

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570185

研究課題名(和文) GPIアンカー型タンパク質の最終目的地を決定するメカニズム

研究課題名(英文) What mechanisms determine the final destination of GPI-anchored proteins?

研究代表者

横尾 岳彦 (Yoko-o, Takehiko)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：60358306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：真菌類のGPIアンカー型タンパク質(GPI-AP)には、細胞膜にとどまるものと細胞壁に移行するものがある。出芽酵母において、GPI脂質のセラミドへの変換を担う遺伝子CWH43を破壊し、GPI-APの細胞壁/細胞膜の存在量を調べたところ、野生型株と比較して細胞壁におけるGPI-AP量が増加しており、GPI脂質のセラミドへの変換はGPI-APの細胞膜から細胞壁への移行抑制に寄与することが明らかになった。また、GPIのグリカン側鎖の構造に関与すると考えられるTED1遺伝子の破壊株においては、細胞膜のGPI-AP量が増加しており、側鎖構造とGPIの脂質部分の変換との関連が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：In fungi, a number of GPI-anchored proteins (GPI-APs) are retained to the plasma membrane, whereas others are transferred to the cell wall. We investigated amounts of GPI-AP in the cell wall and plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae* cwh43 deletion mutant cells, in which lipid moieties of GPI-APs are not converted to ceramide types. In cwh43 mutant cells, the amount of GPI-AP in the cell wall is increased, indicating that the conversion (lipid remodeling) to ceramides in GPI lipid moieties contributes to the retention of GPI-APs to the plasma membrane. In ted1 deletion mutant cells, in which structure of glycans of GPI is altered, the amount of GPI-AP in the plasma membrane is increased, indicating that glycan structures of GPI influences the lipid remodeling of GPI.

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学 GPIアンカー 糖鎖 脂質 小胞体 細胞膜 細胞壁 酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質は細胞内において、自分が本来働くべき目的地に到達して初めて、機能を正しく発揮する。従って、タンパク質の局在化メカニズムの解明は、生物学上の重要な問題の一つである。タンパク質の翻訳後修飾のひとつに、糖脂質の一種であるグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) による修飾がある。タンパク質のうちの約 1% は GPI が付加していると云われており、このようなタンパク質は、GPI によって細胞膜の表層につなが止められる。GPI があたかも錨のような役割を果たしているため、このようなタンパク質は、GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) と呼ばれる。

(2) 細胞膜は、均一な構造をしている訳ではなく、物性の異なる微小領域がパッチ状に存在することが最近わかってきた。このような領域はマイクロドメインあるいは脂質ラフトと呼ばれ、GPI-AP はステロールやスフィンゴ脂質とともに、マイクロドメインの構成成分の一つである。マイクロドメインは、細胞表層でシグナル伝達等の場を形成するなど、細胞の増殖に重要な役割を果たしている。GPI 合成に異常が生じると、GPI-AP がマイクロドメインに正しく会合することができず、哺乳類の個体発生や、酵母をはじめとした真菌の増殖にきわめて重篤な影響が生じる。

(3) GPI の生合成は、小胞体 (ER) で始まる。ホスファチジルイノシトール (PI) に、マンノースやエタノールアミンリン酸が多数の酵素の働きによって付加し、完成型 GPI 前駆体が形成される。その後、タンパク質の C 末端近くの サイトと呼ばれるアミノ酸残基に、この完成型 GPI 前駆体がアミド基転移反応により転移し、タンパク質と結合する。さらにその後、PI の脂質部分の変換が行われる。PI の *sn*-2 位に付加している脂肪酸の多くは不飽和結合を持ったものであるが、これが飽和型の脂肪酸に置き換えられる。酵母の場合、その後さらに、脂質部分のジアシルグリセロールがセラミドに変換されることがある。これらの変換過程は脂質リモデリングと呼ばれ、GPI-AP の合成過程における特徴的な点の一つである。脂質リモデリングは、GPI-AP のマイクロドメインへの会合に必須の過程であることを、私達は本研究の開始時点までに明らかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) タンパク質が細胞内の本来の場所に正しく局在することは、生物が生きていく上で極めて重要である。酵母の場合、GPI-AP は、細胞壁に移行するものと細胞膜に留まるものとの 2 種類が存在する。従って、GPI-AP が細胞膜に留まるか、細胞壁に移行するか、GPI-AP の種類に応じて正しく行き先を制御

