

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06076

研究課題名(和文)細胞膜ステロールの維持に関わる因子の機能解明と新たな因子の探索

研究課題名(英文)Elucidation of the functions of factors involved in the maintenance of plasma membrane sterols and search for novel factors

研究代表者

岸本 拓磨(Kishimoto, Takuma)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任講師

研究者番号：70585158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の細胞膜ではステロールが高濃度に維持されるが、その機構は完全に解明されていない。研究代表者は脂質膜のステロール活性化と呼ばれる物理状態に注目し、出芽酵母のエルゴステロール(Erg)活性化を可視化するプローブを開発した。このプローブを用いて細胞膜Ergの制御機構の解明を試みた。遺伝学的解析から表層小胞体でErg輸送に関わるLamタンパク質とリン脂質のホスファチジルセリンの合成酵素がErgの活性化に関わる可能性を見出した。これらの変異は合成致死性を示した。条件致死変異株の表現型解析から細胞膜形態の異常とErgの異常蓄積が明らかになり、両者が細胞膜Ergの制御に関わる新たな機能が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物の細胞膜では他のオルガネラ膜に比べてステロールが特異的に濃縮されており、細胞膜のバリア機能等に重要な役割を果たしているが、ステロールがどのようにして細胞膜で高濃度に維持されているのかは不明である。本研究では細胞膜ホスファチジルセリンが、異なるメカニズムであるLamによるステロール輸送と協調的なステロール分布の制御を行っている可能性を明らかにした。そして、両者のシステムの破綻は、ステロール分布と細胞膜機能を大きく損なうことも明らかにしており、両者の機能がステロールの細胞膜ホメオスタシスを維持することに重要であるという新たな可能性を発見した。

研究成果の概要(英文)：Sterols are maintained at high concentrations in eukaryotic plasma membranes, but the mechanism to maintain in the plasma membrane is not fully understood. This research focused on a physical state called sterol activation in lipid membranes and developed a probe to visualize ergosterol (Erg) activation in budding yeast. Using this probe, we attempted to elucidate the regulatory mechanism of plasma membrane Erg. Genetic analysis revealed that the Lam protein, which is involved in Erg transport in the cortical endoplasmic reticulum, and the phosphatidylserine (plasma membrane phospholipid) synthase, may be involved in Erg activation. These mutations were synthetically lethal. Phenotypic analysis of this conditionally lethal mutant revealed abnormal plasma membrane morphology and abnormal accumulation of Erg, suggesting a novel function for both in the regulation of plasma membrane Erg.

研究分野：脂質生物学

キーワード：ステロール 細胞膜 脂質輸送 ホスファチジルセリン 出芽酵母 脂質分布 脂質プローブ

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞膜では他のオルガネラ膜に比べてステロールが特異的に濃縮されており、細胞膜のバリア機能等に重要な役割を果たしている。しかし、ステロールがどのようにして細胞膜で高濃度に維持されているのかは不明である。ステロールは通常、周囲のリン脂質により細胞膜中に包埋されており、膜外の物質との接触が制限されると考えられている。しかし、ステロール濃度の上昇や周囲の膜脂質環境の変化が起こると、その制限が解除され二重膜表面に露出するステロール活性化と呼ばれる物理状態を示す事が明らかになりつつある(図 1A)。ステロール分子の露出は、脂質輸送タンパク質との接触の確率を高め、オルガネラ間のステロール濃度維持に必要な現象であると考えられる。この現象の解析は主に試験管内での人工膜実験により進められてきた。一方、研究代表者は、ステロール結合性毒素 Perfringolysin 0 の結合ドメイン(D4)を用いて、細胞内の活性化ステロールを可視化する手法の確立に携わり、報告を行ってきた。最近、動物細胞の糸状仮足先端で起こるステロール活性化が、低分子量 GTPase Cdc42 を制御するという新たな生理的意義を報告した(Kishimoto T et al., *FASEB J.*, 2020)。この活性化には、ABC タンパク質 ABCA1 によるステロール輸送が重要である事を見出し、この制御因子の発見によりこの現象におけるステロールの重要性の理解がすすんだ。

