

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成14年度博士課程進学
氏名 小野 裕介
指導教官名 太田 明德

論文題目

出芽酵母における生体膜構成含窒素リン脂質の合成と代謝に関する研究

1. 序

細胞内の膜構造は、種々の物質の輸送を担う小胞輸送や、細胞質分裂にともなって極めて活発に変化している。そういった膜構造の時間的・空間的な制御に関しては、膜を構成する主要成分であるリン脂質が重要な役割を担っている。環境の変化に対応してリン脂質の量や種類が変化し、膜の物理化学的性質が変化することにより生体膜としての恒常性が維持されている。従ってリン脂質の量、分子種の制御に関しては厳密な制御系が存在し、リン脂質の合成と代謝を通じてその組成が厳密に決定されていると考えられている。本研究ではリン脂質の合成と代謝、およびその制御機構について明らかにすることを目的として、前半ではリン脂質合成における Kennedy 経路の中で重要な役割を有していると考えられている Ect1p の酵素学的性質や制御機構についての解析を行った。また後半ではリン脂質の代謝、特にアシル基の再構成 (リモデリング) 機構に関与する因子の探索を行った。

2. 酵母 CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Ect1p) の機能解析

出芽酵母 *S. cerevisiae* において、主要グリセロリン脂質を合成する経路は大きく分けて2種類存在する。1つは細胞内に存在している CDP-ジアシルグリセロールよりホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC) と合成が進む *de novo* の合成経路であり、もう1つが細胞内外のコリン、エタノールアミンから PC、PE を合成する Kennedy 経路である。当研究室の盧らによって、この Kennedy 経路の二番目に働き、エタノールアミンリン酸に対してシチジル基転移反応を行うことにより CDP-エタノールアミンを合成する、CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (ECT)

をコードする *ECT1* が単離、同定された。*ECT1* の遺伝子産物である Ect1p は、酵母から哺乳類に至るまでそのアミノ酸配列が広く保存されている。また、ECT と Kennedy 経路の PC 合成系において対応する位置にある CTP:phosphocholine citidyltransferase (CCT) は基質特異性が特に高いことが知られており、これらのことから ECT が Kennedy 経路の調節において重要な役割を有している可能性が示唆されている。そこで、酵母 Ect1p の酵素学的性質や制御機構についての解析を行った。

1) Ect1p の精製と活性に関する解析

N 末端に his-tag を付加した Ect1p の発現プラスミドである pETEECT1 を作製し、大腸菌 BL21(DE3) 株に導入して his-Ect1p を大量生産させ、ニッケルアガロースビーズにより単一のバンドまでに his-Ect1p を精製した。酵素的に調製した [¹⁴C] エタノールアミンリン酸を基質として精製した Ect1p の酵素活性を測定したところ、精製 Ect1p がエタノールアミンリン酸を CDP-エタノールアミンに変換する酵素活性を有していることが確認された。また、至適 pH は pH 7.5~7.8 程度、至適温度は約 30 °C であり、Mg²⁺、Mn²⁺ といった二価の金属イオンが活性に必須であることが明らかになった。精製 Ect1p におけるエタノールアミンリン酸に対する反応速度定数 K_m は 318 μM 、反応速度の飽和値 V_{max} は 6.1 $\mu\text{mol/mg protein/min}$ 、CTP に対する K_m は 260 μM 、 V_{max} は 6.7 $\mu\text{mol/mg protein/min}$ と算出され、ラット肝細胞由来の ECT とほぼ同程度であることが明らかになった。

また、酵母から調製した膜画分である P12 画分、P100 画分を Ect1p の酵素反応系に添加し、Ect1p の活性を測定した結果、膜画分の添加によって最大で 30% 程度活性が上昇した。さらに酵母より抽出した脂質画分を用いて作製したリポソームや、PC、PE、PS、PA (ホスファチジン酸)、DAG (ジアシルグリセロール)、CDP-DAG を用いて調製したリポソームを反応液に添加し、活性を測定した結果、これらのリポソームの添加によって最大で 40% 程度活性が上昇した。これらの結果より、膜脂質の存在により Ect1p の活性が上昇することが示された。