するメカニズムがなくてはならない。GPI-AP の行き先は サイト上流のアミノ酸配列に依存することが、従来からわかっていた。具体的には、GPI-AP の サイト上流に親水性アミノ酸や塩基性アミノ酸が多いと細胞膜に留まり、疎水性アミノ酸や酸性アミノ酸が多いと細胞壁に移行する。従来、この サイト上流の情報を元にして、細胞膜に留めるか細胞壁に移行するかを決定するメカニズムが細胞表層にあると考えられていた。すなわち、細胞膜あるいは細胞壁へのソーティングが細胞表層で行われる、という考え方である。

(2) 私達は、主に酵母細胞を材料として、GPI-AP の生合成過程に関する研究を行ってきた。近年は脂質リモデリング機構に注目しており、この生理的役割に興味を持って研究を進めている。その結果、この反応には少なくとも三つの遺伝子 *PER1*、*GUP1*、*CWH43* が関与することを明らかにしてきた (図 1)。

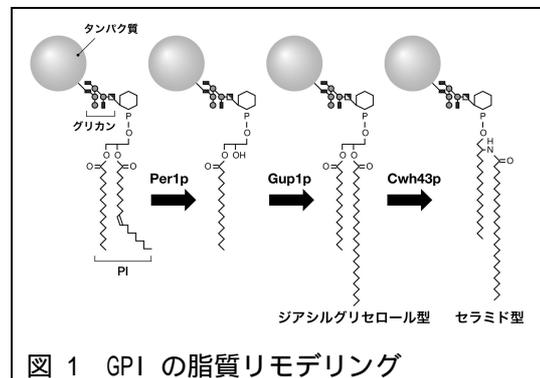


図 1 GPI の脂質リモデリング

sn-2 位の脂肪酸鎖の長鎖飽和型への変換に関与する *PER1* および *GUP1* を破壊すると、GPI-AP がマイクロドメインに会合できなくなるが、セラミドへの変換に関与する遺伝子 *CWH43* を破壊しても、GPI-AP は依然としてマイクロドメインに会合することができた。では、GPI の脂質をわざわざセラミドに変換する生理的意義は、いったい何であろうか。

(3) 本研究の開始時点までに、私達は細胞膜局在型 GPI-AP である Gas1p と細胞壁局在型 GPI-AP である Cwp2p の GPI 脂質の構造を、質量分析によって解析した。すると、Gas1p の GPI はすべてセラミド型である一方、Cwp2p の GPI はすべてジアシルグリセロール型であることが判明した。このことから、脂質の構造の違いが、GPI-AP が細胞膜にとどまるか細胞壁に移行するかを決定している、という可能性が考えられた。言い換えると、GPI のセラミド型への変換の生理的意義は、GPI-AP が細胞壁に行かないように細胞膜上にとどめておくこと、ということである。脂質リモデリングは ER で行われることを考えると、このことは、GPI-AP の最終的な行き先決定メカニズムが ER で発動し、タンパク質が目的地別にすでに仕分けられ

ていることを示しており、これは、ソーティングは細胞表層で行われるという従来の考え方を、根底から覆すものである。そこで、本研究においては、脂質の構造の違いが GPI-AP の最終目的地（細胞膜あるいは細胞壁）を決めているという仮説を検証するとともに、この反応がどのようなメカニズムで行われているかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GPI アンカー合成系の変異株における GPI-AP の局在解析

細胞膜に主に存在する GPI-AP である Gas1p および細胞壁に主に存在する GPI-AP である Cwp2p をモデルタンパク質として選び、FLAG タグを接続した融合タンパク質を発現するようなプラスミドを構築した。これらのプラスミドを、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の W303-1A 野生型株および W303-1A 由来の GPI アンカー合成系の変異株に導入し、融合タンパク質発現株より細胞膜画分および細胞壁画分を分離、それぞれに含まれる融合タンパク質の量を、イムノプロットティングにより調べた。

(2) Gas1p-Cwp2p キメラ型タンパク質の局在解析

Gas1p の GPI アンカー付加部位（サイト）の上流 2 アミノ酸あるいは 6 アミノ酸残基を、Cwp2p のものに置き換えることにより、Gas1p-Cwp2p キメラ型タンパク質を発現するようなプラスミドを構築した。このプラスミドを野生型株および GPI アンカー合成系の変異株に導入し、方法(1)と同様の手法で、細胞膜画分および細胞壁画分におけるキメラ型タンパク質の量を調べた。

(3) *ted1* 破壊株および *cdc1-1* 変異株の作製

出芽酵母野生型株の染色体上に変異型 DNA 断片を挿入して形質転換することにより、*ted1* 破壊株および *cdc1-1* 変異株を作製した。また、同様の手法を用いて、*cwh43 ted1* 二重破壊株も作製した。