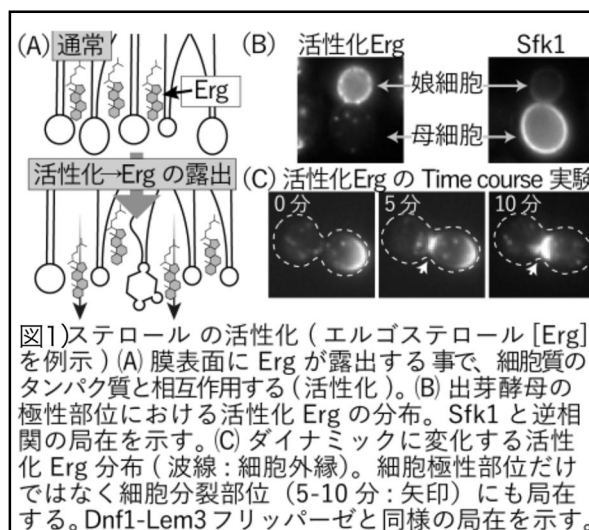


図1)ステロールの活性化(エルゴステロール[Erg]を例示)(A)膜表面にErgが露出する事で、細胞質のタンパク質と相互作用する(活性化)。(B)出芽酵母の極性部位における活性化Ergの分布。Sfk1と逆相関の局在を示す。(C)ダイナミックに変化する活性化Erg分布(波線:細胞外縁)。細胞極性部位だけではなく細胞分裂部位(5-10分:矢印)にも局在する。Dnf1-Lem3フリッパーゼと同様の局在を示す。

細胞膜を構成するリン脂質は非対称に分布している。この分布は、細胞膜外側層から細胞質側層へリン脂質を輸送(フリップ)するフリッパーゼ(4型P-type ATPase)により形成・維持されていると考えられている。研究代表者の所属研究室では、出芽酵母をモデル系にフリッパーゼを中心としたリン脂質非対称性に関する研究を展開している。最近、細胞膜タンパク質 Sfk1 がフリッパーゼとは異なる様式でリン脂質非対称性を制御する可能性を見出している(Mioka et al., *Mol. Biol. Cell.*, 2018)。研究代表者は、エルゴステロール(以下、Erg、動物細胞のコレステロールに相当)の活性化状態を可視化する蛍光タンパク質プローブ(GFPen-D4H)を開発し、Sfk1の機能解析を行った。その結果、Sfk1が母細胞の細胞膜においてErg活性化を抑制し、娘細胞とは異なる活性化状態を形成するという新しい機能を見出した(図1B)。さらに、*sfk1*変異を二種類の細胞膜フリッパーゼの変異*lem3*と*crf1*と組み合わせた三重変異株の細胞膜では、非対称性が破綻しそれがErgの過剰活性化の引き金となり、膜中にErgを保持できなくなる可能性を見出した。これらの結果は、Sfk1とリン脂質の非対称性の両者が、Erg物理状態を制御するという新しい知見として報告した(Kishimoto T et al., *Mol. Biol. Cell.*, 2021)。さらに、研究代表者は活性化Ergの分布が、ダイナミックに変化する事も明らかにした(図1C)。この分布は、細胞膜フリッパーゼ Dnf1-Lem3 複合体の局在と同様の挙動であることから、リン脂質非対称性の関与が裏付けられた。

このように細胞膜の脂質やタンパク質の中には、細胞膜上でのErg物理状態を制御する因子が複数存在する事が予測され、その特定が制御機構の解明に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞膜ステロールの物理状態を制御する機構とその生理的意義の全容解明に向け、出芽酵母実験系でErg活性化に関わる制御因子を明らかにする事を目的に設定した。この目的のために、次の二課題に取り組むことを計画した。

細胞膜脂質の特定 ステロール物理状態を制御する脂質の解析は、脂質組成が単純化された人工膜実験を中心に進んでいる。ところが、細胞内の脂質は、脂質種や分布様式の違いも含め、多様性が高いため、細胞内でどのような脂質が活性化に関わるかを検証した。

Sfk1による制御機構の解明と新たな制御タンパク質の単離 脂質輸送活性を持たないSfk1が、どの

ようにステロールの活性化を抑制するかについて、酵母遺伝学解析をベースに進め、試験管内再構成系を用いて検証するためその確立を目指した。また、他のタンパク質にも、活性化に影響する機能がある事が予測されるため、酵母変異株ライブラリーを用いて関連遺伝子を探索した。

このように研究を進めるにあたり、細胞膜を構成する脂質の多様性とステロールと相互作用を示す膜タンパク質の機能を考慮に入れることで、より詳細な制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

