

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650059

研究課題名(和文)脂質非対称を感知して伝達する分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism sensing lipid asymmetry and transducing the signals

研究代表者

木原 章雄(KIHARA, Akio)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50333620

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)：細胞膜の脂質組成は外層と内層で異なり、脂質非対称を生じている。脂質非対称は様々な生命現象に重要であるため、脂質非対称を維持する機構が存在する。我々はこれまでにRim101経路が脂質非対称変化にตอบสนองし、Rim21がセンサーとして機能することを見出していた。本申請において、我々はRim21からのシグナル伝達がESCRT IIIに至るまで細胞膜で起こることを明らかにした。また、このシグナル伝達経路にユビキチン化が重要であることを見出した。さらに、脂質非対称変化によってRim21依存的に発現誘導される新規タンパク質Opt2を同定し、脂質非対称応答において重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lipid composition differs between outer and inner leaflets of the plasma membrane, generating lipid asymmetry. Since lipid asymmetry is important for a variety of cellular functions, living organism contains a system maintaining lipid asymmetry. Previously, we found that Rim101 pathway responds to a change in lipid asymmetry and that Rim21 functions as a sensor. Here, we revealed that the signaling events from Rim21 to ESCRT III occurred at the plasma membrane and ubiquitination was important. Furthermore, we identified a novel factor Opt2 as a protein induced by a change in lipid asymmetry in Rim21-dependent manner. We also revealed that Opt2 was essential for cell growth to respond to changes in lipid asymmetry.

研究分野：脂質生化学

キーワード：脂質 脂質非対称 スフィンゴ脂質 グリセロリン脂質 細胞膜 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

脂質分子は細胞膜脂質二重層間で異なった分布をしており、脂質非対称と呼ばれる。例えば、細胞膜外層にはホスファチジルコリン (PC) やスフィンゴ脂質が多く、内層にはホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルイノシトール (PI) が多い。脂質非対称の維持は細胞機能に極めて重要で、例えば PS が外層に露出すると死細胞としてマクロファージに認識され、貪食される。あるいは血小板表面に PS が露出すると、血液凝固反応が引き起こされる。一方、細胞分裂には一過的な PE の外層への露出が必要である。

脂質非対称は脂質トランスロカゼ (P-タイプ ATPアーゼ、ABC トランスポーターなど) による脂質分子のフリップ・フロップによって維持されている。脂質非対称の維持が重要であるとすれば、脂質非対称が乱れた際は、その乱れを感知し、元に戻そうとする細胞応答経路が存在すると予測された。我々は実際、酵母の脂質トランスロカゼ変異体を用いて、脂質非対称が変化した際に、長鎖塩基トランスロカゼ *RSB1* が誘導されるという現象を見出した。さらにその後、脂質非対称変化と *RSB1* 発現を結びつけるシグナル伝達経路として Rim101 経路を同定することに成功した。Rim101 経路では細胞膜に存在する Rim21, Dfg16, Rim9, アレスチン様タンパク質 Rim8, エンドソームで働くと考えられている分子群 (Rim20, Rim13, Snf7, ESCRT 0, I, II, III 因子群), 細胞質から核へ移動して働く転写因子 Rim101 など多数の因子が働く (図 1)。我々は最近、細胞膜に存在する Rim21, Dfg16, Rim9 の中で、Rim21 が脂質非対称のセンサーとして働くことを明らかにした。

Rim101 経路はもともと、酵母が外界のアルカリ化に適応するために働くシグナル伝達経路として同定されていた。なぜ、同じ経路が脂質非対称変化と外界のアルカリ化という一見異なる事象の認識に関与しているのかに関しては現時点では不明であるが、我々は同一の機構で認識されていると考えている。例えば、外界のアルカリ化は脂質トランスロカゼの活性を下げることで知られているので、アルカリ化は脂質非対称変化として認識されている可能性がある。

## 2. 研究の目的

我々は脂質非対称センサーとして Rim21 を同定したが、Rim21 のどの領域がどのようなメカニズムで脂質非対称の変化を認識しているのかは不明であった。

Rim21, Dfg16, Rim9 はいずれも細胞膜でパッチ状の局在が観察された。これまで、これらの細胞膜タンパク質から伝えられたシグナルはエンドソームへ伝えられ、Rim20,

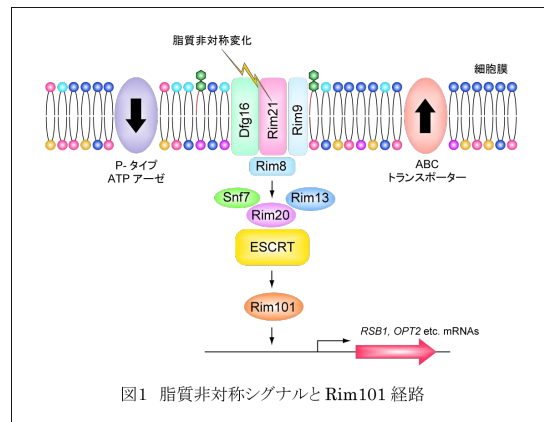


図1 脂質非対称シグナルとRim101 経路

Rim13, Snf7, ESCRT 0, I, II, III 因子群などを活性化すると考えられてきた。しかし、我々の局在観察から、これらの因子も細胞膜で働く可能性が浮かび上がってきた。