(4) GPI の脂質リモデリングとマイクロドメイン局在膜タンパク質との関連の解析

マイクロドメインに局在する膜貫通型タンパク質 Tat2p の下流に HA タグを接続した融合タンパク質を発現するようなプラスミドを構築し、野生型株および GPI アンカー合成系の変異株に導入し、界面活性剤不溶性膜画分 (DRM) に存在する Tat2p の量を、イムノプロットティングにより調べた。

4. 研究成果

(1) *cwh43* 変異株における Gas1p の局在解析

GPI-AP がセラミド型に変換されると細胞

膜に留まるのならば、セラミド変換に關与する *cwh43* 遺伝子破壊株においてはジアシルグリセロール型の GPI-AP しか存在しないため、細胞壁に局在する GPI-AP が増加していることが期待される。そこで、本来は細胞膜に局在する GPI-AP である Gas1p を野生型および *cwh43* 破壊株の細胞膜および細胞壁より抽出し、イムノプロットティングにより定量したところ、*cwh43* 破壊株では細胞壁の Gas1p の量が増加していることを見いだした（図 2）。このことより、CWH43 による脂質部分のセラミド型への変換は、GPI-AP の細胞膜への保持に寄与していることが明らかになった。

(2) Gas1p-Cwp2p キメラ型タンパク質の局在解析

GPI-AP が細胞膜に留まるか細胞壁に移行するかについては、タンパク質の サイト上流のアミノ酸配列が重要な役割を担っていることが報告されている。細胞膜の GPI-AP はセラミド型、細胞壁の GPI-AP はジアシルグリセロール型という使い分けがなされている可能性を検証するため、細胞膜にとどまりセラミド型の GPI を有する Gas1p の サイト上流の配列を、細胞壁に移行しジアシルグリセロール型の GPI を有する Cwp2p の配列に置き換え、Gas1p-Cwp2p キメラタンパク質の局在を調べた。

野生型株においては、このキメラタンパク質の細胞壁への局在が増加しており、その程度は、アミノ酸の置換の数が多いほど顕著であった（図 2）。このことより、 サイト上流のアミノ酸配列が Gas1p の細胞膜 / 細胞壁への局在に影響することが確認された。

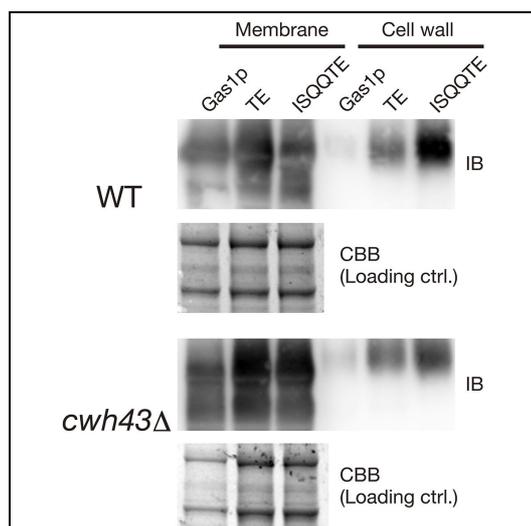


図 2 野生型株および *cwh43* 破壊株における Gas1p の細胞膜 / 細胞壁への局在。TE および ISQQTTE は、Gas1p-Cwp2p キメラタンパク質で、前者は サイトの上流 2 残基を、後者は上流 6 残基を Gas1p 型から Cwp2p 型に置換したものである。

いっぽう、研究成果(1)により、CWH43 も

Gas1p の細胞膜 / 細胞壁への局在に寄与していることが明らかになっている。このことより、Cwh43p が サイト上流のアミノ酸配列を見分けて、この部位が Gas1p 型だとセラミドに変換、Cwp2p 型だと変換しない、という作業仮説を立てた。もしこの仮説が正しいならば、*cwh43* 破壊株においては サイト上流のアミノ酸配列を変えた効果はキャンセルされるはずである。*cwh43* 破壊株において Gas1p-Cwp2p キメラタンパク質の局在を調べたところ、この株においてもやはり、キメラタンパク質はアミノ酸の置換の程度に応じて、細胞壁への存在量が増加していた (図 2)。したがって、Cwh43p が サイト上流の配列を見分けてセラミド変換を行っている可能性は低く、GPI-AP が細胞膜にとどまるか細胞壁に移行するかについては、 サイト上流の配列が関与する系と GPI の脂質部分が関与する系とが、独立二重系のような形で働いていると結論づけた。