研究1) 脂質変異株による Erg 物理状態制御機構の解析

脂質合成酵素変異株やフリッパーゼを含めた脂質輸送タンパク質変異株における GFPen-D4H の分布を解析した。変化を示す変異株は、細胞膜脂質(リン脂質とスフィンゴ脂質)を生化学実験(TLCなど)で定量解析し、脂質の変化と活性化の挙動に相関があるかを解析した。また、細胞膜に局在するタンパク質は蛍光タンパク質融合体を作成し、GFPen-D4H との局在関係を解析した。

研究2) Erg 物理状態を制御する遺伝子のスクリーニング

データベース解析から予測される約250種類の細胞膜タンパク質の中から、Erg 活性化に関わる遺伝子変異を二段階の過程から特定した。変異株は所属研究室の遺伝子欠損株ライブラリーを用いた。

- (1) 顕微鏡観察下でGFPen-D4Hの分布が変化した遺伝子変異を探索した。
- (2) (1)で得られた候補からステロール結合性薬剤(amphotericin B)とステロール合成阻害薬剤(fluconazole)に対して感受性が変化した遺伝子変異を解析した(結合性感受性は、細胞膜Ergの物理状態の変化による薬剤の近づきやすさに依存する、一方、合成阻害剤での解析からステロール合成に関する影響も評価した)。

*sfk1*単独欠損は、過剰発現とは異なり顕著な表現型を示さないため、Sfk1が他のタンパク質と協調的に機能した事が予測される。そのため、薬剤感受性に変化を示さない単独変異株については、Sfk1との協調的な機能を持つ可能性を考慮に入れて、*sfk1*との二重欠損株を作成して同様のスクリーニングを行う。また、欠損により致死に至る必須遺伝子は、条件致死変異株を用いて(2)から解析した。

研究3) 生化学実験による Sfk1 の Erg 物理状態制御機構の解析

Sfk1 を組み込んだプロテオリソソームを作成し、Erg の物理状態の変化を生化学実験から評価することを計画した。リソソーム膜表面へのステロールの露出量を指標に、Erg 活性化の評価方法を二通りの方法を計画した。

- (1) GFPen-D4H の結合量(SDS-PAGEや顕微鏡下の蛍光シグナル強度で評価した)。
- (2) M CD処理で抽出されたステロールの定量(活性が上がると、膜ステロール抽出活性を持つM CDとの接触が増え、抽出量が増加する)。

研究4) スクリーニングから得られた候補遺伝子の機能解析

候補遺伝子の局在、高発現による変化、脂質量の変化を解析し、Erg 物理状態への影響の解明を目指した。

局在関係の解析 候補タンパク質の蛍光タンパク質融合体を作成し、GFPen-D4H の分布との相関を解析した。局在が一致する場合は活性化の亢進、逆相関の場合は抑制する機能を予測し、この解析を計画した。

候補遺伝子の高発現による効果 高発現 Sfk1 は Erg 活性化を抑制し、GFPen-D4H の分布を制限することから、候補遺伝子の高発現(多コピープラスミド)による GFPen-D4H 分布の変化を解析した。候補遺伝子に機能不全変異(優勢阻害や恒常的活性の変異)の報告がある場合、変異遺伝子の高発現での影響を確認した。変異が活性化に影響する場合は、既知の機能の関わりを期待した。

細胞膜脂質量への影響 脂質量の変化は Erg 物理状態の変化を引き起こす可能性があるため、遺伝子変異により Erg 量(細胞膜ステロール全体を filipin 染色と TLC による生化学実験で評価)、リン脂質とスフィンゴ脂質等の他の細胞膜脂質量(TLCによる生化学実験)の変化を解析した。

