

機関番号：31305

研究種目：若手(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770148

研究課題名(和文) 出芽酵母におけるスフィンゴ糖脂質の意義を探る

研究課題名(英文) The roles of glycosphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

上村 聡志 (UEMURA SATOSHI)

東北薬科大学薬学部・助教

研究者番号：10399975

研究成果の概要(和文): 本研究では, 出芽酵母におけるスフィンゴ糖脂質(GSL)の意義を明らかにするために, GSL 組成を改変した酵母に蛍光タンパク質(enhanced green fluorescent protein, EGFP)を融合した細胞膜タンパク質, Hxt1-EGFP を発現させ, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 解析を行った. FRAP 解析とは, 特定の蛍光領域に強い励起光を照射することで, 蛍光を不可逆的に退色させた後, その周辺部からの蛍光の流入を観察し, 蛍光分子の動く速度及び割合を求める実験である. この解析により, スフィンゴ糖脂質の糖鎖部分の伸長と脂質部分への水酸化(特にスフィンゴイド塩基の 4 位)の両方が欠失した変異体 (*Δsur2Δcsg1Δcsh1* 変異体)において, Hxt1-EGFP の動く分子の割合と速度を著しく低下させることを明らかになった. つまり, この結果は, スフィンゴ糖脂質の糖鎖部分と水酸基部分が, 細胞膜タンパク質の側方拡散の維持に必須であることを示している.

研究成果の概要(英文): In this study, to clarify the involvement of glycosphingolipid (GSL) in dynamics of plasma membrane proteins, a series of mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in GSLs biosynthesis was analyzed by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). FRAP is a technique to study protein mobility in living cells by measuring the rate of fluorescence recovery at a bleached region. By this analysis, I found that the mobile fraction of Hxt1-EGFP in *Δsur2Δcsg1Δcsh1* mutant remarkably decreased. Moreover, the diffusion time of Hxt1-EGFP in the mutant was slow. These results indicate that both the extension of glycan moieties of GSL and the hydroxylation of C4-sphingoid long chain base are necessary to maintain the rate of lateral diffusion of Hxt1-EGFP at the plasma membrane.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野: 生物学

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

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質(GSL)合成異常は様々

な病態(最近では2型糖尿病)を引き起こすことが多くの研究から示唆されており, その

機能に注目が集まっている。これまでに、哺乳類の GSL の機能に関して、数多くの研究成果が報告されているが、多様な分子種で構成されているため、その本質的な機能に関しては不明な点が多い。一方で、出芽酵母の GSL 研究は、GSL の糖鎖部分が、哺乳類のそれとは異なるため、精力的に研究が進められてきたとは言えない。しかしながら、機能的な側面から考えた場合、出芽酵母の GSL もまた環境変化への適応や細胞外ストレスからの防御に必要であり、本質的に、動物細胞の GSL と同様の機能を有していると考えられる。つまり、哺乳類と比較して、GSL の分子種が少ない出芽酵母は、その機能を検証する上で非常に有用なモデル生物となりうる。

## 2. 研究の目的

出芽酵母における GSL の存在意義を明らかにするため、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 解析により、GSL 組成の改変が細胞膜に存在するタンパク質の側方拡散に与える影響を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 出芽酵母 (KA31-1A 株) を用いて、GSL 改変酵母 (*Acsg1Δcsh1*, *Acsg2*, *Asur2*, *Ascs7*, *Δsur2Δscs7*, *Δsur2Δcsg1Δcsh1*, *Δsur2Δcsg2*, *Δscs7Δcsg1Δcsh1*, *Δscs7Δcsg2* 変異体) の作製。

(2) アミノ酸透過酵素である Tat1, グルコーストランスポーターである Hxt1, 細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase である Pma1 の C 末端側に EGFP を融合させたタンパク質 (Tat1-EGFP, Hxt1-EGFP, Pma1-EGFP) を野生株 (KA31-1A 及び BY4741 株), *erg2* 変異体, 及び各種 GSL 改変酵母に発現させた。

