

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657120

研究課題名（和文） 脂質非対称を感知するセンサーと細胞内シグナルの分子機構の解明

研究課題名（英文） Identification of the sensor molecule that senses lipid asymmetry and elucidation of the molecular mechanism of its intracellular signaling

研究代表者

木原 章雄 (KIHARA AKIO)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：50333620

研究成果の概要（和文）：脂質非対称とは細胞膜脂質二重層において外層と内層の脂質分子の組成が異なることを指す。我々はこれまでに脂質非対称変化を感知し、下流に伝達する経路として Rim101 経路を同定してきた。本研究において我々は Rim101 経路の因子の中でも Rim21 がセンサーとして機能し、Rim9, Dfg16 は Rim21 と複合体を形成してその細胞内局在、安定性を調節していることを明らかにした。また、脂質非対称が変化した際に、細胞機能を保つ役割を持つ新規因子として Opt2 を同定した。

研究成果の概要（英文）：Lipid asymmetry refers to different lipid compositions between the two leaflets of the plasma membrane. We have identified the Rim101 pathway as pathway detecting a change in lipid asymmetry and transducing its signal to downstream. In the present study, we found that among factors functioning in the Rim101 pathway Rim21 is a sensor protein and that Rim9 and Dfg16 interact with Rim21 and regulate the intracellular localization and stability of Rim21. In addition, we identified Opt2 as a novel factor that keeps cellular functions when lipid asymmetry is altered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：脂質，生体膜，脂質非対称，センサー

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物細胞膜の外層にはホスファチジルコリン，スフィンゴ脂質が多く，内層にはホスファチジルエタノールアミン，ホスファチジルセリン，ホスファチジルイノシトールが多い。このように真核生物の細胞膜の脂質は非対称に分布している。脂質非対称の維持は，細胞膜の安定化，小胞輸送，オルガネラの形態形成に重要である。また，脂質非対称が破綻すると細胞は不可逆的な運命をたどる。例えば，ホスファチジルセリンは通常細胞膜の内層にのみ存在する。しかし，アポトーシスを起こした細胞ではホスファチジルセリン

は外層に露出し，このホスファチジルセリンを認識するマクロファージにより貪食される。また，血小板は活性化するとホスファチジルセリンを露出し，フィブリン形成のための不可逆的なカスケードを進行させる。脂質非対称は脂質分子のフリップ・フロップを触媒する脂質トランスロカーゼにより形成される。約 15 年前に初めて脂質トランスロカーゼとして ATPase II が同定されて以来，次々と脂質トランスロカーゼが同定されてきた。これらにはグリセロリン脂質のフリップを触媒する P タイプ ATPase ファミリー，グリセロリン脂質のフロップを触媒する

ABC トランスポーターなどがある。我々は 2002 年にスフィンゴ脂質の疎水性骨格である長鎖塩基をフロップさせる脂質トランスロカーゼとして *Rsb1* を酵母において同定した。さらに 2005 年には脂質非対称が変化すると *Rsb1* の発現が上昇することを見だし、脂質非対称の変化を感知して *Rsb1* の発現に結びつけるシグナル伝達経路の存在を予測した。2008 年には実際にこのシグナル伝達経路として *Rim101* 経路を同定した。

