

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成16年度博士課程 進学  
氏名 高城 景子  
指導教員名 太田 明德

### 論文題目

酵母における生体膜構成リン脂質ホスファチジルエタノールアミンの  
動態に関する分子遺伝学的研究

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は、膜の脂質二重層間で非対称的に分布しているというモデルが広く受け入れられている。このうち、ホスファチジルエタノールアミン (PE) は、細胞膜において脂質二重層の内層側に偏って分布していると考えられている。この非対称分布は、エネルギー依存的に脂質を外層側から内層側へ輸送する酵素フリッパーゼにより形成、維持されていると考えられているが、その詳しい分子機構や生理的意義などについては未解明の部分が多い。本研究では、遺伝学的な解析が容易な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、PE の非対称分布の形成、維持機構やその意義を解明することを目的とした。

放線菌 *Streptoverticillium griseoverticillatum (baldaccii)* 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あり、グラム陽性細菌に対する殺菌活性や、様々な動物由来の赤血球を溶解させる性質を持つ。この細胞障害性は、Ro09-0198 が細胞表面に露出した PE に結合し、膜に穴が形成されることによると考えられている。当研究室では、酵母 *S. cerevisiae* に対する Ro09-0198 の作用を調べ、Ro09-0198 は *S. cerevisiae* に対しても細胞障害性を示すこと、PE 合成を抑制した酵母細胞は Ro09-0198 に対する耐性が上昇することが示されている。本研究では、この Ro09-0198 を用いて、PE の動態に関わる新たな因子の取得を試みた。

## 1. Ro09-0198 感受性遺伝子破壊株の解析

酵母 *S. cerevisiae* には約 6,000 の ORF が存在し、このうち生育に必須でない ORF は約 5,000 である。この必須でない遺伝子全ての単独破壊株のコレクションが EUROPEAN SACCHAROMYCES CEREVISIAE ARCHIVES FOR FUNCTIONAL ANALYSIS (EUROSCARF) によって作製されている。この遺伝子破壊株コレクションの中から PE の動態に関わる因子の遺伝子破壊株を選び出すことを目的とし、遺伝子破壊株コレクション 4,926 株に対し、Ro09-0198 に感受性を示す株の探索を行った。Ro09-0198 に対して感受性を示す株の中には、遺伝子の破壊によって細胞膜における PE の非対称分布が崩れ、PE が外層側に多く露出した株が含まれる可能性が期待できる。各遺伝子破壊株の Ro09-0198 を含む培地における生育を調べた結果、野生型株の致死濃度の約半分である 50  $\mu$ M の Ro09-0198 を含む培地で生育阻害を示した株が 260 株得られ、このうち 79 株は 25  $\mu$ M の Ro09-0198 を含む培地においても生育阻害を示した。

次に、25  $\mu$ M の Ro09-0198 に対して感受性を示した 79 株の遺伝子破壊株における、PE の蛍光アナログ、NBD-PE の細胞内への取り込みを調べた。NBD-リン脂質は、リン脂質の外層側から内層側への輸送（フリップ）活性の指標として用いられており、NBD-PE の細胞内への取り込み量が減少した株では、細胞膜における NBD-PE のフリップに障害が生じている可能性が期待できる。79 株の遺伝子破壊株において、細胞内への NBD-PE の取り込み量を測定したところ、NBD-PE の取り込み量の減少を示した株は、既にリン脂質のフリップに関わることが示唆されている Ros3p/Lem3p、Dnf1p、Drs2p、Fpk1p の遺伝子破壊株を含め 26 株であった。更に、このうち NBD-PE の取り込み量が野生型株の 7 割以下に減少していた 12 株について、エンドサイトーシスマーカー FM4-64 および Lucifer yellow の細胞内への取り込みに大きな欠損がないことを確認した。よって、NBD-PE の取り込み量の減少はエンドサイトーシス機構に障害が生じたことによるものではないことが示唆され、これらの株の中に PE の動態に関わる因子の遺伝子破壊株が含まれている可能性が期待された。

## 2. 小胞輸送とPEの動態の関連の解析

EUROSCARF 遺伝子破壊株コレクションを用いたスクリーニングにおいて Ro09-0198 感受性を示し、且つ NBD-PE の細胞内への取り込み量の減少を示した遺伝子破壊株の中には、小胞輸送に関わる因子の遺伝子破壊株が多く含まれていた。特に、このうち Vps51p、Vps52p、Vps54p は Vps53p と共に複合体を形成して機能することが示唆されているものであった。そこで、VPS53 遺伝子破壊株を新たに単離し直したところ、vps53 $\Delta$ 株も Ro09-0198 感受性を示し、NBD-PE の取り込みに欠損を示すことが示唆された。Vps51p、Vps52p、Vps53p、Vps54p は、エンドソームからトランスゴルジネットワーク (TGN) への逆行輸送において、Golgi-associated retrograde protein