(3) (2)の酵母を用いて FRAP 解析を行い、得られた蛍光回復曲線を用いて、2 成分及び 1 成分のフィッティング解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 野生型酵母における Tat1-EGFP, Hxt1-EGFP, Pma1-EGFP の動態解析

最初に、3 種類の細胞膜タンパク質である Tat1, Hxt1, Pma1 の C 末端側に EGFP を融合させた Tat1-EGFP, Hxt1-EGFP, Pma1-EGFP を野生型酵母 (KA31-1A) に発現させ、FRAP 解析の実験系を構築した。これらの細胞膜タンパク質は、GSL とエルゴステロールが細胞膜で形成する脂質マイクロドメインに局在することが知られている。図 1A のように白矢印部分をブリーチし、10 分間、その部分の蛍光回復を観察した。各タンパク質について 80~100 回、蛍光回復を観察し、その平均値をグラフにしたのが図 1B である。これら回復

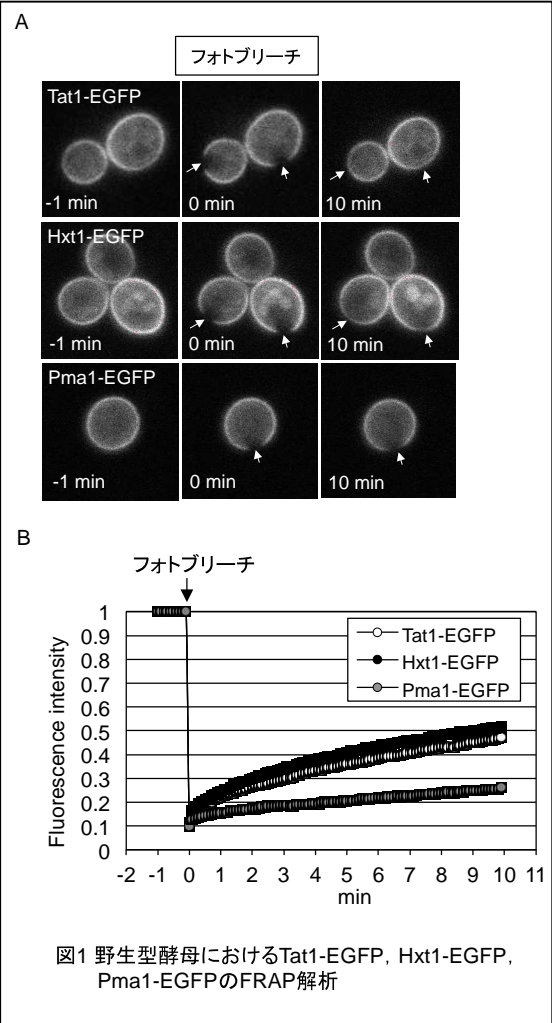


図1 野生型酵母におけるTat1-EGFP, Hxt1-EGFP, Pma1-EGFPのFRAP解析

曲線を、2 成分のフィッティング式 ( $y=A_1(1-\exp(-t_1x))+A_2(1-\exp(-t_2x))+y_0$ ) にフィッティングさせ、動く分子の割合 (Mf) と動く分子の速度 ( $t_{1/2}$ ) を求めた (表 1)。2 成分のフィッティング式は、細胞膜は不均一であり、細胞膜で動いている分子には、動きの速い成分 (Fast) と遅い成分 (Slow) が存在すると仮定したものである。その結果、3 者の Mf 値は同程度であったが、Tat1-EGFP と Hxt1-EGFP の  $t_{1/2}$  の値は類似しているのに対し、Pma1-EGFP の Fast 及び Slow の  $t_{1/2}$  は大きな値を示した。つまり、細胞膜上における Pma1-EGFP の動きが、Tat1-EGFP や Hxt1-EGFP よりも遅いことを示している。この原因については不明であるが、タンパク質によって、細胞膜での側方拡散の速度が異なることが示された。