## 2. 研究の目的

脂質非対称の維持は細胞機能の維持に極めて重要であることから、脂質非対称が変化しても元に戻す恒常性機構の存在が推測されていた。我々は上述のように出芽酵母をモデル生物として用い、脂質非対称変化を感知して *Rim101* 経路が活性化し、最終的にスフィンゴ脂質トランスロカーゼ *Rsb1* などの転写を引き起こす機構を見いだしていた。この *Rim101* 経路は、*Rim21*, *Dfg16*, *Rim9*, *Rim8*, *Rim13*, *Rim101* 及びエンドソームに存在する ESCRT 因子によって構成される(図 1)。この経路はもともと細胞外のアルカリに応答するための経路として見いだされていたものであった。脂質非対称時とアルカリ応答時には、共にすべての *Rim101* 経路の因子が必要であったことから、脂質非対称変化と培地のアルカリ化は細胞膜の表面電荷あるいは電位差のような共通のものを介して *Rim101* 経路によって認識されている可能性が考えられた。しかし、これらの認識機構だけでなく、この経路ではどの因子がセンサーとして働くのか、またどうやってシグナルが下流に伝えられるのか等、不明な点が数多く残されていた。そこで本研究ではそれらの解明を試みた。脂質非対称のセンサーと下流シグナル伝達経路の存在という概念は極めて斬新であり、実際にセンサーがどのようにして脂質非対称を感知しているのかを解明するという課題は極めて先駆的である。脂質非対称を感知する機構は真核生物に普遍的に存在し、且つ複数存在すると考えられる。もし、この研究課題を明らかにすることができれば脂質非対称のセンサーの基本原理の解明へとつながり、他のセンサー分子の同定など新たな発見へと発展し、新規研究領域の創設の可能性を秘めている。

## 3. 研究の方法

### (1) *Rim101* 経路の活性化状態の測定

*Rim101* は *Rim101* 経路の最下流に位置する転写因子である。*Rim101* 経路が活性化すると *Rim101* は N 末端が切断されて活性化型となる。本研究では HA タグを付加した *Rim101* を細胞に発現させ、その切断状態を抗 HA 抗体を用いたイムノブロットングにより検

出した。

### (2) *Rim101* 経路因子の細胞内局在の観察

*Rim101* 経路の因子のうち、*Rim21*, *Dfg16*, *Rim9* の細胞内局在の変化をモニターするためにそれぞれに GFP タグを付加したコンストラクトを作成し、酵母に導入、蛍光顕微鏡による観察を行った。

### (3) デグロンタグによる一過的タンパク質分解システム

デグロンとはタンパク質を不安定化させる配列のことであり、AID (auxin-inducible degron) はオーキシンという植物由来ホルモンを培地に添加すると一過的に作用するデグロンである。本研究では *Rim21*, *Dfg16*, *Rim9* に AID タグを付加したコンストラクトを作成し、それぞれのタンパク質を一過的に分解した際の *Rim101* 経路に与える影響を調べた。

### (4) DNA マイクロアレイ

*Rsb1* 以外にも脂質非対称変化依存的に発現が上昇し、その発現上昇が *Rim101* 経路依存的な新規因子を探索するために DNA マイクロアレイを行った。DNA マイクロアレイには野生型、 $\Delta lem3$ ,  $\Delta pdr5$ ,  $\Delta lem3 \Delta rim21$  から調製した RNA を用いた。*Lem3* 及び *Pdr5* はグリセロリン脂質のフリップ、フロップにそれぞれ働く因子である。

## 4. 研究成果

### (1) *Rim21* はセンサータンパク質として機能する

糸状菌である *Aspergillus nidulans* にも *Rim101* 経路に相当する経路が存在し、その中で *PalH* が pH を感知するセンサーであることが示唆されている。出芽酵母には *PalH* の明確なホモログは存在しないが、*Rim21* と *Dfg16* が弱いながら *PalH* に対してホモロジーを示す。このことから *Rim101* 経路のセンサーとして *Rim21* あるいは *Dfg16* である可能性が高いと考えられていた。我々はどちらかがセンサーで、もう片方が補助因子であるならば、補助因子がない条件でもセンサーの過剰発現が弱いながらも *Rim101* を活性化できるのではないかと考え、 $\Delta rim21 \Delta dfg16$  株中で *Rim21* あるいは *Dfg16* を過剰発現させた。しかし、両者ともアルカリ条件下で *Rim101* 経路を活性化できなかった。また、*Rim21*, *Dfg16* と同様に細胞膜に局在する *Rim9* を共過剰発現させても効果は無かった。これらのことから、*Rim21* と *Dfg16* は共に *Rim101* 経路で必須の役割を持つことが明らかとなった。