脂質非対称変化が引き起こす細胞応答によって発現誘導される遺伝子として我々はこれまで *RSB1* を同定していたが、それ以外のどのような遺伝子が同様に発現誘導され、脂質非対称変化の応答に重要であるかは全く不明であった。

これらの研究背景を踏まえ、本申請では下記の項目を明らかにすることを目的にして研究を行った。

- (1) Rim21 による脂質非対称認識機構
- (2) 細胞膜における脂質非対称シグナル
- (3) 新規因子 Opt2 の解析

## 3. 研究の方法

### (1) 蛍光顕微鏡観察

Rim20, Rim8, Rim13, Snf7 の観察のため、それぞれの C-末端に蛍光タンパク質 (GFP または RFP) を付加した。それぞれの染色体遺伝子を相同組み換えにより、蛍光タンパク質遺伝子が挿入されたものと置き換えた。蛍光顕微鏡観察は蛍光顕微鏡 DM5000B (Leica Microsystems) を使用した。

### (2) AID による一過的タンパク質分解

AID (auxin-inducible degron) は、目的のタンパク質をオーキシン依存的に一過的に分解させるためのデグロンである。本申請ではエンドサイトーシスで働く Las17 の C 末端側に AID を付加した。染色体の *LAS17* 遺伝子を相同組み換えにより、*LAS17-HA-AID* に置き換えた。オーキシンとして (3-インドール酢酸) を添加し、1 時間後に実験に使用した。

### (3) DNA マイクロアレイ

トータル RNA を調製後 mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) で Poly (A)<sup>+</sup> RNA を精製した。200 ng の Poly (A)<sup>+</sup> RNA を Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて Cy3 でラベ

ルし, Yeast (V2) Gene Expression Microarray にハイブリダイズさせた。マイクロアレイは Agilent G2565BA マイクロアライスカナー (Agilent Technologies) でスキャンし, 蛍光強度は Feature Extraction software (Agilent Technologies) で測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Rim21 による脂質非対称認識機構

Rim21 は複数回膜貫通タンパク質であり, C 末端側に比較的大きな親水性領域を持つ。この領域には荷電アミノ酸残基のクラスターが複数存在し, 我々はこれらの領域が脂質分子の極性頭部と結合している可能性を考えた。そこで, Rim21 の C 末端を GFP と融合した GFP-Rim21C を作成し, 野生型酵母内に発現させた。その結果, GFP-Rim21C は細胞膜に局在し, 特に母細胞と娘細胞との境界部(パッドネック)に強い染色が見られた。この領域では PE などの脂質の非対称性が変化していることが知られている。同様に, GFP-Rim21C の局在を脂質トランスロカーゼ変異株中で観察したところ, 野生型で見られるような細胞膜局在が消失した。これらのことから, Rim21 が C 末端側の親水性領域で脂質非対称を認識していることが示唆された。Rim21C は膜貫通領域を持たないことから, Rim21C は細胞膜内側の表面に結合していると考えられる。つまり, Rim21C は細胞膜内層表面の状態(脂質組成や電荷など)の認識を介して脂質非対称の状態をモニターしていると推測される。

Rim21C のどの荷電アミノ酸残基クラスターが, 脂質非対称認識に重要であるか調べるために, それぞれの荷電アミノ酸残基クラスターをアラニンに置換した変異体を作成し, 脂質非対称に対する応答性を調べた。その結果, 353 から 355 番目のグルタミン酸残基をアラニンに置換した変異体では活性が損なわれていた。我々は脂質非対称認識において, これらのアミノ酸残基の負電荷と細胞膜表面に多いホスファチジルイノシトールやホスファチジルセリンの負電荷の間の反発が重要であると考えている。

##### (2) 細胞膜における脂質非対称シグナル

Rim20 の C 末端側に GFP を融合させた Rim20-GFP を用いて, Rim101 経路が活性化した時の細胞内動態を観察した。その結果, アルカリ性の培地に交換後, 20 分から 90 分にかけて時間依存的に Rim20-GFP が細胞膜へ移行していく様子が観察された。この移行にはセンサータンパク質である Rim21, およびアレスチン様タンパク質 Rim8 が必要であった。また, 培地をアルカリ性のものに交換しなくても, 脂質トランスロカーゼ変異株中では恒常的に Rim20-GFP が細胞膜に局在していた。Rim20 はこれまでエンドソームにおいて働くと考えられてきたが, 我々の結果は

細胞膜上で Rim21 からのシグナルを受け取ること示していた。

Rim8 および Rim13 についても Rim20 同様に GFP 融合タンパク質を作成して, Rim101 経路活性化時の局在を調べた。その結果, Rim8-GFP, Rim13-GFP 共に, アルカリ培地に交換することにより細胞膜局在が誘導された。Rim8-GFP と Rim13-GFP の細胞膜局在は Rim21 依存的であった。ただし, Rim8-GFP の細胞膜局在は一過的であり, 培地交換後 20 分をピークとしていた。Rim13-GFP の細胞膜局在は 90 分まで続いた。Rim8 はおそらく, Rim20, Rim13 などの下流タンパク質の細胞膜局在の足場として働くのであろう。