そこで Ect1p が実際に膜に結合しているかどうかを調べるために、Ect1p の酵母細胞内における局在について解析した。N 末端に FLAG-tag と his-tag を連結した Ect1p を *ECT1* 欠失株で発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた間接蛍光抗体法による Ect1p の局在の観察、および細胞抽出からの膜画分の分画による Ect1p の局在解析を行った。しかしながら、どちらの結果からも Ect1p と膜との結合は見られず、細胞質にのみ存在している可能性、あるいは膜や膜タンパク質と結合していたとしても非常に弱い結合である可能性が考えられた。

2) Ect1p の構造と活性に関する解析

共同研究者である応用生命化学専攻田之倉優研究室 (食品工学) の大塚により、酵母 Ect1p と、CTP、CDP-エタノールアミン、Mg²⁺ といった反応に関与する物質との共結晶化が得られ、その立体構造が決定された [大塚淳 東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文 2006]。その構造は 1 次配列から予想された通り、2 つの相同性が高い大きなドメイン (前半部分は以下 N-ドメイン、後半部分は以下 C-ドメイン) が、リンカー配列をはさんで連結

しているという双頭型であることが明らかになった。そこで Ect1p の一次構造や、大塚により立体構造から推測された情報から、個々のアミノ酸や N-ドメイン、C-ドメインの活性における役割について検討した。

まず、Ect1p の 1 アミノ酸置換体を作製し、活性への影響を検証した。TKY12G 株 (*Δpsd1*、*Δpsd2*、*P_{GAL1}-ECT1*) は、グルコース存在下では *ECT1* が抑制され、エタノールアミンを添加しても PE が合成できず生育することができない。そこで、Ect1p の 1 アミノ酸置換体を TKY12G 株で発現させ、グルコース培地の生育が可能であるか検証した。その結果、前半部分である N-ドメインの中でも保存性が高い、HXGH モチーフの中の His20、His23 のアラニン置換体は TKY12G 株のグルコース培地における生育を支持しなかった。また、構造解析により、CTP、CDP-Etn の α -リン酸基と相互作用していることが推測された Phe16、CTP、CDP-Etn の β -リン酸基、さらにピロリン酸の相互作用が推測された Lys55、CDP-Etn のエタノールアミン由来の炭素鎖部分と相互作用することが推測された Tyr84 のアラニン置換体も TKY12G 株のグルコース培地での生育を支持することはできず、また、相互作用は推測されていないが種間の保存性が非常に高い Asp17 のアラニン置換体も、TKY12G 株のグルコース培地における生育を野生型の Ect1p と同程度に相補することはできなかった。従って N-ドメインの His20、His23、R129、Phe16、Lys55、Tyr84、Asp17 は Ect1p の活性に重要な役割を持つことが示唆された。

次に、Ect1p 1 アミノ酸置換体を大腸菌において生産させて精製し、活性を比較した。その結果、Ect1pF16A、Ect1pD17A、Ect1pH20A、Ect1pH23A、Ect1pK55A、Ect1pY84A、Ect1pR129A の活性は、野生型の Ect1p と比較して著しく減少していた。従って、*in vivo* における結果と併せ、それらのアミノ酸が Ect1p の活性に重要な役割を持つことが示された。

その一方で、後半部分である C-ドメインの中の、N-ドメインの HXGH モチーフに相当する HXGD 配列、あるいはその他の保存性が高いアミノ酸のアラニン置換体に関して、His210、Asp213、Arg249、Try258 のアラニン置換体を発現させた TKY12G 株はグルコースを含む培地でも生育が可能であった。His210、Asp213 のアラニン置換体に関して大腸菌を用いて生産、精製した結果 ECT 活性が見られ、*in vivo* における結果と同様の結果を示していた。ただし、C 末端付近で形成されている α -ヘリックスにおいて、構造解析よりピロリン酸と相互作用していると推定された Arg315 のアラニン置換体を発現させた場合、TKY12G の生育を支持せず、精製した Ect1pR315A の活性は、野生型の Ect1p と比較して著しく減少していた。