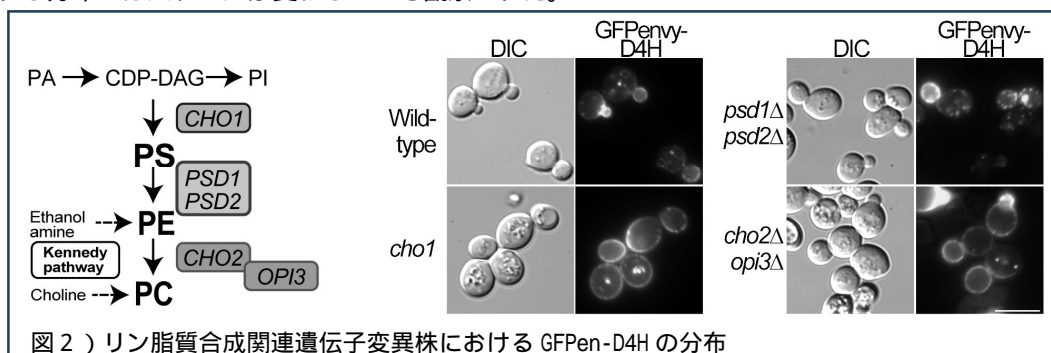
4. 研究成果

研究1) 脂質変異株による Erg 物理状態制御機構の解析

研究代表者は、GFPen-D4H を出芽酵母細胞内に発現させると、出芽部位に極性分布し、細胞増殖に伴ってダイナミックに変化することが確認された。成長端である出芽部位の細胞膜は新生された未成熟な膜であり、一方、母細胞の細胞膜では脂質分布が成熟している。この膜環境における成熟度合いの違いはリン脂質を始めとした脂質群の相互作用の確立が反映されており、出芽部位では新生膜であるが故に、リン脂質などの相互作用が未確立でその保護機能が不十分であるため、ステロールの細胞質相への露出を頻繁に引き起こすと考えられる。

我々は、細胞膜を構成する脂質の GFPen-D4H の分布に与える影響に関して解析を行った。その結果、ホスファチジルセリン (PS) 合成酵素 *cho1* 遺伝子欠損が、出芽部位だけではなく細胞膜全体に GFPen-D4H の分布が観察される表現型を示した (図2)。その一方、PS からホスファチジルエタノールアミン (PE) を合成する遺伝子の変異 *psd1 psd2* 変異では細胞膜からの GFPen-D4H のシグナルが消失した (図2)。 *cho1* 遺伝子変異では、PS が合成されない一方、*psd1 psd2* 遺伝子変異は PE が合成されない代わりにその前駆体である PS の蓄積が進むことが知られている。そのため、GFPen-D4H の分布には PS が重要な役割を持つと推測される。この結論を支持するように、*cho1* 遺伝子欠損株で観察される細胞膜全体に GFPen-D4H の分布が Lyso-PS の添加により消失することが明らかとなった。

また、細胞膜脂質であると予想されるスフィンゴ脂質の合成酵素遺伝子変異について、セラミド合成以降のステップに関わる遺伝子変異 (*sur2, scs7, sur1, csh1, csg2, ipt1*) においても野生株で見られる分布とはパターンが変わることも観察された。

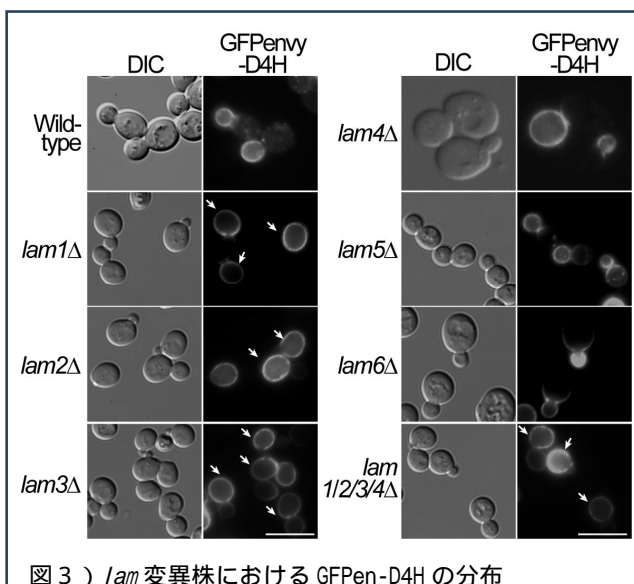


研究2) Erg 物理状態を制御する遺伝子のスクリーニング

細胞膜に関わるタンパク質の関連を明らかにするため、GFPen-D4H の分布を指標にした顕微鏡スクリーニングからその変化を示す遺伝子変異の探索を行った。出芽酵母遺伝子欠損変異株のライブラリーから当初計画していた細胞膜タンパク質に加えて、ステロールの分布に影響しうる細胞膜近傍の小胞体 (cER) に分布するタンパク質の遺伝子の変異株もスクリーニングに加えた。総計 438 株を選択しスクリーニングの過程を経て、最終的に 12 個の関連遺伝子 (*msb2, ypk1, lem3, lam2, vid22, ppz1, itr1, flc1, yhk8, pho84, sso2, pmp3*) を同定した (*lam2* については図3に表示)。

