

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25年 5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21370085

研究課題名（和文） 生体膜リン脂質非対称性の変化が制御する細胞機能の解析

研究課題名（英文） Studies on cell functions regulated by changes in membrane phospholipid asymmetry

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

細胞は様々な膜系から成り立っており、脂質はその必須な構成要素である。膜脂質の分布や輸送の異常は種々の病態を引き起こすが、その詳細には不明な点が多い。本研究では、生体膜の脂質二重層において脂質の非対称性を制御するリン脂質フリッパーゼの機能について解析を行い、脂質非対称性の変化がタンパク質輸送や輸送小胞の形成を制御することを明らかにした。

また、脂質非対称形成に関与する新規遺伝子についても検索を行った。

研究成果の概要（英文）：

Lipids are essential components of cell membranes. Abnormal distribution or transport of lipids is related to diseases, but much remains to be learned. In this study, we focus on phospholipid flippases, which transport phospholipids to the cytoplasmic leaflet of membranes, and have shown that flippases are involved in protein sorting and vesicle formation. We have also identified new genes that regulate phospholipid asymmetry of intracellular membranes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

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：生体膜・脂質の非対称性・フリッパーゼ・細胞内小胞輸送・酵母

1. 研究開始当初の背景

脂質は、細胞を構成する生体膜の構成成分として必須な役割を果たしている。従来、脂質の機能として、細胞の外側と内側を隔てる境界としての構造的な役割が考えられてきたが、近年、脂質が様々な細胞において機能発現やその制御に非常に重要な役割を果た

していることが明らかにされつつあり、大きな注目を集めている。また、脂質のこれらの機能の異常が種々の病態に関与していることも明らかにされつつある。生体膜は脂質の二重層から成るが、その二重層間における脂質分子種の分布は均一ではなく、非対称であることが古くから知られていた。この脂質の

非対称性の維持や変化が制御する細胞機能については、多くが明らかにされておらず、今後解明して行く必要がある。この脂質非対称性を形成するタンパク質のうち、P型ATPアーゼに属するリン脂質トランスロケースは、フリッパーゼとも呼ばれ、脂質を脂質二重層の細胞質側層へ輸送するが、その細胞機能が注目されている。また、細胞膜に加えて、小胞体やゴルジ体、エンドソーム、ミトコンドリア等の内膜系において、脂質の非対称性がどのようなタンパク質によりどのように制御されているのか、今後明らかにして行く必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、脂質非対称性の生理機能について、脂質非対称性形成に関わるフリッパーゼの遺伝子機能を解析することにより明らかにしようとするものである。また、脂質非対称性形成の新しい制御機構について明らかにするために、変異株の単離とそれらの解析を進める。

- (1) フリッパーゼの新しい細胞機能の解析——フリッパーゼ変異体の解析を通して、フリッパーゼの新しい細胞機能を明らかにする。
- (2) フリッパーゼによる輸送小胞形成の制御機構——筆者らは、フリッパーゼによる脂質の脂質二重層間輸送が、初期エンドソームからの輸送小胞の形成に働いていることをこれまでの研究で明らかにしており、この分子機構を解明する。
- (3) 脂質非対称性を制御する新規遺伝子の探索——生体内にはフリッパーゼ以外にも脂質非対称性制御に関わる新規の遺伝子が存在する可能性が考えられる。そこで、脂質非対称性を制御する新たな遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

本研究では、真核細胞のモデル系として広く分子生物学領域で用いられる酵母細胞を用いて、フリッパーゼの機能を分子遺伝学的、細胞生物学的、また、生化学的手法を用いて解析する。また、酵母変異体を用いて脂質非対称性形成に関わる新規の遺伝子を網羅的に検索する。

- (1) フリッパーゼの新しい細胞機能の解析——Lem3-Dnf1/2 フリッパーゼの変異体では、トリプトファン輸送体である Tat2 が正常に細胞膜へ輸送されないことが明らかとなった。この異常の原因を細胞内小胞輸送に関わる種々の変異株を用いて解析した。また、Tat2 と膜脂質との相互作用についてリポソームを用いた密度勾配遠心法により解析した。
- (2) フリッパーゼによる輸送小胞形成の制

御機構——筆者らは、F-box を有する Rcy1 タンパク質が、Drs2 フリッパーゼに結合して Drs2 と同様の機能を有することをこれまでの遺伝学的研究により明らかにしている。そこで、Rcy1 がフリッパーゼ Drs2 と相互作用することの機能的な重要性について、Rcy1 と結合しない Drs2 の変異体を取得してその表現型を解析することにより明らかにする。また、フリッパーゼ変異体における初期エンドソームからの小胞輸送欠損を高発現状態で抑圧できる遺伝子を単離して機能解析した。

