していること、細胞死の調節にはテロメアの構造が深く関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Glycosylphosphatidylinositol (GPI) is a complex glycolipid that anchors proteins to the plasma membrane. In this study, using a deletion mutant of *ARV1* gene that encodes a putative flippase required for the transport of a GPI intermediate to the ER lumen and other mutants defective in GPI synthesis, we found that GPI synthesis regulates aging and cell death in yeast, and the cell death is largely concerned with structure and function of telomere.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能、糖脂質、生体膜、細胞機能制御

## 1. 研究開始当初の背景

グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）はタンパク質を細胞表面に繋ぎ止めるための糖脂質であり、アルカリホスファターゼやプリオンなど多種多様なタンパク質が GPI によって膜に繋ぎ止められている。GPI は小胞体膜上で 10 以上の反応を経て合成される。次いで、完全型 GPI が小胞体内腔側へ転送してきた新生タンパク質に付加さ

れて GPI 結合タンパク質ができる。GPI 生合成の各反応ステップには異なる酵素が働いているが、ここ 10 数年の間に、酵素をコードする遺伝子が次々に同定され、その全容が明らかになってきた。GPI 結合タンパク質の脂質部分のリモデリングに関与する遺伝子も近年同定され、現在遺伝子レベルで明らかにされていない反応は、GPI 中間体の細胞質側から内腔側へのフリップ（移行）の過程だ

けである。この過程にはフリッパーゼと呼ばれるタンパク質が関与することが以前より推定されているが、その実体はいまだ明らかではない。

我々は、脂質ホメオスタシスに重要な役割を果たす *ARV1* 遺伝子の破壊株の温度感受性を抑圧する多コピーサプレッサー遺伝子 *GPI15* の取得と *arv1Δ* 破壊株を用いた生化学的解析によって、*ARV1* が GPI 生合成を調節する遺伝子であることを明らかにした (*Mol. Biol. Cell*, 2008)。また、*Arv1* の構造的な特性から、*Arv1* が GPI 中間体の小胞体膜の細胞質側から内腔側へのフリップを触媒するフリッパーゼの候補タンパク質である可能性を見出した。しかし、*ARV1* の欠失によって GPI 中間体のフリップは完全には抑えられないことから、*Arv1* 以外の別のタンパク質の関与も考えられる。また、*Arv1* は未同定のフリッパーゼの機能を調節するタンパク質である可能性も現時点では否定できず、これらの可能性を検証することが今後の重要な課題として残されている。

小胞体で合成された GPI 結合タンパク質はゴルジ体を経て細胞表層に運ばれる。この輸送の過程で GPI 結合タンパク質は脂質ラフトと呼ばれるスフィンゴ脂質とステロールで構成される特殊な膜領域に濃縮されると考えられており、それらの脂質に富む輸送小胞によって目的地まで運ばれると推定されている。これは、Simon と Ikonen によって提唱されたラフト仮説に基づくモデルである。ラフト仮説は、かの有名な Singer と Nicolson の膜流動モザイクモデルとは異なり、生体膜は決して均一な脂質二重構造ではなく特殊な膜領域が存在し、そのような微小領域（脂質ラフト）がタンパク質の選別輸送の装置あるいはシグナル伝達の場としての役割を担っているという、生物学に大きなインパクトをもたらした概念である。しかし、生体膜に脂質ラフトが本当に存在するか？存在するとすれば、それは細胞内のどこでどのように作られ維持されているのか？といった基本的な問いに対する答えはいまだ出ていない。

2001 年 Riezman は、酵母細胞において GPI 結合タンパク質が別のタンパク質とは異なる輸送小胞を介して小胞体からゴルジ体へ輸送されることを発見し、いわゆる「Two Vesicle Hypothesis」を提唱した。また、我々は、GPI 結合タンパク質のゴルジ体への輸送にはスフィンゴ脂質が必要であること、さらに、スフィンゴ脂質やステロールの細胞内での量は GPI 生合成によって調節されていることを明らかにした (*J. Biol. Cell*, 2002、*Mol. Biol. Cell*, 2008)。これらの結果は、脂質ラフトが GPI 結合タンパク質の選別輸送に関与しているという仮説を支持している

だけでなく、GPI 生合成と脂質ホメオスタシスの間に制御ネットワークが存在することを示唆するものである。この制御ネットワークの生理的意義は現在のところ不明であるが、GPI 結合タンパク質や脂質が関与する様々な生命現象を統合的に理解する上で極めて重要な知見であるといえる。

## 2. 研究の目的

以前の我々の解析により、*ARV1* が GPI 生合成を調節する遺伝子であることが明らかになった。また、この遺伝子産物の構造的な特性から、*Arv1* が GPI 中間体の小胞体膜の細胞質側から内腔側へのフリップを触媒するフリッパーゼの候補タンパク質である可能性が見出された。さらに、GPI 生合成がステロールやスフィンゴ脂質のホメオスタシスに深く関わっていることも明らかになり、GPI 生合成と脂質ホメオスタシスの間に制御ネットワークがあることがわかってきた。しかし、*Arv1* 自体が GPI フリッパーゼであるか、未同定の GPI フリッパーゼの調節因子であるか、制御ネットワークがどのような生命現象とリンクしているかについては不明である。そこで、本研究では、GPI フリッパーゼの実体解明と制御ネットワークの生理的意義の一端を明らかにするために、*ARV1* と機能的関係にある遺伝子の探索と、ネットワークの破綻によって起こる生育の障害のメカニズムを解明することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) *ARV1* 遺伝子と機能的に関係の深い遺伝子を探索するために、*arv1Δ* 破壊株の温度感受性をマルチコピーで抑圧する遺伝子をスクリーニングし、遺伝子の同定を行った。

(2) 酵母における GPI 生合成の寿命や細胞死における役割と作用機序を解明するために、GPI 生合成を調節する遺伝子の変異株、アポトーシスの実行因子や調節因子をコードする各種遺伝子との多重変異株を用いて、細胞生物学および遺伝学的実験を行った。

(3) GPI 生合成による細胞死の制御におけるテロメアの関与の有無については、テロメアの構成遺伝子の過剰発現用ベクターを作製し、GPI 生合成遺伝子変異株の表現型における過剰発現の影響を解析した。

## 4. 研究成果

(1) これまでの解析により、*arv1Δ* 破壊株の温度感受性をマルチコピーで抑圧する遺伝子 *SOA*(suppressors of *arv1* null mutation) をスクリーニングし、9 種類の

*SOA(SOA1~SOA9)*を取得した。*SOA1*はGPI生合成遺伝子 *GPI15* であり、この発見から *ARV1* 遺伝子が GPI 生合成を調節する遺伝子であることが判明した (*Mol. Biol. Cell*, 2008)。*SOA2*は *ERG1*, *SOA3*は *DEP1*, *SOA4*は *UPF1*, *SOA5*は *EBS1* であることに加え、本研究では *SOA7*が *YCT1* であることを明らかにした。*SOA6*, *SOA8*, *SOA9*の原因遺伝子については引き続き解析中である。

低温によって膜の流動性が低下すると、脂質や糖脂質のフリップ効率も低下する。*ARV1*がGPI中間体の小胞体膜の細胞質側から内腔側へのフリップを調節するタンパク質をコードする遺伝子であるなら、*arv1Δ*破壊株は低温感受性を示すと考えられる。そこで、低温 (16°C) における生育を調べた。その結果、野生株と比べ、著しい生育障害が見られた。興味深いことに、*arv1Δ*破壊株の低温感受性は *SOA7(YCT1)*の過剰発現により抑圧されたが、他の *SOA* 遺伝子 (*SOA3*, *4*, *6*, *8*, *9*) の過剰発現では抑圧は認められなかった。*Yct1*はシステイン特異的トランスポーターであると推測されているが、詳細は不明である。今後、破壊株や変異株を用いて、*YCT1*がGPI生合成を調節するか否かについて解析する必要があると考えられる。

(2) *arv1Δ*破壊株は aureobasidin A (AbA; 複合スフィンゴ脂質イノシトールリン酸セラミドの合成酵素の阻害剤) に対して高感受性を示し、他の GPI 生合成遺伝子の変異株も同じ形質を示すことを以前我々は明らかにした (*Mol. Biol. Cell*, 2008)。これは、スフィンゴ脂質の合成低下による酵母の生育障害が GPI 生合成の異常によって促進されることを示しており、酵母の生育が2つの合成系によって調節されていることを示している。しかし、生育障害が酵母の増殖停止によるか、細胞死によるかは不明であった。そこで、GPI 生合成を調節する遺伝子の変異株を用いて、AbA 処理後の変異株の生存率を調べた。その結果、GPI 生合成遺伝子の変異株では、AbA 処理後の酵母の生存率が著しく低下した。この生存率の低下は、出芽酵母のカスパーゼをコードする遺伝子 *YCA1* の破壊によって抑圧された。また、哺乳動物細胞の *DAP3(death associated protein 3)* に相当する分子で *YCA1* の下流で働く *Rsm23* の欠失によっても抑圧されたことから、GPI 生合成とスフィンゴ脂質生合成の2つの合成系によって調節される細胞死は、カスパーゼ依存的なプログラム細胞死であることが明らかになった。また、*arv1Δ*破壊株の AbA に対する抵抗性の低下は、酵母のシトクロム c をコードする遺伝子 *CYC1* と *CYC7* の破壊により抑圧されたことから、ミトコンドリアのシトクロム c が細胞死に関与していることが

示唆された。GPI 生合成遺伝子の変異株では、活性酸素種(ROS)の濃度の上昇とミトコンドリアの断片化も認められ、経時寿命 (chronological life span) も短くなることがわかった。*arv1Δ*破壊株での ROS の蓄積は *YCA1* の欠失によって影響を受けなかったことから、カスパーゼは ROS 産生の下流で機能していると考えられた。

我々は、*arv1Δ*破壊株が小胞体ストレスセンサーである *Ire1* あるいは分子シャペロン等の発現を調節する転写因子 *Hac1* をコードする遺伝子と高温下で合成致死を示すことを見出した。このことは、GPI 生合成と小胞体ストレス応答に何らかの機能的関係があることを示す。小胞体ストレスが閾値を越えるとアポトーシスが誘導されることが知られていることから、GPI 生合成異常による細胞死の増加は、異常な GPI 結合型タンパク質の蓄積によって生じる小胞体ストレスが原因である可能性が考えられた。そこで、GPI 生合成遺伝子の変異株で、小胞体ストレスが生じているかについて解析した。未成熟な GPI 結合タンパク質を小胞体に蓄積する GPI 生合成遺伝子変異株では、ストレス誘導剤ツニカマイシンに対する感受性が増し、小胞体ストレスによって誘導される分子シャペロンの発現が上昇、さらに小胞体の形態が異常を呈したことから、GPI 生合成遺伝子変異株では小胞体ストレスが起こっていることが示された。

小胞体にストレスがかかると、小胞体から細胞質への  $Ca^{2+}$  流出がおこる。この流出した  $Ca^{2+}$  は小胞体ストレスをミトコンドリアへ伝達するアポトーシスシグナルの1つであることから、次に我々は、GPI 生合成遺伝子変異株の細胞質  $Ca^{2+}$  濃度を測定した。その結果、GPI 生合成遺伝子変異株では、野生株と比べて  $Ca^{2+}$  濃度が上昇していることがわかった。この細胞質  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は、細胞膜に存在する Ca チャンネルをコードする遺伝子 *MIDI* の欠失によって抑えられたことから、細胞内 Ca ストア内の貯蔵量の減少を感知して細胞外から  $Ca^{2+}$  流入をきたす経路 (capacitive  $Ca^{2+}$  entry pathway) が細胞質  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に起因していることがわかった。また、*MIDI* の破壊によって細胞質  $Ca^{2+}$  濃度を低下させると、*arv1Δ*破壊株の AbA に対する抵抗性や生存率の低下も抑えられた。以上の結果から、小胞体ストレスによって活性化された capacitive  $Ca^{2+}$  entry pathway による細胞質  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が細胞死の誘導に関与していることが示された。

(3) *arv1Δ*破壊株の温度感受性を抑圧する多コピーサプレッサー遺伝子 *DEP1*, *UPF1*, *EBS1* は、破壊するとテロメア長が短小化することが知られている。また、*ARV1* も破壊するとテロメアが短小化することが報告さ

れている。これらの結果は、GPI 生合成とテロメアの構造あるいは機能の間に何らかの関連性がある可能性を示唆している。テロメアは細胞の寿命や死に重要な役割を果たしており、テロメアが短縮すると、DNA ダメージとして認識され、細胞増殖の停止やアポトーシスの誘導が起こる。そこで、GPI 生合成により調節されている酵母の細胞死にテロメアが関与するか否かについて解析を行った。その結果、*arv1Δ*破壊株の AbA に対する抵抗性と生存率の低下は、テロメアの構成遺伝子の過剰発現により軽減された。さらに、GPI 生合成遺伝子変異株では、テロメアの核膜周辺でのクラスター形成が異常になること、その異常はテロメアの構成遺伝子の過剰発現により抑圧されることがわかった。クラスター形成の異常はアポトーシスの実行因子である酵母カスパーゼ遺伝子 *YCA1* の破壊によっては抑圧されなかったことから、クラスター形成の異常は細胞死の上流で起こることが示唆された。以上の結果から、GPI 生合成による細胞死の制御にテロメアの構造が深く関わっていることが示唆された。

(3) 連携研究者  
なし

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

①梶原健太郎、船戸耕一 スフィンゴ脂質恒常性の破綻がきたす細胞死誘導機構の解析  
酵母遺伝学フォーラム第42回研究報告会  
(2009年7月29日、つくば市)

②梶原健太郎、船戸耕一 スフィンゴ脂質恒常性の破綻がきたす細胞死誘導機構の解析  
2009年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会  
(2009年10月31日、沖縄)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

船戸 耕一 (FUNATO KOUICHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授  
研究者番号：30379854

##### (2) 研究分担者

なし