我々は、スクリーニングで得られた候補の中からステロール輸送タンパク質 Lam タンパク質 (StArT like domain タンパク質) の遺伝子機能解析を進めた。 *lam* 変異株のうち細胞膜と小胞体間でのステロール輸送を担う *lam1, lam2, lam3* 変異株では、GFPen-D4H が野生株とは異なり母細胞側に分布していた (図3)。

sfk1 欠損株を加えた細胞膜および cER 局在タンパク質遺伝子変異の二重変異株については次項「研



究3」にて報告する。

研究3) 生化学実験による Sfk1 の Erg 物理状態制御機構の解析

タンパク質を含むプロテオリソームの生化学実験系により Sfk1 の機能解明を推進するための研究を計画した。Sfk1 精製タンパク質の調製は、出芽酵母内でグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として発現させたものを精製した。この精製タンパク質について可溶化及びリソームへの組み込みの条件検討に労力を費やす結果となり、期間内での解析は完全に終了することはできなかった。こちらについては今後の課題として進める。一方、研究2のスクリーニングの結果において、*sfk1* 欠損株と 438 株の細胞膜および cER 局在タンパク質遺伝子変異株の掛け合わせを行い、研究2同様のステップを経て GFPen-D4H の分布を解析した。その結果は *sfk1* 欠損によって影響を受けた変異株はなく、また薬剤耐性についても大きな変化が見られなかった。このことから、Sfk1 の機能としては独立したステロール活性制御機構が考えられる。

Sfk1 の機能の詳細を明らかにするには生化学実験による解明が必要であることが予測されるため、今後、継続してこの解析を進めることとした。

研究4) スクリーニングから得られた候補遺伝子の機能解析

Lam タンパク質は母細胞側 cER に局在しており、GFPen-D4H と共局在を観察を行ったところ、逆相関の分布様式を示していた(図4)。この結果から、Lam タンパク質は母細胞側特異的なステロール輸送への関与が推測された。

研究1及び2から得られた結果について、これらの遺伝子の間には何らかの相関があるのか? という疑問のもと、*cho1* 遺伝子変異と

lam 遺伝子変異の間に遺伝学的相互作用が存在するかについて解析を進めた。その結果、*cho1* 遺伝子変異と *lam2* 変異を含めた複数の *lam* 変異を組み合わせることで、合成致死を引き起こすことが明らかになった。このような遺伝学的相互作用は、GFPen-D4H の分布に影響を与える別の細胞膜脂質であるスフィンゴ脂質の合成酵素遺伝子変異と *lam* 変異の間では見られなかった。以上のことから、*CHO1* 遺伝子と *LAM* 遺伝子間で見られる遺伝学的相互作用は特異的である。それぞれ機構は異なるが両者とも GFPen-D4H の分布に異常を示しているため、ステロール分布制御に関する機能において重複性や関連性があると考えられた。そこで、両者が示す合成致死の原因追求を行うことで活性化ステロールの制御機構や意義が明らかになると考え、*cho1 lam2Δ lam3Δ* 変異条件致死変異株を構築し、その表現型解析を進めた。その結果、ステロールの異常蓄積

(369% ± 80 vs 野生株)とそれに伴う細胞膜の異常陥入(図5)、ステロール依存的に局在が制御されるアルギニン透過酵素 Can1 の異常局在が確認された。これらの致死性やそれに付随した異常は、フルコナゾールによりステロール合成を阻害することにより回復した。このことから、条件致死変異株ではステロールが異常蓄積することにより致死に至ったと考えられる。

以上の結果から、細胞膜 PS は、異なるメカニズムである Lam によるステロール輸送と協調的なステロール分布の制御を行っている可能性が示された。そして、両者のシステムの破綻は、ステロールを過剰に細胞膜へ輸送する、または停留させてしまうことから、両者は活性化を介してステロールのホメオスタシスを維持しているという新たな可能性が示唆された。以上の結果については、本年中に論文投稿を行い誌面発表に結びつけたいと考えている。