(GARP) complex / Vps fifty-three (VFT) complex を形成し、エンドソーム由来の輸送小胞の TGN 膜への融合に関わることが示唆されている。よって、GARP complex の機能と細胞膜における PE の動態との間に関連がある可能性が考えられた。

そこで、アミノリン脂質のフリッパーゼと推定されている P-type ATPase Drs2p/Neo1p ファミリータンパク質のうち、細胞膜に局在することが示唆されている Dnf1p および Dnf2p の C 末端に EGFP を付加した融合タンパク質を発現する低コピープラスミドを構築し、これを用いて Dnf1p-GFP、Dnf2p-GFP の局在を観察したところ、野生型株では細胞表層の主に bud の表面や bud neck に局在が観察されるのに対し、*vps51Δ*株、*vps52Δ*株、*vps53Δ*株、*vps54Δ*株では細胞内部の膜構造と思われる部位に蛍光が蓄積していた。

また、GARP complex と共にエンドソームからの輸送小胞の TGN 膜への融合に機能することが示唆されている Rab/Ypt ファミリータンパク質 Ypt6p、Ypt6p のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として機能することが示唆されている Ric1p および Rgp1p、Ypt6p の GTPase 活性化タンパク質 (GAP) として機能することが示唆されている Gyp2p/Mdr1p の遺伝子破壊株について Ro09-0198 感受性を調べたところ、*ypt6Δ*株、*ric1Δ*株、*rgp1Δ*株は Ro09-0198 感受性を示した。また、これらの遺伝子破壊株における Dnf2p-GFP の局在を調べたところ、Dnf2p-GFP の蛍光が 2 割程度観察された。また、*ypt6Δ*株、*ric1Δ*株、*rgp1Δ*株では Dnf2p-GFP の蛍光が細胞内部の膜構造と思われる部位に蓄積している細胞が 2 割程度観察された。

更に、GARP complex と共に TGN への輸送小胞の融合に機能すると考えられている t-SNARE である Tlg2p の遺伝子破壊株も、スクリーニングにおいて Ro09-0198 感受性および NBD-PE の取り込みの欠損を示しており、*tlg2Δ*株における Dnf2p-GFP の局在を調べたところ、Dnf2p-GFP が細胞全体に拡散している細胞が多く観察された。また一部の細胞は Dnf2p-GFP が細胞の内部の膜構造と思われる部位に局在していた。

以上の結果より、GARP complex が Dnf1p および Dnf2p のリサイクリングにおいて初期エンドソームから TGN への逆行輸送に関わっていることが強く示唆された。

### 3. Ro09-0198 超感受性変異株S4 株の解析

当研究室では、Ro09-0198 に超感受性を示すRo09-0198 超感受性変異株S1～S16 株が取得され、更にこのうちS6、S10、S14 株に対して詳しく解析が行われBee1p/Las17p、Vps45p、Vps33p、Vps34p、End3p、Sla2p/End4p、Vrp1p/End5p、Ssd1pの関与が示唆された。また、共同研究者の加藤らは、S3 株の解析から、細胞膜におけるPEのフラップに関わる因子としてRos3p (Ro-sensitive 3)/Lem3p を同定した。

本研究では、他の Ro09-0198 超感受性変異株について、温度感受性および NBD-PE の取り込みを調べた。NBD-PE の取り込み量に減少を示し、Ro09-0198 感受性変異と温度感受性変異の間に強い相関がみられた S4 株について Ro09-0198 感受性を相補す

る遺伝子の取得を試みた。その結果、S4 株の温度感受性および Ro09-0198 感受性を部分的に回復する遺伝子として、*SYPI* および *SSD1* が得られた。*Syp1p* はエンドサイトーシスの初期段階において機能することが示唆されていることから、S4 株の Ro09-0198 感受性が、この過程に関わる因子の変異に起因する可能性も考えられた。*Ssd1p* は RNA に結合し、細胞内の様々な機能に関わることが示唆されており、S4 株の Ro09-0198 感受性変異にも関わりを持つ可能性が示唆された。更に、*SYPI* については遺伝子破壊株を作製したが、*SYPI* 遺伝子破壊株は Ro09-0198 感受性を示さなかった。