



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A study on the role of phosphatidylserine in phospholipid flippase-mediated vesicle transport in yeast [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	武田, 美代子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11406号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56275
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Miyoko_Takeda_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 武田 美代子

学 位 論 文 題 名

A study on the role of phosphatidylserine in phospholipid flippase-mediated vesicle transport in yeast

(酵母のリン脂質 flippase が介する細胞内小胞輸送におけるフォスファチジルセリンの役割に関する研究)

生体膜脂質二重層を構成するリン脂質は、細胞質側の層とその反対側の層で非対称に分布している。膜リン脂質のうち、特にフォスファチジルセリン (PS) やフォスファチジルエタノールアミン (PE) は細胞質側の層に多い。この非対称分布の形成には、リン脂質 flippase が特定の膜リン脂質を、二重層を横切り細胞質側の層へ能動的に配置転換 (flip) することが大きく寄与していると考えられている。リン脂質 flippase である Type 4 P-type ATPase (P4 ATPase) は、酵母からヒトに至るまで広く保存されているが、flip の生理的意義はよくわかっていない。近年では、モデル生物の出芽酵母を用いた解析から、flippase が細胞内小胞輸送において重要な機能を担うことが示唆されている。flippase によるリン脂質輸送機構は、主としてリン脂質アナログや脂質結合ペプチドを用いて解析されてきた。本研究では、酵母の遺伝学的手法を駆使することにより、flippase が内因性のリン脂質を用いて小胞形成に関わる機構について解析を行った。

出芽酵母には 5 つの flippase (Drs2p, Dnf1/2p, Dnf3p, Neo1p) が存在し、これらは Neo1p を除いて非触媒サブユニットである Cdc50p ファミリータンパク質 (Cdc50p, Lem3p, Crf1p) と会合している。Cdc50p は Drs2p と、Lem3p は Dnf1p および Dnf2p と、Crf1p は Dnf3p とそれぞれ複合体を形成するが、これら複合体の形成は機能と局在に必須である。先行研究から、*cdc50Δ* および *drs2Δ* 変異体では、エンドサイトーシス後、初期エンドソームからトランスゴルジネットワーク (TGN) を経由して細胞膜へ戻る経路 (リサイクリング経路) の異常が確認されていた。さらに、Lem3p-Dnf1/2p や Crf1p-Dnf3p の変異が加わった Cdc50p-depleted *lem3Δ crf1Δ* 変異体は合成的に増殖およびリサイクリング経路の輸送を悪化させることから、これらの flippase が初期エンドソームからの小胞形成において重複した機能をもつと考えられていた。

本研究で *cdc50Δ* 変異と合成致死を引き起こす *neo1-101* 変異が同定された。C 末端側に 1 アミノ酸変異をもたらす *neo1-101* 変異体は特に表現型を示さないが、Cdc50p-depleted *neo1-101* 変異体では増殖およびリサイクリング経路での小胞形成に重篤な異常が見られた。そこで、flippase のリサイクリング経路における機能に関わる因子を探索するため、Cdc50p-depleted *neo1-101* 変異体の増殖欠損を高発現により回復できる遺伝子 (マルチコピーサプレッサー) のスクリーニングを行った。その結果、PS の合成酵素をコードする *CHO1* 遺伝子を同定した。*CHO1* は Cdc50p-depleted *neo1-101* 変異体の増殖欠損だけでなく、リサイクリング欠損も抑圧することがわかった。加えて、*CHO1* の高発現は、Cdc50p-depleted *dnf1Δ crf1Δ* 変異体や Cdc50p-depleted *lem3Δ crf1Δ* 変異体の増殖およびリサイクリング欠損も抑圧した。これらの結果から、*CHO1* 高発現による細胞内 PS の増加が、初期エンドソームからの小胞形成を促進している可能性が示唆された。*CHO1* 高発現による小胞形成メカニズムについては、大きく 2 つの可能性が考えられる。1 つは、PS の分子特性によって小胞形成に必要な分子をリクルートしてくるというもの、もう 1 つは、PS の flip により脂質二重層の細胞質側の層に脂質分子が増えることで生じる膜の湾曲が小胞形成を促すというものである。これらの可能性について検討するため、まず、*CHO1* 高発現による抑圧が flippase に依存しているかどうかを検討した。flippase 変異体で、正常な機能を維持している別の flippase を *CHO1* と同時に高発現すると抑圧が増強されたこと、また、全ての flippase が機能を失う

Cdc50p-depleted lem3Δ crf1Δ neo1-101 変異体の増殖欠損を *CHO1* 高発現が全く抑圧できなかったことから、*CHO1* 高発現による flippase 変異の抑圧は、残されている flippase を介していることがわかった。次に、PS 結合プローブである GFP-Lact-C2 を用いて flippase 変異体の PS 分布を調べたところ、小胞形成に異常が生じることにより蓄積した初期エンドソーム由来膜構造の細胞質側には、PS が存在していることが示唆された。この結果から、PS が細胞質側に存在するだけでは小胞形成には不十分であると考えられた。PS 以外の脂質 flip についても検討するために、flippase の基質と考えられる PE の合成に関わる遺伝子 *PSD2* の高発現でも flippase 欠損を抑圧できるかどうか検討したところ、抑圧できることがわかった。従って、細胞内 PS 量の増加だけでなく PE 量の増加も小胞形成を促すことが示唆された。しかしながら、PS 合成遺伝子と PE 合成遺伝子いずれの変異体でも、リサイクリング経路に異常が見られなかったことから、PS や PE 分子自体はリサイクリング経路に必須でないこともわかった。

以上の結果から、本研究により、flippase が関与する小胞形成機構において、flip される特定のリン脂質分子が重要なのではなく、リン脂質分子が flip されること自体が重要であることが示唆された。従って、flippase が関与する小胞形成において、flip により生じる膜の湾曲が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。