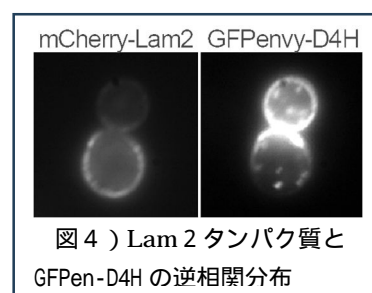


図4) Lam 2 タンパク質と GFPen-D4H の逆相関分布

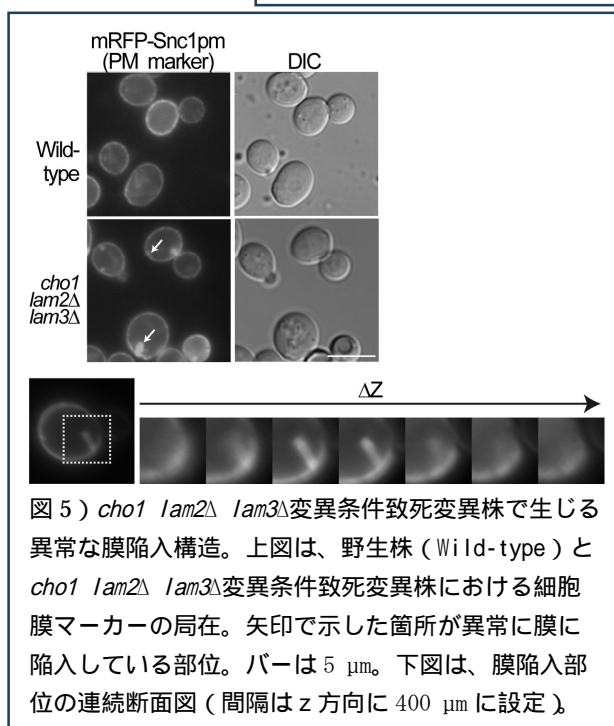


図5) *cho1 lam2Δ lam3Δ* 変異条件致死変異株で生じる異常な膜陥入構造。上図は、野生株 (Wild-type) と *cho1 lam2Δ lam3Δ* 変異条件致死変異株における細胞膜マーカーの局在。矢印で示した箇所が異常に膜に陥入している部位。バーは 5 μm。下図は、膜陥入部位の連続断面図 (間隔は z 方向に 400 μm に設定)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 岸本 拓磨、田中 一馬	4. 巻 94
2. 論文標題 リン脂質非対称性により制御される細胞膜ステロールの保持機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 82-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岸本拓磨	4. 巻 60
2. 論文標題 細胞膜に備わるステロール濃縮メカニズム研究の最新開 ~細胞膜リン脂質非対称性の秘められた機能~	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 633-640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kishimoto Takuma, Mioka Tetsuo, Itoh Eriko, Williams David E., Andersen Raymond J., Tanaka Kazuma	4. 巻 32
2. 論文標題 Phospholipid flippases and Sfk1 are essential for the retention of ergosterol in the plasma membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1374 ~ 1392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E20-11-0699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細胞膜における活性化ステロール制御因子の分布可視化法を用いた出芽酵母網羅的スクリーニングによる特定
2. 発表標題 岸本 拓磨, 賈 子木, 錢 宇恒, 楊 梓桐, 田中 一馬
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 可視化スクリーニングによる活性化ステロール分布制御因子の特定
2. 発表標題 本拓磨, 賈子木, 錢宇恒, 楊梓桐, 田中一馬
3. 学会等名 第56回 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細胞膜ステロール活性化を制御する因子の探索とその制御メカニズムの解析
2. 発表標題 岸本拓磨, 賈子木, 錢宇恒, 田中一馬
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸本拓磨
2. 発表標題 細胞膜現象におけるステロールの不均一性と制御機構の相互作用
3. 学会等名 第65回 日本脂質生化学
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸本拓磨, 田中一馬
2. 発表標題 細胞膜ステロール活性化の制御機構による細胞膜秩序の維持に関する解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本拓磨, 田中一馬
2. 発表標題 ステロール分子動態可視化法による細胞膜ステロール維持機構の遺伝学的解析
3. 学会等名 第55回 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本拓磨, 賈子木, 田中一馬
2. 発表標題 細胞膜ステロール活性化を介した細胞内ステロールホメオスタシス機構の解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本拓磨, 賈子木, 田中一馬
2. 発表標題 細胞膜ステロール活性化の制御機構による細胞膜秩序の維持に関する解析
3. 学会等名 第64回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本拓磨, 賈子木, 田中一馬
2. 発表標題 細胞膜ステロール活性化を制御する出芽酵母Sfk1および関連タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第62回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本拓磨、田中一馬
2. 発表標題 細胞膜リン脂質非対称性の生理的意義の解明
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本 拓磨、田中 一馬
2. 発表標題 細胞膜リン脂質非対称性は膜ステロールの保持に重要な役割を持つ
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関