

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440038

研究課題名(和文) 乱れた脂質非対称の感知および修繕機構

研究課題名(英文) Sensing and mending mechanism of altered lipid asymmetry

研究代表者

小原 圭介(OBARA, Keisuke)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30419858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、私達が細胞膜脂質非対称センサーとして同定したRim21の研究を行い、脂質非対称の感知に直接的に関わるセンサーモチーフを特定した。また、センサーモチーフが、負電荷を有する脂質の幾つかと結合することを明らかにした。その他の結果も併せて、Rim21による脂質非対称センシングのモデルを提唱した。一方で、脂質非対称が乱れた際の細胞応答も研究し、私達が鍵因子として以前に単離したOpt2がリン脂質の細胞膜外層への露出に関わることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we performed a detailed analysis of Rim21 which had been identified by us as the sensor protein for plasma membrane lipid asymmetry. As a result, we succeeded in identifying the sensor motif that directly recognizes the state of lipid asymmetry. We also found that the sensor motif interacts with some of negatively charged lipids. From these and other results, we proposed a model for sensing mechanism of altered lipid asymmetry by Rim21. On the other hand, we also investigated cellular responses to altered lipid asymmetry. We focused on Opt2 which we previously identified as a key molecule in adaptation to altered lipid asymmetry. In consequence, we revealed that Opt2 mediates exposure of phospholipids to the outer leaflet of the plasma membrane.

研究分野：生物学

キーワード：細胞膜 脂質非対称 脂質 センサー 情報伝達 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

細胞膜の脂質二重層では、その内層(細胞質側)と外層(細胞外側)で脂質組成や役割が大きく異なっている。その様な「脂質非対称」は真核生物に保存されており、細胞の生存レベルで必須な基幹プロセスである。ヒトでは脂質非対称の部分的な破綻でさえ様々な疾患を引き起こす。

私達は、その様な脂質非対称の状態変化を感知する「脂質非対称センサーRim21」を同定した。また、脂質非対称が変化した際に、その適応反応で中心的な役割を担う新規因子Opt2を見出した。

研究開始の段階で、Rim21のC末端細胞質領域(Rim21C)が脂質非対称の感知に重要な役割を果たしていることを突き止めていた。しかし、Rim21C内のどの領域が脂質非対称の感知に直接的に関わるか、またその感知機構については不明であった。

脂質非対称変化に対する適応反応では、Opt2がどのようにして適応反応に関わるかは未知であった。

2. 研究の目的

(1) Rim21による脂質非対称センシングの分子機構を解明することを目的とした。具体的には、脂質非対称センシングに直接的に関わる領域(センサーモチーフ)およびRim21Cが相互作用する脂質分子種の特定を目指した。

(2) Opt2が脂質非対称変化に対する適応過程で果たす機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 脂質非対称センサーモチーフを特定するためにRim21に対する変異解析を行った。Rim21C内にセンサーモチーフが存在することを既に突き止めていたこと、またRim21Cには荷電アミノ酸残基クラスターが豊富に存在すること(図1)を鑑み、Rim21C内の荷電アミノ酸残基クラスターに焦点を絞り、荷電アミノ酸残基をアラニンに置換した合計18種の変異体を作製した。Rim21変異タンパク質の機能は、Rim21が発するシグナル伝達経路(Rim101経路)の活性化能で評価した。Rim21C部分のみを切り出してGFPと融合すると、通常は細胞膜に結合し、脂質非対称の変化に応じて細胞膜から解離する様子が観察できる。そこで、注目した変異タンパク質に関しては、その変異を有するRim21C部分とGFPの融合タンパク質の挙動を追跡し、脂質非対称の変化を認識できるか否かを検証した。

(2) Rim21Cの組換えタンパク質を大腸菌で作製した。その組換えタンパク質を各種脂質をスポットしたニトロセルロース膜とインキュベートし、イムノプロットで結合した箇所

を検出した(Lipid overlay解析)。

(3) 脂質非対称が変化した変異体でOPT2をさらに欠損したり、あるいは過剰発現し、細胞膜の脂質非対称がどのように変化するかを調べた。脂質非対称の状態は、主に内層に局在するPEとPSが外層に露出した量で評価した。これらの脂質の外層への露出は、露出したこれらの脂質に結合して毒性を示す薬剤に対する感受性試験やそれら薬剤の蛍光ラベルによる可視化で評価した。また、各株に対して蛍光ラベルしたリン脂質を細胞外から加え、外層に挿入された後に内層へ反転移動する割合をフローサイトメトリーで定量し、Opt2がリン脂質の二重層間反転移動に関与するか否かを検証した。

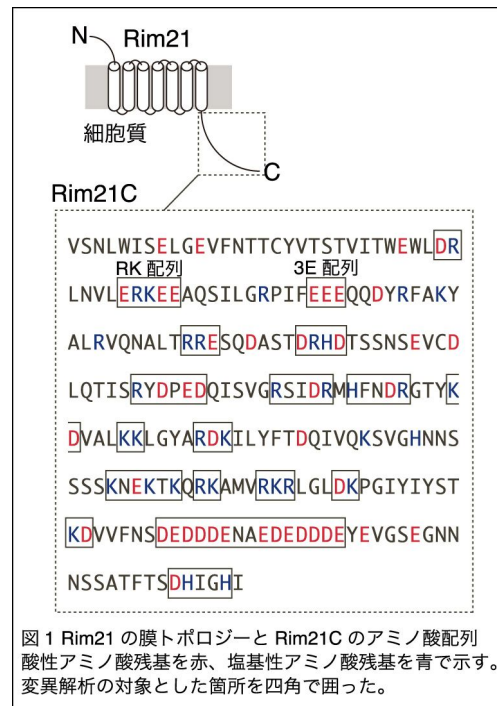


図1 Rim21の膜トポロジーとRim21Cのアミノ酸配列。酸性アミノ酸残基を赤、塩基性アミノ酸残基を青で示す。変異解析の対象とした箇所を四角で囲った。

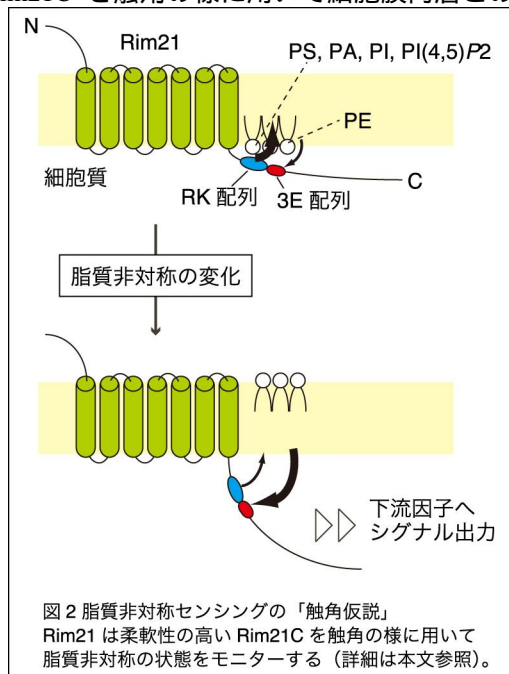
4. 研究成果

(1) Rim21Cの荷電アミノ酸残基に対する変異解析の結果、Rim21Cの前半部にある連続した3つのグルタミン酸残基(3E配列)(図1)をアラニンに置換したRim21変異タンパク質(3E変異体)は機能を完全に失っていた。3E配列が関わる素過程を調べたところ、3E配列はRim21の細胞膜への局在および他の因子とのセンサー複合体の形成には必須ではなかった。一方、3E変異体由来のRim21Cは、脂質非対称の変化に応じて細胞膜からの解離が出来なくなっていた。この結果は3E変異体が脂質非対称の変化を感知できなくなっていること、すなわち3E配列が脂質非対称の感知に直接的に関わることを物語っている。また、この結果から3E配列がRim21Cの細胞膜からの解離に必要な反発力を生み出していることが明らかになった。そこで3E配列の近傍を重点的に調べたところ、その近傍にあるERK**EE**という荷電残基クラスター、

特にその中でも正電荷を有する RK 配列 (図 1) が、3E 配列とは逆に細胞膜への親和性を生み出していることが判明した。すなわち、RK 配列による細胞膜への結合力と 3E 配列による反発力という二つのクラスター間の拮抗作用のバランスによって脂質非対称センシングが為されている様子が浮き彫りになった。この二つのクラスターを含む領域を脂質非対称センサーモチーフと定義した。

(2) Rim21C の組換えタンパク質と各種脂質による Lipid overlay 解析により、Rim21C が PS, PA, PI, PI(4,5)P2 といった負電荷を有する脂質と結合することが明らかになった。これは正電荷を有する RK 配列が細胞膜への親和性を生み出す、という (1) の結果と良く一致する。その一方で、PI(3)P, PI(4)P, PHS1P などの負に荷電した脂質には結合しなかったことから、負に荷電した脂質の中でもある程度の選択性がある様だ。PE は負電荷を有していないが、そのほとんどが内層に局在しているため、その効果を調べた。すると、先の結合した脂質に PE を混在させるだけで、Rim21C の結合が大幅に増大した。これは、プロトン受容可能なアミノ基を有する PE の共存によって、負に荷電した脂質の脱プロトン化が促進し、負電荷が強まったためだと推測される。特筆すべきは、Rim21C が結合した 4 種の脂質およびその効果を増強した PE は細胞膜ではほとんどが内層側に存在するという点である。すなわち、Rim21C は実際の細胞内でもこれらの脂質と接触するトポロジー関係にあり、細胞内でもこの様な相互作用が起こっていても不思議ではない。

(3) ここまでの結果をまとめ、以下の様に脂質非対称センシングにおける「触角仮説」を提唱した (図 2)。Rim21 は柔軟性の高い Rim21C を触角の様に用いて細胞膜内層との



相互作用を繰り返しながら脂質非対称の状態をモニターしている。正電荷を有する RK 配列と負に荷電した脂質との相互作用は、Rim21C と細胞膜の親和性を生み出し、近傍に存在する PE がその効果を増強している。一方、その直後にある 3E 配列は反発力を生み出す。通常は、この拮抗作用のうち親和性が優勢となり、Rim21C は細胞膜に結合している。脂質非対称が変化し、負に荷電した脂質あるいは PE が細胞膜内層から減少すると、3E 配列による反発力が優勢となり、Rim21C は細胞膜から解離する。すると、下流因子が認識してシグナルが出力される。

(4) 乱れた脂質非対称に対する適応反応で中心的な役割を果たす Opt2 の機能解析を行った。脂質非対称が乱れ、通常は内層に存在する PE や PS が外層に露出してしまう変異体 (*lem3Δ*) は、外層に露出したこれらの脂質に結合して毒性を示す薬剤 (それぞれ duramycin, papuamide B) に高感受性となることが知られている。しかし、OPT2 をさらに欠損すると、これらの薬剤に対する感受性が抑圧され、耐性となった。そこに OPT2 遺伝子を入れ戻すと再び高感受性となった。外層に露出した PE は、PE に特異的に結合するペプチド (Ro-peptide) の蛍光標識によって可視化できる。そこで、これらの株で調べたところ、*lem3Δ* 株で見られた PE の外層への露出が *lem3Δ opt2Δ* 二重欠損株では見られなくなり、そこに OPT2 遺伝子を入れ戻すと再び見られるようになった。これらの結果は、Opt2 が PE や PS の外層への露出に関わっていることを示している。さらに、蛍光ラベルしたリン脂質を細胞膜外層に取り込ませ、内層への反転移動に依存した取り込み量を測定した。すると、Opt2 を過剰発現した株では取り込み量が減少した。この結果は、Opt2 が内層から外層への反転運動に関わり、その拮抗作用により正味の取り込み量が減少したためであると考えられる。これら全ての結果を合わせると、Opt2 がリン脂質の外層への反転移動に直接的あるいは間接的に関与し、その機能によって乱れた脂質非対称の修繕に寄与していることが強く示唆された。Opt2 は既知の脂質反転酵素とは同源性を有しておらず、もし直接的な関与であれば、全く新しいタイプの脂質反転酵素の発見となる。

(5) 上述の様に Opt2 は乱れた脂質非対称に対する細胞応答で、リン脂質の外層への反転移動を促進することで中心的な役割を担うことが示唆された。さらに、私達は以下の様に、通常時における Opt2 の機能を示唆する結果を得た。OPT2 を欠損した酵母細胞は、野生型細胞に比べてより球形に近かった (長軸と短軸の比が 1 に近い)。酵母細胞は、出芽の先端部で極性成長 (先端成長) を起こした後に等方成長へと切り替わるため、球形ではなく卵形になる。先端成長を引き起こすに

は、成長部で PE が外層に露出する必要があるため、PE の外層への露出が滞ると先端成長が起こりにくくなり、細胞はより球形になると予想される。しかし、既知の脂質反転酵素の欠損株の中で、より球形に近い形状を示すものは存在せず、先端成長を引き起こす脂質反転酵素は長らくブラックボックスであった。私達の結果は Opt2 が先端部での PE の反転移動に関与する可能性を示すものである。

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 6 件)

Nishino K, Obara K, and Kihara A (2016) The C-terminal cytosolic region of Rim21 senses alterations in plasma membrane lipid composition: Insights into sensing mechanisms for plasma membrane lipid asymmetry. *J Biol Chem*, 290: 30797-30805, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M115.674382.

Yamauchi S, Obara K, Uchibori K, Kamimura A, Azumi K, and Kihara A (2015) Opt2 mediates the exposure of phospholipids during cellular adaptation to altered lipid asymmetry. *J Cell Sci*, 128: 61-69, 査読有, DOI: 10.1242/jcs.153890.

Obara K and Kihara A (2014) Signaling events of the Rim101 pathway occur at the plasma membrane in a ubiquitination-dependent manner. *Mol Cell Biol*, 34: 3525-3534, 査読有, DOI: 10.1128/MCB.00408-14.

Cheng J, Fujita A, Yamamoto H, Tatematsu T, Kakuta S, Obara K, Ohsumi Y, and Fujimoto T. (2014) Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. *Nat Commun*, 5: Article No 3207, 査読有, DOI: 10.1038/ncomms4207

Yamagata M, Obara K, and Kihara A (2013) Unperverted synthesis of complex sphingolipids is essential for cell survival under nitrogen starvation. *Genes Cells*, 18: 650-659, 査読有, DOI: 10.1111/gtc.12062.

Obara K, Kojima R, and Kihara A (2013) Effects on vesicular transport pathways at the late endosome in cells with limited very long-chain fatty acids. *J Lipid Res*, 54: 831-842, 査読有, DOI: 10.1194/jlr.M034678.

[学会発表](計 9 件)

小原圭介、木原章雄

脂質非対称センサーRim21 は ER ストレスを感知して適応反応に寄与する
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1-4 日、「神戸コンベンションセンター(兵庫・神戸)」

西野佳菜子、小原圭介、木原章雄

Rim21 は細胞質領域の荷電アミノ酸残基を用いて細胞膜の脂質非対称を感知する
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1-4 日、「神戸コンベンションセンター(兵庫・神戸)」

Obara K, Nishino K and Kihara A

Mechanism for sensing lipid asymmetry of the plasma membrane and external alkalization. 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB), 2015 September 6-12, 「Levico Terme (Italy)」

小原圭介、西野佳菜子、木原章雄

ユビキチンと ESCRT 複合体による細胞膜脂質非対称および外界アルカリ化シグナルの伝達
第 67 回日本細胞生物学会大会、2015 年 6 月 30-7 月 2 日「タワーホール船堀(東京都江戸川区)」

Obara K, Nishino K and Kihara A

Rim21 senses alteration in plasma membrane lipid asymmetry and elicits the signal at the plasma membrane in a ubiquitination-dependent manner. The FEBS EMBO 2014 conference, 2014, August 30- September 4, 「Paris (France)」

小原圭介、山内佐織、木原章雄

リン脂質のフロップに関わる新規因子 Opt2 の発見
第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 11-13 日、「奈良新公会堂(奈良・奈良)」

小原圭介、木原章雄

ユビキチン化が脂質非対称および外界アルカリ化シグナルを細胞膜上で媒介する
第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、「神戸コンベンションセンター(兵庫・神戸)」

山内佐織、小原圭介、木原章雄

リン脂質のフロップに関与する新規酵母因子 Opt2 の単離・解析
第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11-13 日、「パシフィコ横浜(神奈川・横浜)」

小原圭介、山本林、木原章雄

細胞膜脂質非対称センサーの同定

第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 18-21 日、「ウイנקあいち（愛知・名古屋）」

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し