

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成9年度博士課程進学
氏名 延 济梧
指導教官名 太田明德

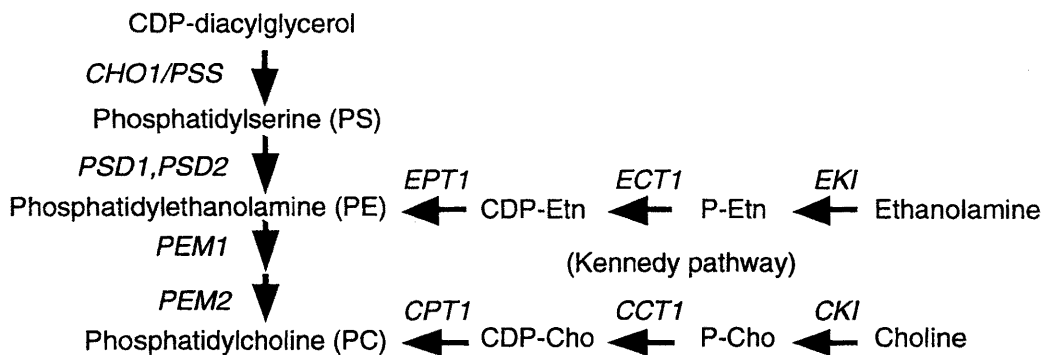
論文題目：*Saccharomyces cerevisiae* における膜リン脂質の取り込みと代謝に関する研究

真核生物の生体膜の主要グリセロールリン脂質はホスラチジルコリン (PC)、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)、カルジオリピンなどで、それぞれ、膜構造を構築する物理化学的役割とともに、物質輸送、分泌、細胞内情報伝達などにおいても重要な働きをしている。これらの膜リン脂質の膜における量比は良く保たれているが、それがどのように調節されているのか未だに明らかでない。酵母において、ゴルジ体において蛋白質分泌に関わっている Sec14p は、Kennedy 経路の CDP-コリン合成酵素を阻害することによって、ゴルジ体の PI/PC 存在比を調節していることが示されている。さらに、細胞内の PI-4-リン酸の濃度や PC の分解系が PC の量の調節に関与していることが示唆されているが、その詳細は不明である。

このような真核生物の主要リン脂質の代謝・調節の分子機構を解明する上で、ゲノム情報が確立し、分子生物学的実験技術の発達した、*Saccharomyces cerevisiae* は優れた研究材料である。しかしながら、研究する手段として、蛍光発色団または放射性同位元素で標識したリン脂質を細胞に取り込ませ、その動きや分子的な変形を追跡する、動物細胞を実験材料とする研究で活発に使用されている方法を、酵母特有の厚い細胞壁が障害となるために採用できないと言う問題がある。そこで、本研究では、*S. cerevisiae* に実際に相当量の主要リン脂質を取り込ませることができるかどうかを詳細に検討した。また、得られた系を用いて、細胞外から加えたリン脂質が細胞のリン脂質代謝に対してどの

ような影響を与えるかを解析した。

S. cerevisiae の PC を生産する経路は下図に示すように 2 つあり、PS の脱炭酸による PE の生成、そのアミノ基のメチル化による PC の合成という主要な *de novo* 経路と、コリンやエタノールアミンを CDP-コリンや CDP-エタノールアミンを経由して PE と PC に変換する Kennedy 経路が存在する。ホスファチジルセリンシンターゼを欠損する *chol/pss* 変異株は、エタノールアミンの細胞内供給量が小さいため、培地に供給されたコリンやエタノールアミンを Kennedy 経路により利用しなければ、PE や PC を合成できず、生育できない。そこで、*chol/pss* 変異株に外からリン脂質 (PE あるいは PC) を与えたとき、それらが酵母細胞によって積極的に利用されるかどうかを、細胞の生育を測定することによって判断できるものと考えられた。



炭素鎖の短いアシル基をもつリン脂質による、*chol/pss* 変異株の生育の支持

炭素鎖長 6 (C6) あるいは 12 (C12) のアシル基をもつリン脂質は *chol/pss* 変異株の生育を支持しなかったが、C8 のみ、および C10 のみのアシル基からなるジカプリロイル PC (diC8PC) およびジカプリル PC (diC10PC) によって *chol/pss* 変異株の液体培地における生育が支持された。また、ジカプリロイル PE (diC8PE) によっても生育が支持された。低濃度の界面活性剤 Tween80 は細胞の成育に影響を与えなかったが、diC8PC と同時に培地に添加すると *chol/pss* 変異株の生育はさらに促進された。しかしながら、これらの短鎖アシル基を有するリン脂質は、PC はコリンやエタノールアミンがない条件では *chol/pss* 株の生育を支持したが、コリンやエタノールアミンがある条件下ではある程度 *chol/pss* 変異株の生育に対して阻害的であった。

リン脂質が細胞外でホスホリパーゼ D 様の活性によって分解され、コリンだけが細胞に取り込まれた可能性を調べるため、コリン輸送系の阻害剤である hemicholinium-3 による影響を調べたところ、コリンを添加した培地では hemicholinium-3 による生育の阻害が見られるのに対し、diC8PC を添加した培地では阻害はみられなかった。さらに、コリン輸送タンパク質をコードする

