



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A study on the function of the phospholipid flippase Drs2 in the endocytic-recycling pathway [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	花松, 久寿
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11409号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55772
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hisatoshi_Hanamatsu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 花 松 久 寿

学 位 論 文 題 名

A study on the function of the phospholipid flippase Drs2 in the endocytic-recycling pathway

（膜リン脂質輸送体 Drs2 のエンドサイトーシス-リサイクリング経路における機能に関する研究）

真核生物の生体膜は内層と外層からなる脂質二重層を基本構造としている。生体膜の主要な構成因子であるリン脂質が内層と外層において非対称的に分布していることが広く認知されており、膜リン脂質非対称性と呼ばれている。膜リン脂質非対称性の形成及び維持に関わる因子として、非細胞質側から細胞質側へとリン脂質を輸送する Type 4 P-type ATPase (P4-ATPase, flippase) が同定されているが、膜リン脂質非対称性の生理的意義はよくわかっていない。真核細胞のモデル生物である出芽酵母では P4-ATPase として Drs2 family が同定されており、非触媒サブユニットである Cdc50 family と複合体を形成し、機能していることが明らかにされている。

近年、出芽酵母の P4-ATPase である Drs2 が Cdc50 と複合体を形成し、細胞内輸送経路の一つであるリサイクリング経路において、初期エンドソームからゴルジ体へ向かう輸送小胞の形成に関与していることが示唆されている。同経路において機能するタンパク質として F-box タンパク質である Rcy1 が存在する。Rcy1 欠損変異株は表現型としてリサイクリング経路の異常と低温感受性の増殖を示すことが明らかとなっており、この表現型は Drs2 欠損変異株が示す表現型と一致していること、また、Rcy1 は Cdc50-Drs2 複合体と相互作用していることが先行研究により示されていた。しかしながら、Rcy1 と Cdc50-Drs2 複合体との相互作用の生理的な意義については未解明であり、本研究はこの生理的意義を解明することを目的とした。初めに Cdc50-Drs2 複合体のどの領域が相互作用に重要であるか検討を行ったところ、細胞質側に露出している Drs2 の C 末端領域（アミノ酸残基 1216-1355）が Rcy1 との相互作用に重要であることが明らかとなった。また、*in vitro* pull down assay により Drs2-C 末端領域と Rcy1 は直接相互作用していることが明らかとなった。次に Rcy1 の様々な領域を欠失した Rcy1 変異体を作成し、Drs2 との相互作用に重要な領域を検討したところ、Rcy1 (574-778) 領域が Drs2 との相互作用に重要であることを見いだした。さらに Rcy1(574-778) 領域を欠失した変異体はリサイクリング経路に異常を示すことが明らかになり、Drs2 との相互作用はリサイクリング経路に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに詳細な解析を行うために、Rcy1 と相互作用できない Drs2 変異体のスクリーニングを行い、4 種の変異体を取得した。取得した変異体に導入されていた変異の解析結果から、Drs2 の 1260 番目イソロイシンと 1264 番目アルギニンが Rcy1 との相互作用に重要であることが明らかとなった。また、I1260 及び R1264 近傍には塩基性アミノ酸が多く存在しており、新たに作成した変異体の解析により、1261 番目及び 1268 番目のアルギニンも相互作用に重要なアミノ酸であることを見いだした。しかしながら、同定した 4 つのアミノ酸に変異を導入した Drs2 単独変異体 (I1260T、R1261A、I1264G、R1268A) は Drs2 欠損株が示す表現型である低温感受性増殖とリサイクリング経路の異常を相補したことから、これら単独変異体の機能は大きくは損なわれていないことが明らかとなった。これら単独変異体と Rcy1 との相互作用を免疫沈降実験にて検討したところ、微弱ながら Rcy1 と相互作用していることが明らかとなった。そこで同定した 4 つの

変異のうち、2つの点変異を有する Drs2 変異体を作成し、再度 Drs2 欠損変異株の表現型を利用した機能解析を行った。結果、これら 2 つの点変異を有する Drs2 変異体、特に I1260T/R1264G 及び R1264G/R1268A 変異体は低温感受性増殖を全く相補できず、またリサイクリング経路の異常も示した。さらに Drs2 欠損変異株と Drs2-I1260T/R1264G 変異株における Rcy1 の局在を検討したところ、これら変異株では Rcy1 が初期エンドソーム由来の構造物へ局在していなかったことから、Drs2 と Rcy1 の相互作用は Rcy1 の初期エンドソームへの局在にも重要であることがわかった。

以上の結果から、リサイクリング経路における Drs2 と Rcy1 の相互作用の役割として以下のモデルを提唱する。Rcy1 が初期エンドソームにおいて Drs2-C 末端領域を介して Drs2 と相互作用すると、Drs2 により特定のリン脂質が細胞質側へと輸送され、膜の曲率が変化し、ゴルジ体へと向かう輸送小胞の形成が促進されるものと考えられる。Rcy1 の作用メカニズムとして、(1) Rcy1 との相互作用により Drs2 のリン脂質輸送機能が活性化される、(2) Rcy1 がクラスリンアダプター等の輸送小胞形成因子を Drs2 へ recruit する、等が考えられる。本研究で明らかにした実験結果と考察したモデルは、細胞内小胞輸送機構における P4-ATPase による小胞形成メカニズム解明の一助となると考えられる。