我々は次にこれらの因子の翻訳後修飾、安定性と他の因子の関わりについて検討した。

まず我々は Rim21 と Dfg16 が共に糖鎖付加とリン酸化、Rim9 がリン酸化を受けていることを見いだした。Rim21 は  $\Delta dfg16$  株中では極めて不安定であり、 $\Delta rim9$  中でも不安定化が観察された。Dfg16 は  $\Delta rim9$  中で不安定になっていたが、 $\Delta rim21$  中は特に安定性に変化は見られなかった。Rim9 の安定性は  $\Delta rim21$ ,  $\Delta dfg16$  中で特に変化は見られなかったが、非リン酸化型が増加していた。これらのことから、Rim21, Dfg16, Rim9 は相互に安定化やリン酸化に寄与していることが明らかとなった。特に Dfg16 及び Rim9 は Rim21 の安定化に必要であることが示された。また、これらの相互依存性からこれらが複合体を形成している可能性が考えられた。そこで我々は Rim21, Dfg16, Rim9 の相互作用を免疫共沈降法によって調べた。その結果、これらの因子はいずれも相互作用していることが明らかになった。

我々は次に Rim21, Dfg16, Rim9 の細胞内局在について検討した。これらの因子はいずれも細胞膜に局在していたが、細胞膜に均一に存在するのではなく、パッチ状に局在していた。このような局在パターンを示す構造体として近年エイソソームが知られている。そこで我々はエイソソームタンパク質である Pil1 との共局在を調べたが、Pil1 とは共局在しないことが明らかとなった。また、それぞれの因子の局在を他の因子の欠損株中에서도調べたところ、いずれの場合も細胞膜のパッチ状局在は消失し、細胞内オルガネラに局在していた。これらのことから、Rim21, Dfg16, Rim9 はエイソソームとは異なる新規の細胞膜構造体に局在し、その局在には他の因子が必要であることが明らかとなった。

Rim21, Dfg16, Rim9 のうちいずれかがセンサータンパク質であり、他の因子はセンサー因子の安定性や正常な細胞内局在に必須であることが示唆された。しかし、それぞれの因子の欠損株を用いた解析ではもともとセンサー因子が不安定化/異常な局在を示しており、センサーとしての働きを検出することが困難であった。そこで我々は一過的なタンパク質分解システムを利用した。AID タグを目的タンパク質に付加することで、細胞外から加えるオーキシン依存的にそのタンパク質を分解できるようにした。我々は Rim21, Dfg16, Rim9 のそれぞれに AID タグを付加し、オーキシンを加えることで一過的にそれらを分解した条件下での Rim101 経路の活性化能を調べた。その結果、Dfg16 と Rim9 を一過的に分解しても Rim101 は正常に活性化されたのに対し、Rim21 を分解すると Rim101 経路の活性化は損なわれた。これらのことから、Rim21 がセンサー分子であることが明らかとなった (図 1)。Dfg16 と Rim9 は Rim21 の正常な局在と安定性には必

