

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程 進学

氏 名 岩本 邦彦

指導教官名 太田 明德

論文題目 細胞膜におけるホスファチジルエタノールアミンの動態に関する酵母を用いた細胞生物学的研究

生体膜の主要構成成分であるリン脂質は、均一な分布ではなく、水平方向や膜の表裏において非対称的に分布している。例えば細胞膜の表裏において、ホスファチジルエタノールアミン(PE)は内側に偏って分布していることが、広く生物種を越えて確認されている。この非対称分布は、エネルギー依存性のフリッパーゼによって形成されると考えられているが、その機構・意義については解明されていない。本研究では、遺伝学的な解析が容易な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料として、PE の非対称分布を形成する機構とその意義を解明することを目的とした。

放線菌 *Streptoverticillium griseoverticillatum (baldacii)* の産生する環状ペプチド Ro09-0198 (分子量 2,041) は PE と特異的に結合する抗生物質で、グラム陽性の細菌に対して殺菌活性を示し、様々な動物由来の赤血球を溶解させる性質も持つ。Ro09-0198 が細胞表面の PE と結合すると、膜に小さな穴が形成されることで、細胞の機能障害が引き起こされると考えられている。

酵母 *S. cerevisiae* の野生型株 MHY501 も 20~50 $\mu$ M の濃度の Ro09-0198 により阻害される。当研究室では、MHY501 株を変異誘発剤処理し、Ro09-0198 5 $\mu$ M の下でも生育できないような Ro09-0198 感受性変異株 16 株 (S1~S16) が取得されている。Ro09-0198 感受性変異株の中には、フリッパーゼが異常になったことなどにより、PE の非対称的分布が崩れ、PE が外側に多く露出するようになったものも存在すると期待される。そこで本研究ではまず、Ro09-0198 感受性変異株の感受性を抑圧する遺伝子のスクリーニングを行った。さらに EUROPEAN SACCHAROMYCES CEREVISIAE ARCHIVES FOR FUNCTIONAL ANALYSIS (EUROSCARF)由来の酵母の約 5,000 株の遺伝子破壊株コレクションより、Ro09-0198 感受性を示す遺伝子破壊株のスクリーニングし、Ro09-0198 感受性に関わる遺伝子産物の網羅的探索を行った。そして、Ro09-0198 感受性を示す遺伝子破壊株の解析を手掛かりに、PE の動態に関する研究を試みた。

## 1. Ro09-0198 感受性に関わる遺伝子の検索

Ro09-0198 感受性変異株 S4, S6, S10, S14 から Ro09-0198 感受性を低コピーで抑圧できる遺伝子を取得し、それぞれ *YCR030C*, *VPS45*, *BEE1*, *SSD1* であることが判明した。これらの遺伝子破壊株を作製したところ、*VPS45*, *BEE1* の破壊株については Ro09-0198 感受性を示したので、これらについては詳細な解析を試みた (次章以降)。EUROSCARF の破壊株コレクションを用いたスクリーニングにより、破壊すると Ro09-0198 感受性を示すことが判明した遺伝子の中には、*VPS45* を含め液胞への小胞輸送に関わる遺伝子が 9、その他の小胞輸送に関わる遺伝子が 7、転写調節に関わる遺伝子が 10、アクチン細胞骨格に関わる遺伝子が 5、機能未知の遺伝子が 10、など計 80 程の遺伝子が Ro09-0198 感受性に関わるということが判明した。その中には、共同研究者の加藤らが S3 株の Ro09-0198 感受性を抑圧する遺伝子として取得した *ROS3* も含まれていた (なお、*BEE1* 破壊株については元々コレクション中に含まれていない)。細胞に Ro09-0198 感受性を付与する要因としては様々なものがあることが予想される。

## 2. *BEE1* 破壊株における Ro09-0198 感受性の原因の検討

*BEE1* の遺伝子産物 Bee1p は、Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) の酵母のホモログとして取得されていたタンパク質である。Bee1p は、正常な cortical actin patch の形成に必要で、アクチン繊維の構成に重要な働きを担うことが知られている。また、エンドサイトーシスに必要なバップロリンの酵母ホモログ (Vrp1p) と直接結合し、エンドサイトーシスにおいても働くことがわかっている。そこで cortical actin patch の形成やエンドサイトーシスの異常により Ro09-0198 感受性を示している可能性を検討したが、Ro09-0198 感受性との明確な関連は認められなかった。次に、細胞膜外層に存在する PE を、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) により定量したところ、*BEE1* 破壊株において細胞膜での PE の非対称分布が崩れているわけではなかった。さらに、蛍光標識した PE の取り込みを、顕微鏡観察および fluorescence-activated cell sorter (FACS) によって検討したところ、*BEE1* 破壊株において細胞膜の外層から内層へのフリップ・フロップ活性が低下しているわけではないことも判明した。また、野生型株および *BEE1* 破壊株の Ro09-0198 存在下での細胞の様子を電子顕微鏡により観察したところ、いずれも細胞内膜系の異常が認められ、細胞壁が厚くなっていた。*BEE1* 破壊株の方が細胞壁の厚くなる度合がより高い様子が観察された。