(3) GPI-AP の局在と GPI のグリカン構造との関連

哺乳類の PGAP5 は、GPI のグリカン部分の側鎖に付加しているホスホエタノールアミンを除去する活性を有し、GPI-AP が小胞体からゴルジ体に向けて出て行く (ER exit) ために必要である。*TED1* および *CDC1* は、*PGAP5* の酵母ホモログであり、*TED1* は GPI-AP の ER exit に関与するいっぽう、*CDC1* は *PER1* および *GUP1* と遺伝的相互作用があることがわかっている。これらの遺伝子が GPI-AP の局在に関与している可能性を調べるため、*ted1* 破壊株および *cdc1-1* 温度感受性変異株を作製した。また、*cwh43 ted1* 二重破壊株も作製した。

ted1 破壊株および *cdc1-1* 変異株における Gas1p の細胞膜 / 細胞壁への局在を調べたところ、野生型株との顕著な違いは見られなかった。また、*cwh43 ted1* 二重破壊株における Gas1p のふるまいは、*cwh43* 単独破壊株と同様であった。次に、これらの株における Cwp2p の細胞膜 / 細胞壁への局在を調べた。*ted1* 破壊株においては、細胞膜における Cwp2p の量が増加しており、この量の増加は、*cwh43 ted1* 二重破壊株において緩和された (図 3)。このことより、*TED1* 遺伝子は、GPI-AP の細胞壁への移行に関与しており、*ted1* 破壊株においては細胞壁へ行くべき GPI-AP の過剰なセラミド型への変換が生じていることが示唆された。

(4) GPI の脂質リモデリングとマイクロドメイン局在膜タンパク質との関連の解析

GPI-AP は細胞膜上のマイクロドメインに局在するが、脂質リモデリングが異常になるとマイクロドメイン上に局在できなくなることを、これまでに明らかにしてきた。脂質リモデリングの異常がマイクロドメイン上の複数回膜貫通型タンパク質 Tat2p の局在

にも影響するかを調べた結果、*per1* 破壊株および *gup1* 破壊株においては Tat2p がマイクロドメインに会合できなくなることを、生化学的に明らかにした (図 4)。