要であるものの、一旦 Rim21 が細胞膜に局在するのを助けるとそれ以降は必要ではないことが示唆された。

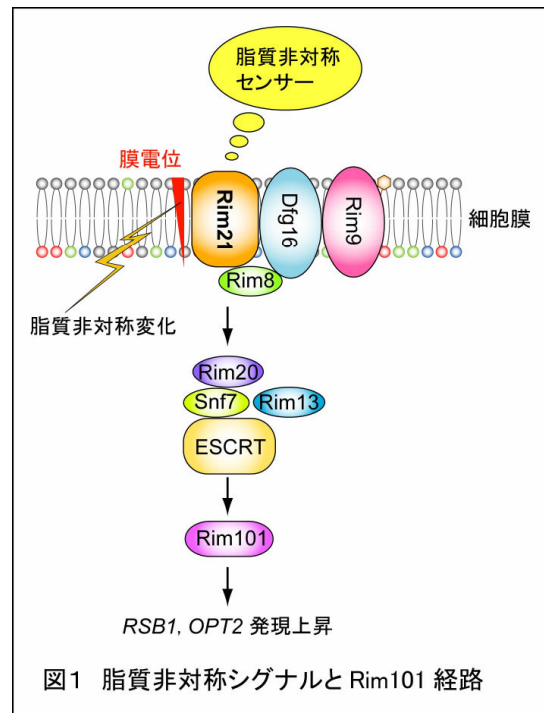


図1 脂質非対称シグナルと Rim101 経路

我々は次に培地のアルカリ化後の Rim21, Dfg16, Rim9 の安定性と細胞内局在の変化について調べた。その結果いずれの因子も培地のアルカリ化により速やかに細胞膜から、エンドソーム/液胞へ移行しており、分解を受けることが明らかとなった。

細胞膜は脂質非対称によって、内層がマイナスに荷電している。内層と外層の荷電の違いは細胞膜を隔てた電位差形成に寄与している。酵母の細胞膜の膜電位は主にプロトンの濃度勾配によって形成されている。培地をアルカリにすると細胞外のプロトンは水へと変換されることから膜電位は減少する。このように、脂質非対称変化と培地のアルカリ化は共に膜電位の現象を引き起こすことから、我々は Rim21 が細胞膜の膜電位の変化あるいは細胞膜の表面電荷を認識している可能性を考えた。この可能性を検証するために、培地中に膜電位を壊す CCCP を添加して Rim101 経路の活性化能を調べた。その結果、CCCP を培地に添加するだけで Rim101 経路が活性化することが明らかとなった。また、細胞膜の内層に存在し、マイナスに荷電した脂質分子であるホスファチジルセリンの合成欠損株中においても Rim101 経路が活性化していることを明らかにした。これらのことから、Rim21 は細胞膜の電位差の減少を認識して活性化することが示唆された (図 1)。

## (2) 新規脂質非対称関連因子 Opt2 の同定

脂質非対称の変化に対する細胞応答の全体像を捉え、新規脂質非対称関連因子を同定するために DNA マイクロアレイ解析を行った。まず細胞膜脂質のフリップおよびフロップの不全株で発現が変動する遺伝子を選抜したところ、Rim101 経路に依存的な 27 個および非依存的な 15 個が同定された。次にそれらの遺伝子と LEM3 との二重欠損株を作製したところ、 $\Delta opt2 \Delta lem3$  株で顕著な生育悪化が見られた。このことから Opt2 が乱れた脂質非対称に対する応答に非常に重要な因子であることが明らかとなった。Opt2 は 13 回膜貫通タンパク質と予想されるが、機能は未知のままである。そこで私達は Opt2 のさらなる解析を進めた。その結果、Opt2 は Rim101 経路の活性化には直接関与しないが、その下流で液胞の形態維持に関わることが示唆された。さらに外層に露出したホスファチジルエタノールアミンと結合して毒性を示す薬剤デュラマイシンに対して  $\Delta opt2 \Delta lem3$  株が耐性を示した。このことは、Opt2 が新規のホスファチジルエタノールアミンフロッパーゼである可能性を示唆している。

## 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 1 件)

- ① Obara, K., Yamamoto, H., and Kihara, A. (2012) Membrane protein Rim21 plays a central role in sensing ambient pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 287, 38473-38481. 10.1074/jbc.M112.394205, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 小原圭介, Rim21 は Rim101 経路のセンサータンパク質として中心的な役割を果たす. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.14., 福岡国際会議場/マリンメッセ福岡 (福岡県)
- ② 山内佐織, 乱れた脂質非対称への応答に関与する新規因子の単離・解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.14., 福岡国際会議場/マリンメッセ福岡 (福岡県)
- ③ 小原圭介, 脂質非対称の乱れに対する細胞応答の網羅的解析. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.16., パシフィコ横浜 (神奈川県)

[その他]

ホームページ等

北海道大学生化学研究室:

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/seika/inde>

x.html

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木原 章雄 (KIHARA AKIO)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号: 50333620

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

小原 圭介 (OBARA KEISUKE)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 30419858