

平成22年5月11日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18370074

研究課題名（和文） 膜脂質非対称性が制御する細胞内小胞輸送と細胞極性

研究課題名（英文） Regulation of membrane trafficking and cell polarity by changes in 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：

細胞は、細胞膜をはじめ、様々な生体膜から成り立っており、脂質は生体膜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ことが示唆されているが、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輸送体（フリッパー）の機能について解析を行い、脂質非対称性の変化が細胞の極性形成や輸送小胞の形成を制御していることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：細胞極性・細胞骨格・細胞膜・脂質の非対称性・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、脂質の機能としては、細胞の外側と内側を隔てる障壁としての構造的な役割が考えられてきたが、近年、脂質は様々な細胞の機能発現や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。脂質の合成のみならず、脂質の輸送や存在状態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。その中でも、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、ほとんどが明らかにされておらず、今後解明して行く必要があ

った。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。この脂質非対称性を形成するタンパク質としていくつかの候補が考えられていたが、その中でも、P型ATPアーゼに属するリン脂質トランスロケースは、フリッパーースとも呼ばれ、脂質の細胞外側層から細胞内側層への輸送を促進する可能性が示唆され、その細胞機能が注目されていた。筆者らは、先行研究においてこのフリッパーースが2種類の異なるサブユニットから成ることを報告していたが、研究開始当初、フリッパーースの機能については多くが不明の状態であった。

2. 研究の目的

本研究は、その重要性がこれまでに示唆されながら、機能が不明であった脂質の非対称性について、脂質非対称性形成への関与が強く示唆されるフリッパーースの遺伝子変異株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。特に、細胞膜との機能的関連が強く示唆される細胞の極性形成と、輸送小胞の形成機構におけるフリッパーースの役割に焦点を当てて解析を進める。

- (1) フリッパーースによる細胞極性形成の制御機構——本来細胞は非対称な構造をしており、これは細胞の極性と呼ばれる。細胞の極性は膜上で形成されることから、膜脂質の関与が示唆される。そこで、フリッパーースの変異株を解析することにより、脂質非対称性の変化が細胞極性形成の制御に果たす役割を明らかにする。
- (2) フリッパーースによる輸送小胞形成の制御機構——フリッパーースによる脂質の脂質二重層間における輸送は、細胞内輸送小胞の形成に働いている可能性が考え

られる。Drs2フリッパーースがクラスリン輸送小胞の形成に関与することがGrahamらにより報告されていたが、詳細は不明である。フリッパーースの変異株を解析することにより、フリッパーースがどの小胞輸送経路で働いているのかを明らかにする。

- (3) フリッパーースを制御する機構の解明——フリッパーースの機能が明らかになるにつれ、その制御機構の解明も重要性を増してきている。フリッパーースがどのようなメカニズムで制御されているのかについて解析を進める。
- (4) 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ース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、遺伝学的手法を用いて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、フリッパーース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。

- (1) フリッパーースによる細胞極性形成の制御機構——フリッパーースの変異株を種々作製し、細胞極性形成過程に異常がないか詳細に解析する。酵母細胞では出芽形成時に細胞極性が形成されるので、この過程に注目して解析を行う。極性形成に重要な働きを果たす制御因子の局在異常についても検討する。
- (2) フリッパーースによる輸送小胞形成の制御機構——フリッパーース変異株において、生体内の様々な輸送小胞形成経路のうち、どの経路が異常となっているのかを

解析する。この解析では、電子顕微鏡を用いた膜構造の詳細な検討も行う。

- (3) フリッペースを制御する機構の解明—フリッペースの変異体と遺伝学的に相互作用する遺伝子を検索し、その中からフリッペースの制御に関わる遺伝子を見いだすことを試みる。
- (4) 脂質非対称性を制御する新規遺伝子の探索—フリッペースの変異と遺伝学的に相互作用する遺伝子や、脂質特異的に作用する薬剤に耐性となる変異株を単離する等することにより、脂質非対称性の制御に関わる新規の遺伝子を単離してその機能を解析する。

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。(1)、(2)、(3)、については、国際的に評価の高い学術誌に発表することができた。(4)については、引き続き解析を進めている。

- (1) フリッペースによる細胞極性形成の制御機構—Lem3-Dnf1/2 フリッペースの変異株が、極性形成制御因子の極性部位への持続的な局在により、過剰な極性成長を示すことを明らかにした。これは、脂質の非対称性変化が細胞極性形成を制御することを始めて示したものである。今後は他の生物の極性形成でも同様の機構が働いているのかについて解明されることが期待される。
- (2) フリッペースによる輸送小胞形成の制御機構—フリッペース変異株において、初期エンドソームからの輸送小胞の形成が阻害されていることを明らかにした。フリッペースが関与する主要な輸送経路を詳細に解析したものとしては最初の報告である。今後は、フリッペース

による脂質輸送がどのように小胞形成に働くのか、その分子機構を解明する必要がある。

- (3) フリッペースを制御する機構の解明—Lem3-Dnf1/2 フリッペースをリン酸化して活性化する新規のタンパク質リン酸化酵素としてFpk1とFpk2を見いだした。今後は、Fpk1とFpk2が上流よりどのようなシグナルを受け取ってフリッペースを制御するのか解明する必要がある。
- (4) 脂質非対称性を制御する新規遺伝子の探索—脂質の非対称性制御に関わる可能性が考えられる遺伝子を複数種類単離することに成功している。これらはいずれも機能不明の膜タンパク質であり、何からの作用機序で脂質の輸送や分布の制御に関与している可能性が高いと考えられる。今後はこれらのタンパク質の作用機構を解明することで、新しい脂質非対称性の制御機構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6件)

- (1) Nakano K, Yamamoto T, Kishimoto T, Noji T, Tanaka K.
Protein kinases Fpk1p and Fpk2p are novel regulators of phospholipid asymmetry.
Mol. Biol. Cell, 19, 1783-1797, 2008,
査読有
- (2) Saito K, Fujimura-Kamada K, Hanamatsu H, Kato U, Umeda M, Kozminski KG, Tanaka K.
Transbilayer phospholipid flipping regulates Cdc42p signaling during

- polarized cell growth via Rga GTPase-activating proteins.
Dev. Cell, 13, 743-751, 2007, 査読有
- (3) Furuta N, Fujimura-Kamada K, Saito K, Yamamoto T, Tanaka K.
Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway.
Mol. Biol. Cell, 18, 295-312, 2007, 査読有
- (4) Yoshiuchi S, Yamamoto T, Sakane H, Kadota J, Mochida J, Asaka M, Tanaka K.
Identification of novel mutations in ACT1 and SLA2 that suppress the actin cable-overproducing phenotype caused by overexpression of a dominant active form of Bn1p in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics, 173, 527-539, 2006, 査読有
- (5) Noji T, Yamamoto T, Saito K, Fujimura-Kamada K, Kondo S, Tanaka K.
Mutational analysis of the Lem3p-Dnflp putative phospholipid-translocating P-type ATPase reveals novel regulatory roles for Lem3p and a carboxyl-terminal region of Dnflp independent of the phospholipid-translocating activity of Dnflp in yeast.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 344, 323-331, 2006, 査読有
- (6) Sakane H, Yamamoto T, Tanaka K.
The functional relationship between the Cdc50p-Drs2p putative aminophospholipid translocase and the Arf GAP Gcs1p in vesicle formation in

the retrieval pathway from yeast early endosomes to the TGN.

Cell Struct. Funct., 31, 87-108, 2006, 査読有

[学会発表] (計2件)

- (1) 田中 一馬, 脂質の膜脂質二重層間輸送が制御する細胞機能, BMB2008, 2008年12月10日, 神戸ポートアイランド
- (2) 田中 一馬, Roles of flippases in the endocytic recycling pathway in yeast, Flippases 2008, November 6, 2008, Centro Stefano Franscini, Monte Verita Ascona, Switzerland

[図書] (計2件)

- (1) 大隅良典、シュプリンガー・ジャパン株式会社、酵母のすべて 系統、細胞から分子まで2007、8章8 出芽における細胞極性形成
- (2) 北海道大学COE研究成果編集委員会、北海道大学出版会、バイオとナノの融合 I 新生命科学の基礎、2007、第15章 細胞の膜リン脂質非対称性の役割

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

鎌田 このみ (KAMADA KONOMI)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：80312354

山本 隆晴 (YAMAMOTO TAKAHARU)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号：80312346