これらの結果より、Ect1p を構成するドメインのうち、N-ドメインが Ect1p の活性に重要な役割を担っているという可能性が示唆された。しかし、C-ドメインを欠失した Ect1p は TKY12G 株を相補することができなかったことから、C-ドメインの存在も活性に必要であるということも示された。さらに、Ect1p の C 末端ヘリックス、特に Arg315 が活性に重要な役割を果たしているということが示唆された。

3. 短鎖のアシル基をもつ PC の取り込みとリモデリング機構についての解析

細胞内では損傷を受けた脂質の修復、あるいは生理活性脂質である多価不飽和脂肪酸のリ

ン脂質への導入などの際に、脂質の再構成機構としてアシル基の変換（リモデリング）が行われていることが知られている。リモデリングにはアシル鎖の切断を行うホスホリパーゼや、アシル鎖の転移を行うアシルトランスフェラーゼが関与していることが予想されているが、明確な証拠は未だ得られてはいない。

当研究室の延は遺伝学的解析が容易である出芽酵母を用い、PS を合成する PS シンターゼを欠損する *CHO1/PSS* 変異株、または、PE メチルトランスフェラーゼを欠損した *PEM1*、*PEM2* 破壊株は培地に供給されたコリンやエタノールアミンの代わりに、炭素鎖長 8 または 10 のアシル基のみからなる PC（以下、diC8PC、diC10PC）を培地中に添加することにより、最少培地での生育が支持されることを明らかにした。従って、単独では構造的に膜構造を形成することのできないこれらの短鎖 PC のアシル鎖が、一般的な PC の鎖長である 16~18 の長鎖のアシル鎖に変換されることで利用されているという可能性が考えられた。また、当研究室の田中らは安定同位体で標識した diC8PC を細胞に取り込ませ、その代謝を質量分析装置で分析した。その結果、diC8PC のアシル鎖が炭素鎖長 16~18 のものに変換されていたことから、PC のアシル鎖のリモデリングが実際に起きていることを示した。そこで本研究では、この短鎖 PC のリモデリング機構に関与する因子の探索を行った。

まず、アシル基の切断を行う既知のホスホリパーゼがリモデリングに関与しているかどうか調べた。コリン要求性を示す *PEM1*、*PEM2* 破壊株において、*S. cerevisiae* の主要なホスホリパーゼ B をコードする *PLB1*、*PLB2*、*PLB3* の三種の遺伝子を破壊し、この五重変異株の生育が diC8PC により支持されるかどうかについて検討した。その結果、この変異株は diC8PC を添加した培地でも生育が可能であったことより、diC8PC のアシル基の切断、変換にはこれらの主要なホスホリパーゼは必須ではないということが明らかとなった。

次に、diC8PC で生育することができない変異株のスクリーニングを行い、diC8PC の取り込み、輸送、およびリモデリングに欠損を持つ変異株の取得を試みた。*PEM1*、*PEM2* の二重遺伝子破壊株を親株として、EMS による変異原処理後にコリン添加培地では生育できるが、diC8PC 添加培地では生育できないという変異株を、それぞれ α 型株約 45,000 コロニー、a 型株 30,000 コロニーの中から選出した。その結果、 α 型株からは 22 株、a 型株からは 45 株の変異株を取得した。

このようにして得られた変異株の中で、A2 株は蛍光標識されたリン脂質である NBD-PC の取り込みが起こらなかった。NBD-リン脂質、リゾリン脂質の取り込みに関与していることが知られている細胞膜タンパク質をコードする *LEM3/ROS3* を低コピーで導入した結果、diC8PC における生育がある程度回復した。この A2 株の *LEM3/ROS3* 領域の配列を調べたところ 160 番目のグルタミンが終止コドンに変化していた。さらに *PEM1*、*PEM2*、*LEM3/ROS3* の三重破壊株は diC8PC 添加培地では生育が見られなかった。

従って、この結果 diC8PC の取り込みに *LEM3/ROS3* が関与していることが示唆された。