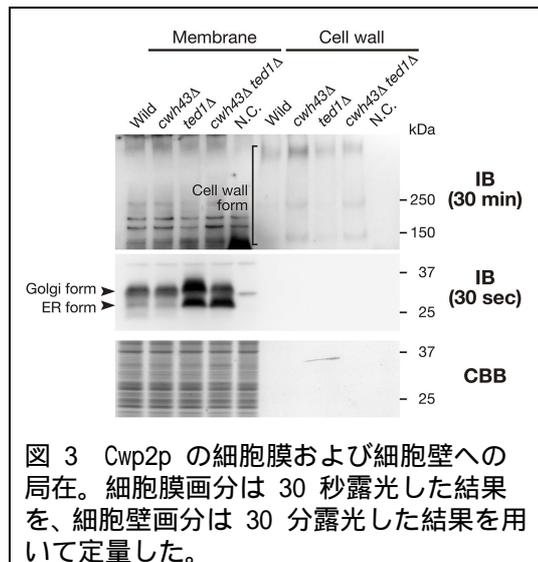


図 3 Cwp2p の細胞膜および細胞壁への局在。細胞膜画分は 30 秒露光した結果を、細胞壁画分は 30 分露光した結果を用いて定量した。

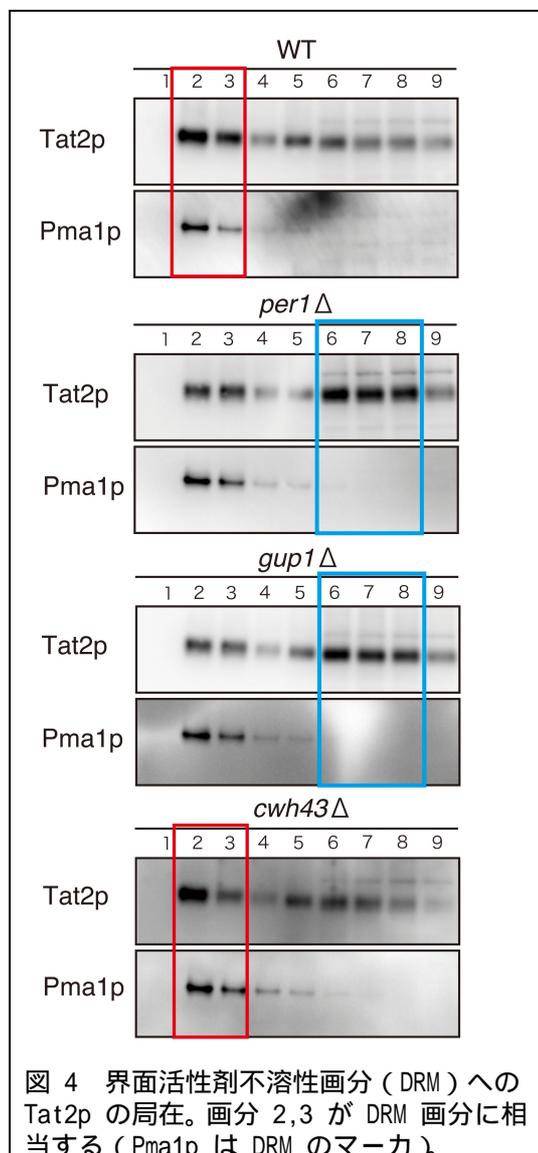


図 4 界面活性剤不溶性画分 (DRM) への Tat2p の局在。画分 2,3 が DRM 画分に相当する (Pma1p は DRM のマーカー)。

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)

横尾岳彦, GPI アンカー生合成系における新規バイパス経路, *化学と生物*, 査読有, 52, 2014, 283-284.

http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol52_5_2014.html

Yoko-o, T., Ichikawa, D., Miyagishi, Y., Kato, A., Umemura, M., Takase, K., Ra, M., Ikeda, K., Taguchi, R. and Jigami, Y. Determination and physiological roles of the glycosylphosphatidylinositol lipid remodelling pathway in yeast. *Mol. Microbiol.*, 査読有, 88, 2013, 140-155. doi: 10.1111/mmi.12175.

Sagane, K., Umemura, M., Ogawa-Mitsuhashi, K., Tsukahara, K., Yoko-o, T. and Jigami, Y. Analysis of membrane topology and identification of essential residues for the yeast endoplasmic reticulum inositol acyltransferase Gwt1p. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 286, 2011, 14649-14658. doi: 10.1074/jbc.M110.193490.

[学会発表](計 8 件)

横尾岳彦、小松崎亜紀子、千葉靖典、新産業酵母 *Ogataea minuta* における GPI 生合成機構の解析, 第 13 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会, 2014 年 2 月 18 日, 産業技術総合研究所共用講堂(茨城県つくば市)。

横尾岳彦、高瀬久美子、梅村真理子, GPI アンカー型タンパク質の最終目的地を決定するメカニズムの解析, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 4 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)。
小松崎亜紀子、千葉靖典、横尾岳彦, メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* における GPI の生合成系の解析, 酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会, 2013 年 9 月 9 日, 東北学院大学(宮城県仙台市)。

横尾岳彦、小松崎亜紀子、千葉靖典、新産業酵母 *Ogataea minuta* における GPI 生合成系遺伝子の解析, 第 12 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会, 2013 年 2 月 5 日, 産業技術総合研究所共用講堂(茨城県つくば市)。

横尾岳彦、高瀬久美子、梅村真理子、地神芳文, GPI アンカー型タンパク質の最終目的地を決定するメカニズムの解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 14 日, 福岡国際会議場(福岡県福

岡市)。

横尾岳彦、高瀬久美子、梅村真理子、地神芳文, GPI アンカー型タンパク質の最終目的地を決定するメカニズムの解析, 酵母遺伝学フォーラム第 45 回研究報告会, 2012 年 9 月 5 日, 京都大学宇治キャンパス(京都府宇治市)。

市川大輔、横尾岳彦、地神芳文, GPI の脂質リモデリングにおけるマイクロドメイン局在膜タンパク質の解析, 第 11 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会, 2012 年 1 月 31 日, 産業技術総合研究所共用講堂(茨城県つくば市)。

市川大輔、横尾岳彦、地神芳文, GPI の脂質リモデリングにおけるマイクロドメイン局在膜タンパク質の解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

[図書](計 3 件)

横尾岳彦, 講談社, プロテオミクス辞典, 2013, p.27.

横尾岳彦、千葉靖典, 酵母の生命科学と生物工学 - 産業応用から基礎化学へ, 2013, pp.97-116.

地神芳文、横尾岳彦, シーエムシー出版, 「BIO INDUSTRY 28 (6)」特集「酵母イノベーション」, 2011, pp.5-52.

[その他]

ホームページ等

酵母細胞における GPI の脂質リモデリング経路の同定とその生理的役割

<https://staff.aist.go.jp/t.yoko-o/gbs/pathway.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 岳彦 (YOKO-O, Takehiko)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号: 60358306

(2) 研究分担者

地神 芳文 (JIGAMI, Yoshifumi)

独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医学研究センター・招聘研究員

研究者番号: 30357496