- (3) 脂質非対称性を制御する新規遺伝子の探索——フォスファチジルセリンに特異的に結合する細胞内プローブである GFP-Lact-C2 を酵母細胞に発現させると、細胞膜だけが染まったことから、内膜系の細胞質側層にはフォスファチジルセリンが存在しないことが示唆された。この内膜系のフォスファチジルセリン非対称性を制御する遺伝子を明らかにするために、酵母遺伝子破壊株シリーズに GFP-Lact-C2 を発現させて、GFP-Lact-C2 が内膜系に局在するようになる変異株を網羅的に検索した。

4. 研究成果

本研究で以下の研究成果を得ることができた。いずれも国内外を含めて新しい研究成果である。

- (1) フリッパーゼの新しい細胞機能の解析——Lem3-Dnf1/2 変異株では、Tat2 がゴルジ体でユビキチン化を受けて液胞へ誤輸送されていた。これは、膜脂質非対称性が異常となったために、Tat2 の N 末端領域が膜脂質と正常に相互作用できないために生じていた。本研究は、脂質非対称性の制御が膜タンパク質のユビキチン化を制御することを示した最初の例である。
- (2) フリッパーゼによる輸送小胞形成の制御機構——Drs2 の、Rcy1 と結合しない変異体を取得して解析したところ、これらは Drs2 の機能の 1 つである初期エンドソームからの小胞輸送に欠損を示した。従って、Rcy1 は Drs2 が輸送小胞を形成する際に重要な役割を担っていると考えられる。また、フリッパーゼ変異体の小胞輸送欠損を高発現状態で抑圧できる遺伝子として Cho1 を単離した。Cho1 はフォスファチジルセリン合成酵素をコードし、Cho1 の高発現によりフォスファチジルセリンの細胞内レベルが上昇する。Drs2 フリッパーゼがフォスファチジルセリンを輸送することは、これまで試験管内で示されているのみであり、本

研究成果はフリッパーゼとフォスファチジルセリンの機能的関係を示すものとして評価される。

- (3) 脂質非対称性を制御する新規遺伝子の探索—スクリーニングの結果、GFP-Lact-C2 が液胞膜に局在する変異株、初期エンドソームに局在する変異株、また、ミトコンドリアに局在する変異株が見出された。これらの遺伝子は、それぞれの膜系でフォスファチジルセリンの非対称性制御に関与しているものと考えられる。今後のこれらの遺伝子の機能解析により、脂質非対称性の新しい制御機構が解明され、その生理機能が明らかになるものと期待される。

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 8 件)