表 1 野生型におけるフィッティング解析

	$t_{1/2}$ (min)		Mf (%)
	Fast	Slow	
Tat1-EGFP	0.17 ± 0.03	5.09 ± 1.00	58.87 ± 0.27
Hxt1-EGFP	0.13 ± 0.03	4.74 ± 0.69	56.00 ± 4.85
Pma1-EGFP	0.31 ± 0.27	18.32 ± 2.19	57.11 ± 10.72

(2) *Aerg2* 変異体における Hxt1-EGFP の動態解析

次に、*Aerg2* 変異体に Hxt1-EGFP を発現させ、FRAP 解析及びフィッティング解析を行った。*Aerg2* 変異体は、脂質マイクロドメインを形成する分子の一つであるエルゴステロールを合成する経路で働く遺伝子であり、この変異により、異常な構造のエルゴステロールが蓄積する。過去の報告において、*Aerg2* 変異体の細胞膜の流動性が増加することが示されていたので、その変化が FRAP 解析ではどのような変化として現れるかを調べた (図 2, 表 2)。その結果、野生型と *Aerg2* 変異体において、Hxt1-EGFP の Mf と  $t_{1/2}$  の値に大きな差は見られなかった。この結果は、エルゴステロールの構造異常による膜の流動性の変化は、タンパク質の流動性には影響を与えていない可能性を示唆している。

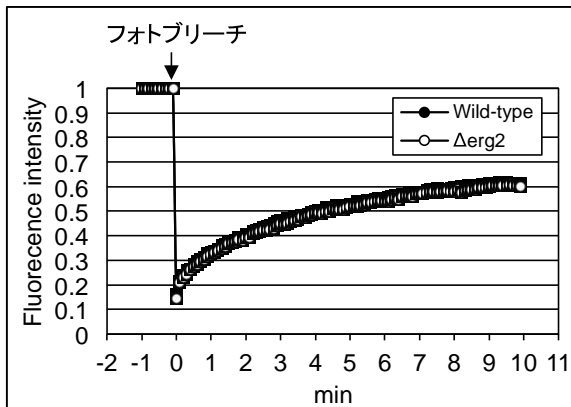


図2 *Aerg2* 変異体における Hxt1-EGFP の FRAP 解析

表 2 *erg2* 変異体における Hxt1-EGFP のフィッティング解析

	$t_{1/2}$ (min)		Mf (%)
	Fast	Slow	
野生型 (BY4741 株)	0.13 ± 0.06	3.12 ± 0.88	58.41 ± 4.70
<i>Aerg2</i>	0.12 ± 0.02	3.17 ± 1.24	59.58 ± 4.43

(3) 各種 GSL 改変酵母における Hxt1-EGFP の動態解析

次に、各種 GSL 改変酵母に Hxt1-EGFP を発現させ、FRAP 解析及びフィッティング解析を行った (図 3, 表 3)。その結果、特に顕著な変化が見られたのは、*Asur2Acs2* 変異体及び *Asur2Acs1Acs1* 変異体であった。*Asur2Acs1Acs1* 変異体はスフィンゴイド塩基の 4 位の水酸化が起こらないのに加えて、MIPC 合成が完全に停止しているため、GSL としては、IPC-A と IPC-B のみが存在する。一方で、*Asur2Acs2* 変異体は水酸基の欠失に

関しては同じであるが、MIPC 合成は完全に停止しているわけではないので、IPC-A と IPC-B のみだけでなく、 $M(IP)_2C-A$ 、 $M(IP)_2C-B$ 、 $M(IP)_2C-A$ 、 $M(IP)_2C-B$  も少量存在する。これらの変異体から得られた蛍光回復曲線は、2 成分のフィッティング式よりも 1 成分のフィッティング式に従い、Mf の値が著しく低下した。この結果は、両変異体における Hxt1-EGFP の動いている分子の割合がわずかになり、速く動く分子が消失していることを示唆している。さらに、*Asur2Acs1Acs1* 変異体では、 $t_{1/2}$  の値が、野生型の遅い分子の  $t_{1/2}$  よりも大きいため、動いている分子の速度もさらに低下していることが示唆される。*Asur2Acs2* 変異体において、このような変化は見られていない理由は不明であるが、少量合成される  $M(IP)_2C-A$ 、 $M(IP)_2C-B$ 、 $M(IP)_2C-A$ 、 $M(IP)_2C-B$  が影響している可能性が考えられる。