Snf7 は ESCRT-III のサブユニットであり, エンドサイトーシスされた膜タンパク質の後期エンドソームへのソーティングに働く。また, Snf7 は Rim101 経路でも働くことが知られている。サイトゾルに存在する Snf7 は, タンパク質のエンドサイトーシスに伴って活性化される ESCRT-I, ESCRT-II 複合体を介して後期エンドソームにリクルートされて機能する。しかし, 上述のように他の Rim101 経路タンパク質が細胞膜に集積していることを受け, 我々は Snf7 も Rim101 経路では細胞膜で働く可能性を考えた。Snf7-RFP を観察した結果, 通常の培地ではサイトゾルと後期エンドソームにのみ局在していた Snf7-RFP は, 培地をアルカリ性のものに変えることで細胞膜に局在した。この移行は Rim21 依存的であった。この結果から, Snf7 はエンドサイトーシスに働く際は後期エンドソームに局在し, Rim101 経路で働く際は細胞膜に局在することが明らかとなった。

我々の結果は, 従来考えられていた仮説と大きく異なっていた。これまで, Rim101 経路が活性化されると, 細胞膜に存在する Rim21, Dfg16, Rim9 が Rim8 の働きによってエンドサイトーシスされ, エンドソーム上の ESCRT タンパク質, Rim20, Rim13 にシグナルを伝達するというものであった。しかし, 我々の結果は, これらのステップがエンドサイトーシスなしに全て細胞膜上で起こるというものであった。我々の結果をさらに検証するために, 我々はエンドサイトーシスの条件不全株(LAS17-HA-AID)を使用した。この株ではエンドサイトーシスに必須なタンパク質である Las17 が, AID デグロンと融合しており, オーキシン添加によって一過的に Las17-HA-AID を分解できる。この株にオーキシンを加え, さらに培地をアルカリ性のものに変えても Rim101 経路は正常に活性化された。この結果は我々のこれまでの結果と一致して, エンドサイトーシスが Rim101 経路の活性化に必要なことを示している。

##### (3) 新規因子 Opt2 の解析

脂質非対称変化により発現が上昇し、且つその発現上昇が Rim21 依存的な因子の中には、細胞の脂質非対称変化への応答に重要な因子が含まれている可能性があると考え、マイクロアレイを用いた解析を行った。野生株、脂質トランスロカーゼ欠損株 (*lem3Δ*及び*pdr5Δ*)、脂質トランスロカーゼと *RIM21* 遺伝子の二重欠損株 (*lem3Δ rim21Δ*) から回収した RNA を解析した結果、多数の遺伝子の同定に成功した。その中でも、トランスポーター様の構造を持つ *OPT2* 遺伝子について詳細な解析を行った。

脂質非対称変化への応答における *OPT2* の重要性を調べるために、*lem3Δ opt2Δ* 二重欠損株を作成し、生育を調べた。その結果、この二重欠損株の生育が著しく低下していることが明らかとなった。このことは、*OPT2* が脂質非対称変化への応答に極めて重要な因子であることを示していた。

*Opt2* の細胞内局在を調べたところ、細胞膜と後期エンドソームに局在していることが明らかとなった。また、*opt2Δ* 株では液胞の断片化が観察された。*Opt2* がトランスポーター/トランスロカーゼに多く見られる複数膜貫通型タンパク質であることから、脂質トランスロカーゼとして機能する可能性が考えられた。そこで、細胞外層に露出した PE に結合して毒性を示す Duramycin と PS に結合する Papuamide B に対する感受性を調べた結果、*Opt2* の過剰発現はこれらの薬物に対する感受性を亢進させた。さらに、外から添加した蛍光標識 PE, PS, PC の細胞内蓄積量が *Opt2* 過剰発現により減少した。これらのことから、*Opt2* が PE, PS を細胞膜内層から外層へフロップさせるトランスロカーゼであることが示唆された。

## 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2件)

Yamauchi S, Obara K, Uchibori K, Kamimura A, Azumi K, 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, 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, 10.1128/MCB.00408-14

[学会発表](計5件)

Obara K, Rim21 senses alteration in plasma membrane lipid asymmetry and elicits the signal at the plasma membrane in a ubiquitination-dependent manner. FEBS-EMBO, 2014年8月30日~2014年9月4

日, パリ(フランス)

小原圭介, 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日~2014年6月13日, 奈良県新公会堂/東大寺総合文化センター(奈良県奈良市)

小原圭介, 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. 2013年12月3日~2013年12月6日, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

山内佐織, 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日~2013年9月13日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小原圭介, 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19日~2013年6月21日, ウイング愛知(愛知県名古屋市)

[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

木原 章雄 (KIHARA, Akio)  
北海道大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号: 50333620

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

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