### 3. 細胞膜外層への PE の一時的な露出とアクチン細胞骨格との関連

*BEE1* 破壊株における Ro09-0198 感受性の原因をさらに探るため、細胞膜外層の PE を可視化することを試みた。Ro09-0198 をビオチン化したもの (Bio-Ro) を作用させた後に細胞を固定し、スフェロプラスト化の後に蛍光標識ストレプトアビジンで PE と結合した Bio-Ro を検出するという方法により、細胞膜外層の PE を可視化することに成功した。

通常の酵母培養温度である 30°C で Bio-Ro を作用させると、野生型株では全く蛍光が観察されないのに対し、*BEE1* 破壊株では bud neck や成長途中の bud の細胞膜に蛍光が観察された。共同研究者の榎本らは、動物細胞において細胞分裂時に分裂溝部分の細胞膜外層に PE が露出することを見出し、PE が内層側に戻ることが細胞内のアクチン脱重合のシグナルになるというモデルを提出している。また、共同研究者の牧野らは、Ro09-0198 は膜上の PE と結合すると膜に存在する脂質分子のフリップ・フロップを促進すると報告している。これらのことから、酵母においても出芽の際に bud neck 部分で細胞膜外層に PE が露出するという現象があるとすれば、*BEE1* 破壊株ではその時間が長く、しかも Bio-Ro が結合することでフリップ・フロップが促進され、細胞膜外層の蛍光シグナルが増幅している可能性が考えられた。そこで 20~25°C で培養することにより増殖速度を抑えて Bio-Ro を作用させたところ、野生型株においても bud neck の部分などに蛍光が観察されることを見出した。同様に、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においても分裂面に蛍光が観察された。以上より、細胞分裂時の分裂溝の部分に一時的に PE が細胞膜外層に露出することは、一般的な現象であることが示唆された。また、野生型株に Ro09-0198 を作用させた状態では、bud neck の部分にアクチンの塊が見られることを見出した。このことから酵母の出芽においても、アクチン細胞骨格と細胞膜 PE の動態とが関連している可能性が高い。それに対し、*BEE1* 破壊株では Ro09-0198 を作用させてもこのような現象は観察されず、アクチンを bud neck へと集合させるという *BEE1* 遺伝子産物の機能も新たに示唆された。

さらに、細胞分裂のどの時期に PE が細胞膜外層に露出するのかを検討するために、酵母と Bio-Ro を用いた観察の系において、4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) による核の染色や Calcofluor white による隔壁の染色を同時に行ったり、細胞周期の停止を起こした状態での観察を行った。その結果、PE が bud neck に露出するのは M 期の中でも終期以降であることを見出した。

### 4. *VPS45* 破壊株における Ro09-0198 感受性の原因の検討

*VPS45* の遺伝子産物は Sec1 ファミリーに属するタンパク質で、carboxypeptidase Y (CPY) などのタンパク質がゴルジ体から液胞へと輸送される CPY 経路において、ゴルジ体から出芽した小胞が後期エンドソームへ融合する段階で働くと考えられている。

*VPS45*破壊株の Ro09-0198 感受性については、本来液胞に局在するはずの PE 合成酵素ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ Psd2p が細胞膜へミスソートされ、細胞膜で PE 合成が起こり、細胞膜の PE 含量が増えたことが原因である可能性が考えられた。そこで、*VPS45*破壊株において Psd2p を欠損させてみたが、*VPS45*破壊株の Ro09-0198 感受性は抑圧されなかったため、*VPS45*破壊株の Ro09-0198 感受性の原因は Psd2p のミスソートではないことが示唆された。

液胞への小胞輸送に関わる既知の遺伝子の破壊株を作製し、Ro09-0198 感受性を示すかどうかを調べた。その結果、*VPS3*, *VPS6/PEP12*, *VPS10/PEP1*, *VPS15*, *VPS21*, *VPS27*, *VPS41* の遺伝子破壊株は Ro09-0198 感受性を示さなかったが、*VPS1*, *VPS33*, *VPS34* の遺伝子破壊株は Ro09-0198 感受性を示した。しかし今回得られた、破壊すると Ro09-0198 感受性を示す遺伝子の組み合わせからは、これらの遺伝子産物の既知の機能を基に考えても、Ro09-0198 感受性の原因の特定には至らなかった。

*VPS33*, *VPS34*, *VPS45* 遺伝子破壊株において、TNBS による細胞膜外層の PE の定量を行っても野生型株と差は見られず、これらの株における PE 非対称分布の構成的な異常は考えにくい。しかし、先の Bio-Ro を利用した蛍光観察を行うと、*VPS33*, *VPS45* 遺伝子破壊株では、bud neck 部分に蛍光が見られる細胞が *BEE1* 遺伝子破壊株よりもさらに多いことから、細胞分裂時の一時的な PE の露出が長い、露出量が多いなどの何らかの異常が生じていることが示唆された。