1. Zahra Zendeheboodi, Takaharu Yamamoto, Hiroshi Sakane, and Kazuma Tanaka. Identification of a second amphipathic lipid-packing sensor like motif that contributes to Gcs1p function in the early endosome-to-TGN pathway. *J Biochem.* 153, 573-587, 2013, DOI)10.1093/jb/mvt025., 査読有
 2. Hachiro T, Yamamoto T, Nakano K, Tanaka K. Phospholipid flippases Lem3p-Dnf1p and Lem3p-Dnf2p are involved in the sorting of the tryptophan permease Tat2p in yeast. *J Biol Chem.* 288, 3594-3608, 2013, DOI)10.1074/jbc.M112.416263., 査読有
 3. Aihara Y, Yamamoto T, Okajima K, Yamamoto K, Suzuki T, Tokutomi S, Tanaka K, Nagatani A. 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, 2012, DOI)10.1074/jbc.M111.324723., 査読有
 4. Fujimura-Kamada K, Hirai T, Tanaka K. Essential Role of the NH₂-Terminal Region of Cdc24 Guanine Nucleotide Exchange Factor in Its Initial Polarized Localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 11, 2-15, 2012, DOI)10.1128/EC.05146-11., 査読有
5. Takahashi Y, Fujimura-Kamada K, Kondo S, and Tanaka K. Isolation and characterization of novel mutations in CDC50, the non-catalytic subunit of the Drs2p phospholipid flippase. *J Biochem.* 149, 423-432, 2012, DOI)10.1093/jb/mvq155., 査読有
 6. Kazuma Tanaka, Konomi Fujimura-Kamada and Takaharu Yamamoto. Functions of phospholipid flippases. *J Biochem.* 149, 131-143, 2011, DOI)10.1093/jb/mvq140., 査読有, 総説
 7. 山本 隆晴, 田中 一馬. 出芽酵母の細胞極性形成におけるエンドサイトーシス-リサイクリング経路の役割 アクチンケーブルが形成されない変異株からわかったこと. *化学と生物.* 49, 231-233, 2011, 査読有, 総説
 8. Yamamoto T, Mochida J, Kadota J, Takeda M, Bi E, and Tanaka K. Initial polarized bud growth by endocytic recycling in the absence of actin cable-dependent vesicle transport in yeast. *Mol Biol Cell.* 21, 1237-1252, 2010, DOI)10.1091/mbc.E09-05-0412., 査読有
- [学会発表] (計 17 件)
1. 山神 香菜子, 山本 隆晴, 武田 美代子, 湯田 彬子, 田中 一馬, エンドサイトーシス-リサイクリング経路におけるアレクチン様タンパク質 Art5p と Dnf1/2p リン脂質フリッパーゼとの相互作用, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月16日, マリンメッセ福岡
 2. Konomi Fujimura-Kamada, Yasuhiro Takahashi, Satoshi Kondo, and Kazuma Tanaka, Isolation and characterization of novel mutations in CDC50, the non-catalytic subunit of the Drs2p phospholipid flippase., 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, マリンメッセ福岡
 3. 山本 隆晴, 鎌田 このみ, 花松 久寿, Zahra Zendeheboodi, 武田 美代子, 田中 一馬, 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, 2011 年 8 月 5 日, 札幌医科大学記念ホール
4. 山本 隆晴, 鎌田 このみ, 田中 一馬, 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, 2011 年 6 月 28 日, 北海道大学
 5. 武田 美代子, 山本 隆晴, 田中 一馬, The Role of Phospholipid Asymmetry in Vesicle Transport in the Early Endosome-to-TGN Retrieval Pathway., 第 63 回細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27 日, 北海道大学
 6. Zahra Zendeboodi, Takaharu Yamamoto, Kazuma Tanaka, Functions of the non-catalytic region of Gcs1p in the phospholipid flippase-regulating membrane trafficking pathway. 第 63 回細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27 日, 北海道大学
 7. 鉢呂 健, 山本 隆晴, 田中 一馬, The role of phospholipid asymmetry in the localization of tryptophan permease Tat2p., 第 63 回細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27 日, 北海道大学
 8. 三岡 哲生, 鎌田 このみ, 田中 一馬, 細胞膜ホスファチジルセリン非対称性はどうに形成されるのか?, 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
 9. 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., 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
 10. Takaharu Yamamoto, Takeru Hachiro, Zahra Zendeboodi, Kazuma Tanaka, Roles of phospholipid flippases and their related ArfGAP for protein trafficking., The 27th NAITO CONFERENCE on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I], 2010 年 7 月 2 日, シャトレーゼガトーキングダム札幌
 11. Konomi Fujimura-Kamada, Hisatoshi Hanamatsu, Koji Saito, Eno Shioji, Rosa Suzuki, Kazuma Tanaka, The functional analysis of phospholipid flippase in endocytic recycling., The 27th NAITO CONFERENCE on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I], 2010 年 7 月 2 日, シャトレーゼガトーキングダム札幌
 12. Kazuma Tanaka, Regulation and functional significance of phospholipid asymmetry., The 27th NAITO CONFERENCE on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I]., 2010 年 7 月 1 日, シャトレーゼガトーキングダム札幌
 13. Takaharu Yamamoto, Takeru Hachiro, Zahra Zendeboodi, Kazuma Tanaka, Roles of phospholipid flippases and their related ArfGAP for protein trafficking., Sapporo International Cancer Symposium 2010., 2010 年 6 月 28 日, 北海道大学
 14. Konomi Fujimura-Kamada, Hisatoshi Hanamatsu, Koji Saito, Eno Shioji, Rosa Suzuki, Kazuma Tanaka, The functional analysis of phospholipid flippase in endocytic recycling., Sapporo International Cancer Symposium 2010., 2010 年 6 月 28 日, 北海道大学
 15. 田中 一馬, 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, 2010 年 3 月 30 日, 東京大学
 16. 田中 一馬, フリッパー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合同大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸ポートピアホテル
 17. Kazuma Tanaka, Cellular functions of phospholipid Flippases., The fourth iCeMS International Symposium, 2009 年 5 月 28 日, ホテルフジタ京都
6. 研究組織
(1) 研究代表者
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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし