

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770135

研究課題名（和文）脂質非対称センシングの分子機構と細胞応答

研究課題名（英文）Sensing mechanism of lipid asymmetry and cellular response

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

研究成果の概要（和文）：細胞膜は脂質二重層構造から成るが、その外層と内層で脂質組成が異なっている。その様な「脂質非対称」の状態を適切に維持・管理することは細胞の生存に必須である。本研究では、脂質非対称の状態をモニターするセンサーとして、Rim21 を同定し、「細胞が脂質非対称の状態をモニターする仕組み」と言う新規概念を具現化した。また、脂質非対称が乱れた際に Rim21 の下流で発現が誘導され、脂質非対称の修繕に働くと考えられる新規因子 Opt2 を発見した。

研究成果の概要（英文）：In the plasma membrane, lipid composition differs between the outer and inner leaflet. Maintenance and proper alteration in such lipid asymmetry is essential for cell viability. In this work, we identified a sensor protein, Rim21, which detects alteration in lipid asymmetry, embodying a novel concept that cells monitor the status of lipid asymmetry. We also found a novel factor, Opt2, which is induced as a downstream event of Rim21, and is considered to act in mending of disturbed lipid asymmetry.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞膜、脂質、タンパク質、脂質非対称、センサー、細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

（1）細胞膜の脂質二重層では、その内層と外層で脂質組成が異なっている。その様な脂質非対称を維持・管理する事は細胞の生存に必須であり、その部分的な破綻でさえ様々な疾病や生活習慣病を引き起こす。

（2）私達のグループは、脂質非対称の状態を Rim101 経路が感知し、伝達する事を以前に発見している。しかし、実際にどの因子がセンサーとして働いているのか、またどの様にして脂質非対称の状態を感知しているのかは全く不明であった。

（3）脂質非対称が乱れた際に Rim101 経路を通して、どの様な因子が誘導され、乱れた脂質非対称の修繕に働くかは分かっておらず、脂質非対称の乱れに対する細胞応答の全体像は全く捉えられていなかった。

2. 研究の目的

（1）Rim101 経路の因子のうち、実際にセンサーとして機能するタンパク質を同定する。また、そのセンサーの細胞内局在や複合体形成、刺激受容後の挙動などの基礎情報を得ることも目的とした。

（2）脂質非対称が乱れた際に、Rim101 経

路依存的に発現が誘導される遺伝子群を網羅的に検出する事で、脂質非対称の乱れに対する細胞応答を俯瞰する。また、その中から、脂質非対称の修繕に働く因子を見出すことを目指した。

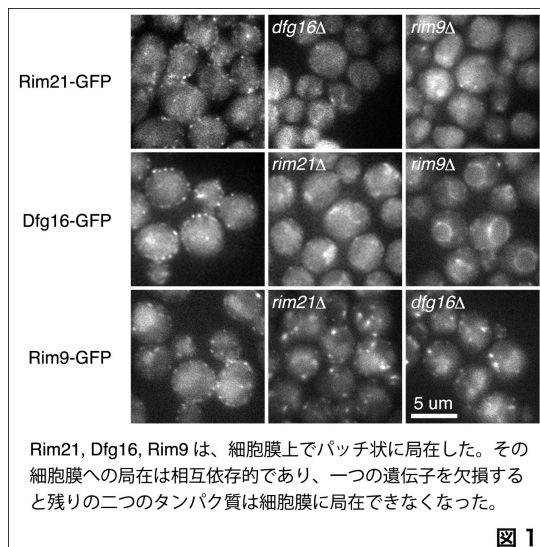
3. 研究の方法

(1) 出芽酵母を材料として、分子生物学、生化学、細胞生物学的手法を駆使して研究を行った。Rim101 経路の最上流に位置するタンパク質群の細胞内局在やそれらの関係性、複合体形成などを調べ、センサーの候補となるタンパク質を絞り込んだ。そして、それらの一つ一つを、任意のタイミングで人為的に分解できるデグロンシステムを構築し、脂質非対称の感知における各因子の重要性を調べた。

(2) 脂質非対称が乱れた突然変異体、さらには Rim101 経路不全株も用いて DNA マイクロアレー解析を行い、脂質非対称が乱れた際に、Rim101 経路によって発現が誘導される因子を網羅的に検出した。その中で、脂質非対称が乱れた際に重要な働きをするタンパク質を、遺伝子欠損解析によって絞り込んだ。

4. 研究成果

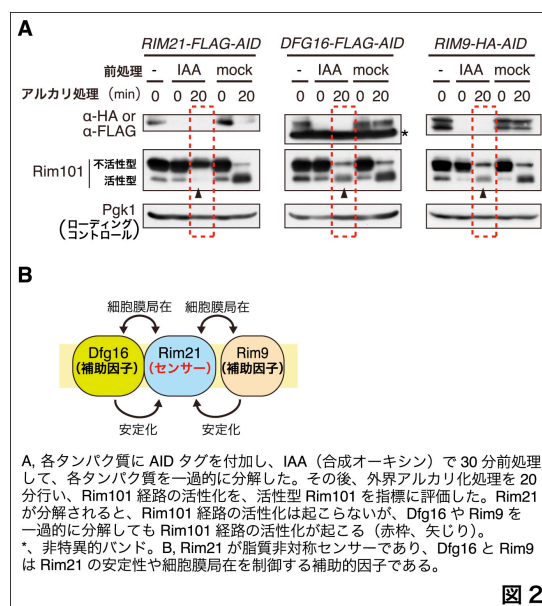
(1) Rim101 経路の最上流に位置する Rim21、Dfg16、Rim9 の 3 つの膜貫通タンパク質の細胞内局在を GFP の融合によって可視化し、これらが細胞膜上でパッチ状に局在していることを明らかにした。また、これらの因子の細胞膜局在は、互いに依存し合っていた (図 1)。



また、免疫沈降法によって、これら 3 つのタンパク質が細胞膜で「センサー複合体」を形成していることを明らかにした。

(2) Rim21、Dfg16、Rim9 の何れが脂質非対称センサーとして機能するかを明らかにするために、各因子を細胞膜上で任意のタイミングで一過的に分解するデグロンシステムを構築した。そのシステムを用いたところ、Rim21 を一過的に分解した際には、残りの二つが細胞膜に残っていても Rim101 経路が完全に遮断されることが明らかになった。一方、Dfg16 もしくは Rim9 を一過的に分解した際には、Rim101 経路がほぼ正常に活性化した。この事から、Rim21 が真にセンサータンパク質として機能し、Dfg16 と Rim9 は Rim21 を細胞膜へ局在させるための補助因子である事が明らかになった (図 2)。

先述の様に、各因子の細胞膜局在は相互依存的である。したがって、各遺伝子の欠損解析では、他の因子が細胞膜に局在できなくなり、その様な二次的な影響を排除できず、センサーの同定には至らなかった。しかし、今回の様に、各因子が細胞膜に局在した後に、一つずつ一過的に分解するシステムを構築したことで、センサータンパク質を同定する事が出来た。実際にセンサータンパク質が同定された事で、「細胞が脂質非対称の状態をモニターする」という私達が発信した新規概念が具現化されたことは特筆に値する。



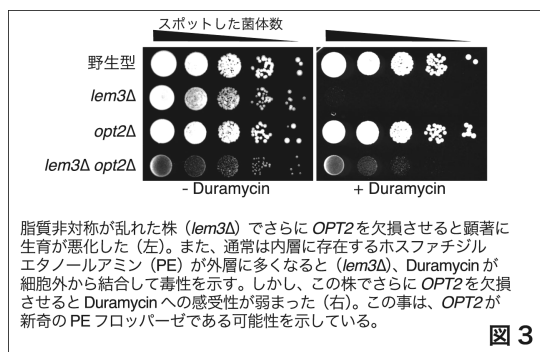
(3) DNA マイクロアレー解析によって、脂質非対称が乱れた際に Rim101 経路依存的に発現が誘導される遺伝子群を抽出した。その中には、グリコーゲンの合成・代謝、トレハロースの合成・代謝などの糖類の代謝に関わる遺伝子群、エンドサイトーシスに関わる遺伝子群、機能未知の膜タンパク質群が多く含まれていた。これらの事から、脂質非対称

の乱れに応答して、糖の代謝やエンドサイトーシスに変化が生じている可能性が浮上した。

脂質非対称の乱れに対する細胞応答を俯瞰的に調べたのはこの研究が初めてであり、貴重な基礎情報となった。また、機能未知の膜タンパク質群が多数抽出され、その中に脂質非対称の乱れを修繕する様な新規のフロッパーゼもしくはフロッパーゼが含まれている可能性が示された。

(4) 上記の(3)で抽出した遺伝子を脂質非対称が乱れた変異体 (*lem3Δ*) で一つずつ欠損したところ、*OPT2* を欠損した際に (*lem3Δ opt2Δ*)、酵母の生育が著しく遅延した(図3)。この生育遅延は、脂質非対称が乱れた変異体で *Rim101* 経路を遮断した時 (*lem3Δ rim21Δ*) と同程度であった (data not shown)。この事は、*Opt2* が脂質非対称の乱れに対する細胞応答で非常に重要な役割を担っている事を物語っている。そこで、*lem3Δ rim21Δ*株で *Opt2* を過剰発現したところ、通常の生育速度に回復した (data not shown)。つまり、*Opt2* は乱れた脂質非対称への細胞応答で中核的な役割を担っており、脂質非対称の乱れによって *Rim101* 経路が活性化する主な目的は *Opt2* を誘導する事であることが明らかになった。

この様に、脂質非対称の乱れに対する細胞応答において、中心的な役割を果たす新規因子を発見したことは大いに評価できる。



(5) 乱れた脂質非対称への細胞応答で中心的な役割を果たす事が明らかになった *Opt2* についてさらなる解析を進めた。まず、*OPT2* 遺伝子の欠損が、通常は主に内層に存在しているホスファチジルエタノールアミン (PE) の非対称分布にどの様な影響を与えるかを抗生物質 *Duramycin* に対する感受性を指標に調べた(図3)。*Duramycin* は細胞膜の外層に露出した PE に結合して細胞膜に穴を開ける事で毒性を示す。したがって、脂質非対

称が乱れて PE が外層に多く露出してしまっている変異体 (*lem3Δ*) は *Duramycin* に対して高感受性を示す事が知られている。そこで、*LEM3* 欠損株でさらに *OPT2* 遺伝子を欠損させたところ (*lem3Δ opt2Δ*)、*Duramycin* に対する高感受性が抑圧された(図3)。この株は、上記の様に通常培地での生育は著しく低下しているが、*Duramycin* に対する耐性では、*lem3Δ*株を大きく上回っていた。同様のアッセイを細胞膜外層のホスファチジルセリン (PS) に結合して毒性を示す *Papamide B* を用いて行ったところ、*Duramycin* の場合と同様の結果を得た。この事は、*Opt2* が PE や PS を細胞外層に反転させる新規のプロッパーゼである可能性を示している。

脂質非対称の乱れに対する細胞応答で中心的な役割を果たす *Opt2* が、実際に脂質非対称の調節に関わる可能性を示した点は評価できる。また、*Opt2* はこれまでに報告されているフロッパーゼとは相同性を有しておらず、もし *Opt2* がフロッパーゼであれば、新規のフロッパーゼファミリーの発見となる。

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1件)

Obara K, Yamamoto H, and Kihara A (2012)
Membrane protein Rim21 plays a central role in sensing ambient pH in *Saccharomyces cerevisiae*.
J Biol Chem, 287: 38473-38481, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M112.394205.

[学会発表] (計3件)

① 小原 圭介、山本 林、木原 章雄

Rim21 は *Rim101* 経路のセンサータンパク質として中心的な役割を果たす
第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡)、2012年12月11-14日

② 山内 佐織、小原 圭介、木原 章雄

乱れた脂質非対称への応答に関与する新規因子の単離・解析
第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡)、2012年12月11-14日

③ 小原 圭介、山内 佐織、神村 章子、安住 薫、木原 章雄

脂質非対称の乱れに対する細胞応答の網羅的解析

第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィック横浜（横浜）、2011 年 12 月 13-16 日

[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

なし

(3) 連携研究者

なし