CTR1 遺伝子を破壊した二重変異株は 1mM のコリンを添加した培地ではほとんど生育できなかつたが、0.1mM の diC8PC を添加した培地では生育した。また、コリンの利用にとって必須な Kennedy 経路の CDP-コリンシンターゼをコードする *CCT1* の二重破壊株は *CHO1/PSS* のみの破壊株と同一水準の生育を示した。また、ホスホリパーゼ C の分解産物として予想されるホスホリルコリンは *chol/pss* 変異株の生育を全く支持しなかつた。さらにまた、酵母で分泌されるホスホリパーゼ B の分解産物であるグリセロホスホリルコリンは 0.1mM の濃度では *chol/pss* 変異株の生育を支持しなかつた。*CHO1/PSS* と酵母の主要分泌ホスホリパーゼ B をコードする *PLB1*, *PLB2*, *PLB3* を破壊した 4 重変異株は 0.1mM のコリンを添加した培地で *CHO1/PSS* のみの破壊株と同様な生育水準を示した。このことは細胞内への diC8PC の取り込みにこれら主要な細胞外ホスホリパーゼが関わっていないことを示している。

以上の結果から、培地に添加された短鎖アシル基を持つリン脂質は細胞外で分解されることなく細胞内に取り込まれ、膜に挿入されて利用されることが示唆された。

短鎖のリン脂質の代謝に関わる酵素活性

chol/pss 変異株を diC8PC を添加して培養したとき、diC8PC は培養後 40 時間以内に最初添加した量の 10%まで減少した。また培地からは培養後 40 時間以内に最初に添加したリン脂質中のカプリル酸のほぼ全量が検出された。この結果から、培地中に添加された diC8PC は膜に取り込まれ、アシル鎖交換により変形され、その結果、遊離した C8 の脂肪酸が細胞外へ放出される可能性が示唆された。

短鎖のリン脂質の分解に関わる酵素活性を探るために、強いホスホリパーゼ B 活性を除くために、*PLB1*, *PLB2*, *PLB3* の 3 重破壊株を用い、NBD-PC を分解し、NBD-脂肪酸、または NBD-リゾホスファチジルコリンを生産する酵素活性 (*PLA₂* または *PLA₁* の酵素活性) を検索した。その結果、NBD-リゾホスファチジルコリンを生ずる酵素活性が、破壊株では親株に比べて 20%ほど存在した。この活性が取り込ませたリン脂質の変形に関わるものかどうかは不明である。なお、使用菌株のホスホリパーゼ B 活性は *PLB2* に依存しており、*PLB1* や *PLB3* の単独破壊による酵素活性の変化は見られなかつた。

PEM1 PEM2 2 重遺伝子遺伝子破壊を用いた解析

diC8PC の代謝に関わる遺伝子を単離するために、*chol/pss* 変異株からコリンでは生育でき、diC8PC では生育できない変異株を分離し、その中から diC8PC のアシル鎖の交換が異常なものを選択しようとした。このような交換

は酵母細胞の膜の恒常性の維持にとっても必須であり、生育に必要とされると言う可能性を配慮し、*chol/pss* 変異株を変異誘発剤処理して得た約 2000 個の *ts* 変異株から diC8PC 添加培地で生育の悪い株を探し、82 個の候補株を得た。しかし、PS を合成できない *chol/pss* 変異株は元々生育が悪く、また、内因性のエタノールアミンによって、PC の要求性が不安定であることなどから、diC8PC を利用できない表現形を確立することが困難であった。そこで、PE メチル化酵素である *PEM1* と *PEM2* の 2 重破壊株を作成したところ、破壊株は安定したコリン要求性を示し、コリン存在下で良好に生育した。また、diC8PC による生育も確認され、これを含む寒天平板培地でも良好な生育を示した。そこで、*PLB1* と *PLB2*、*PEM1* と *PEM2* を破壊した 4 重破壊株について、コリン存在下では生育できるが、diC8PC に依存して生育できない変異株を検索中である。

diC8PC のリン脂質合成への影響

^{32}P 無機リン酸と diC8PC を添加した培地で 40 時間培養した *chol/pss* 変異株の PC の放射能は、コリン添加培地で生育させた場合と比べて時、PI の放射エネルギーが同じ水準であるのに対して、約 50% の水準であった。PE の量は 20% の水準に過ぎなかった。一方、リン脂質リンの測定では、diC8PC 添加時の PE は ^{32}P 標識の場合と同様低い水準であったが、PC 量はコリン添加の場合と同様であった。この結果は、先ず diC8PC 添加時では diC8PC に由来するリン酸によって PC の比放射能が低下していること、すなわち、取り込まれた diC8PC はコリンやリン酸などの成分に分解されることなく利用されていることを示しており、先の *chol/pss cct12* 重遺伝子破壊株が diC8PC によって生育したことに対応している。次いで、PE の水準が低かったことは、diC8PC 添加によっては PE のメチル化は抑制されず、内因性のエタノールアミンを利用して合成された PE のかなりの部分が PC に変換されたことを示唆する。

実際、*PEM1* と *PEM2* のプロモーターに *lacZ* を繋いだプラスミドを *chol/pss* 変異株に形質転換し、コリンまたは diC8PC を添加して培養したときの β -ガラクトシダーゼ活性を測定したところ、diC8PC を添加した場合、コリン添加条件に比べ、*PEM1* のプロモーターによって約 50 倍の β -ガラクトシダーゼ活性が、*PEM2* のプロモーターによっては約 5 倍の活性が観察された。この結果から、N-メチル化による PE から PC への合成は添加したコリンによって転写レベルで強く抑制されるのに対して、外から添加した diC8PC によっては影響を受けないことが示唆された。