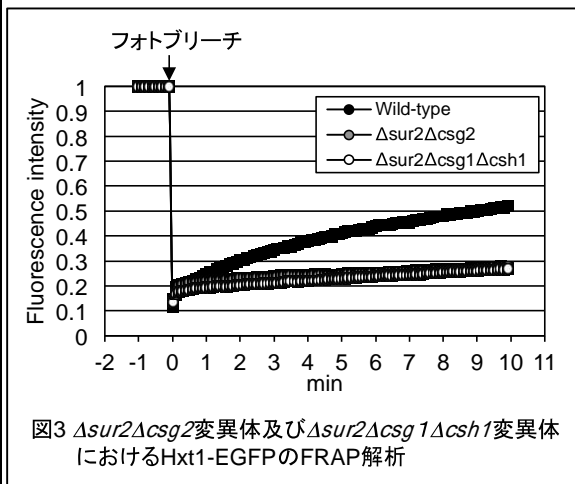


図3 *Asur2Acs2* 変異体及び *Asur2Acs1Acs1* 変異体における Hxt1-EGFP の FRAP 解析

表 3 各種変異体における Hxt1-EGFP のフィッティング解析

	$t_{1/2}$ (min)		Mf (%)
	Fast	Slow	
野生型 (KA31-1A 株)	0.13 ± 0.03	4.74 ± 0.69	55.99 ± 4.83
<i>Acs2</i>	0.14 ± 0.07	5.39 ± 1.26	59.04 ± 4.08
<i>Acs1Acs1</i>	0.20 ± 0.10	5.21 ± 1.63	63.85 ± 4.50
<i>Asur2</i>	0.08 ± 0.02	8.67 ± 0.85	48.03 ± 6.26
<i>Acs7</i>	0.06 ± 0.02	6.04 ± 0.79	59.87 ± 5.01
<i>Asur2Acs7</i>	0.07 ± 0.02	7.49 ± 0.90	65.55 ± 4.87
<i>Asur2Acs2</i>	4.11 ± 0.97		11.11 ± 1.60
<i>Asur2Acs1Acs1</i>	7.54 ± 1.45		17.42 ± 3.72
<i>Acs7Acs2</i>	0.07 ± 0.03	5.60 ± 1.16	40.42 ± 5.19
<i>Acs7Acs1Acs1</i>	0.07 ± 0.02	6.55 ± 1.19	48.32 ± 3.77

このように、出芽酵母において、GSL の糖鎖

伸長と水酸基の欠失が細胞膜タンパク質の流動性に影響を与えるという結果は非常に興味深く、GSLの根本的な重要性を明らかにするためのモデル生物として、出芽酵母が有用であることを示している。今後は、*in vitro*のリポソーム再構成系でも同様の変化が得られることを明らかにするとともに、タンパク質の流動性の変化が、タンパク質の機能にどのような影響を与えるかを調べるのが重要だと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

上村聡志, 出芽酵母において複合型スフィンゴ脂質組成変化が細胞膜タンパク質の側方拡散を低下させる, 第33回日本分子生物学会年会 第86回に本生物化学会大会 合同大会, 2010年12月9日, 神戸ポートピアランド(神戸)

上村聡志, Phyto-type glycosphingolipids participate in the regulation of the lateral diffusion of plasma membrane proteins, The 27th NAITO CONFERENCE ON Membrane Dynamics and Lipid Biology[ I ], 2010年6月30日, シャトレゼ ガトーキングダム サッポロ(札幌)

上村聡志, スフィンゴ糖脂質合成酵素の細胞内トラフィック制御機構, 東北糖鎖研究会, 2009年11月20日, 長岡技術科学大学(新潟)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村 聡志 (UEMURA SATOSHI)

東北薬科大学薬学部・助教

研究者番号: 10399975

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: