

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成20年度博士課程 入学

氏名 小林 新吾

指導教員名 太田 明德

論文題目 出芽酵母におけるホスファチジルエタノールアミンの
代謝と輸送に関する研究

脂質二重層を基本構造とする生体膜の主たる機能は、細胞やオルガネラを外界から隔てることである。そしてただ区切るだけではなく、生体膜は反応の場として、また物質や情報のやりとりの場として、多くの機能を有している。生体膜は多様な脂質により構成されるが、その脂質分布は一様ではない。例えば細胞膜はステロールに富み、カルジオリピンはミトコンドリアにしか見られないなど、脂質は細胞内で不均一に分布している。このような脂質の不均一分布は膜が機能を果たす上で重要な意味を持つと考えられる。この不均一分布は脂質の輸送と代謝により構築されると考えられる。また細胞内では脂質合成酵素がいくつかの特定のオルガネラに分布しているため、脂質代謝そのものが脂質輸送により制御されると考えられる。しかしこれほど重要な細胞内現象でありながら、脂質輸送に関する知見は非常に乏しい。そこで本研究ではモデル生物である出芽酵母について、ホスファチジルエタノールアミン (PE) 輸送に関わる細胞内機構の解明を目的と

して解析を行った。

第1章 小胞体からミトコンドリアへの PE 輸送を評価する実験系の構築

これまでに、ミトコンドリアに局在し PE を合成するホスファチジルセリン (PS) デカルボキシラーゼ *Psd1p* を欠失すると、酵母は非醗酵性炭素源を資化できなくなることが分かっている。これはミトコンドリアの PE 量が欠乏することにより、ミトコンドリアの呼吸機能に欠損が生じるためと考えられる。この表現型は細胞外からエタノールアミンを添加することで抑圧されることから、小胞体で合成された PE の一部はミトコンドリアへ運ばれて利用されたと考えられる。しかし、この PE 輸送を担う細胞内機構は全く不明である。その原因の一つとして細胞内 PE 輸送を評価する実験系が構築されていないことが挙げられる。そこで小胞体からミトコンドリアへの PE 輸送に関して、これを評価する実験系を構築した。

PE 輸送を評価する実験系として次のような戦略を考えた。まず出芽酵母のホスファチジルコリン (PC) 合成に関わる PE メチルトランスフェラーゼを欠失した *pem1Δpem2Δ*株を作製する。次に *pem1Δpem2Δ*株において人工的に PE メチルトランスフェラーゼをミトコンドリアに局在させる。この株に対しラジオアイソトープで標識したエタノールアミンを与え、小胞体膜上に放射標識された PE を合成させる。この標識 PE はミトコンドリアに運ばれた場合にのみ PC へと変換される。この条件では標識 PC の合成量を指標に、小胞体からミトコンドリアへの PE 輸送を評価することができる。

ミトコンドリアに局在させる PE メチルトランスフェラーゼとして酢酸菌由来の *Pmt* を利用した。*Pmt* の N 末にミトコンドリア標的シグナルと膜貫通領域を、C 末に HA タグを融合した蛋白質 *mitopmt* を設計し、これを出芽酵母内で生産するためのプラスミド *mitopmt22* を構築した。*pem1Δpem2Δ*株に *mitopmt22* を導入したところ、*mitopmt* は正しくミトコンドリアに局在した。また *mitopmt* は *pem1Δpem2Δ*株のコリン要求性を抑圧し、*pem1Δpem2Δ/mitopmt22* 株をコリン非添加培地で培養した場合にも膜脂質に PC が観察された。これらのことから、*mitopmt* を利用して PE 輸送を観察できると考えた。

そこで実際に *pem1Δpem2Δ/mitopmt22* 株に対して³H]エタノールアミンを与え、PE や PC に含まれる放射能を測定した。その結果、PE や PC 中に含まれる放射能は経時的に増加した。このことから小胞体で合成された PE の一部はミトコンドリアへと運ばれることが確かめられ、目的の実験系を構築することに成功した。またこの実験系は、エンドソームに局在するとされる *Psd2p* により合成さ

れた PE について、そのミトコンドリアへの搬入を評価することにも応用できると期待される。

第2章 ミトコンドリアへの PE 輸送に関わる因子の探索

上で述べたように、出芽酵母においてはミトコンドリアへと PE を輸送する細胞内機構が存在すると考えられる。そこでこの PE 輸送に関わる因子の取得を目的とし、*psd1Δ*株の乳酸資化能欠損を多コピーで抑圧する因子を探索した。この探索系においては、もう一つの PE 合成酵素である Psd2p を介して合成された PE が効率的にミトコンドリアへと運び込まれるか、あるいは PE 合成の亢進や分解の抑制によって細胞全体の PE 量が増加することなどにより、結果的にミトコンドリアの PE 量が回復した株が取得できると期待された。得られたクローンについて挿入遺伝子を決定したところ、高発現により *psd1Δ*株の乳酸資化能欠損を抑圧する遺伝子として、*PSD1*、*PSD2*、*DPL1*、*SFH1* が取得された。このうち *PSD1*、*PSD2*、*DPL1* についてはそれらの産物の機能から PE 合成の亢進によって目的の表現型を示したことが推測できることから、探索系は正しく機能したと考えられた。

SFH1 の遺伝子産物 Sfh1p は、Sec14p ファミリー蛋白質に属する蛋白質である。Sec14p ファミリー蛋白質は人工膜間で PC やホスファチジルイノシトール (PI) を輸送する活性を有することが知られているが、細胞内で脂質を輸送するかどうかは明らかになっていない。そこで Sfh1p が細胞内 PE 輸送に関与するかどうか検討した。

まず *SFH1* について、その高発現が細胞にどのような変化をもたらすか検討した。その結果、*psd1Δ*株において *SFH1* を高発現するとミトコンドリアの PE 量が増加することが確認された。またこの条件では、細胞全体の PE 量も増加していた。*SFH1* 高発現の効果は *psd1Δpsd2Δ*株においては見られないことから、*SFH1* 高発現による細胞 PE 量の増加は Psd2p を介したものと考えられた。

さらに、³Hセリンを利用して細胞内リン脂質代謝を観察した。その結果、*psd1Δ*株において *SFH1* を高発現すると、PS 合成は約 2 倍に、PE 合成は約 4 倍に亢進することが明らかになった。そこで PS 合成や PE 合成に関わる酵素の活性に対する Sfh1p の *in vitro* における効果を調べたが、影響は見られなかった。以上のことから、Sfh1p は Psd2p が局在するエンドソーム周辺の脂質フローを変化させることで、Psd2p を介した PE 合成を亢進した可能性が考えられた。

第3章 Sfh1p の細胞内機能に関する解析

第2章の結果から、Sfh1pが細胞内PE輸送に関与することが考えられた。また以前の報告から、Sfh1pはPCやPIの輸送活性を持つこと、及びPC、PIに加えて、その脂質結合ポケットにPEを挿入できることが分かっている。

そこでSfh1pについてリコンビナント蛋白質 His8-Sfh1pを調製し、Sfh1pが人工膜間でPEやPSを輸送できるかを検討した。その結果、PEについてはSfh1pによる輸送が見られたが、PSについては輸送が観察されなかった。

次にSfh1pが細胞内でどの脂質を挿入しているか検討した。Sfh1pのC末にIgG結合ドメインであるZZタグを連結したSfh1ZZpを *psd1Δ*株において高生産し、IgGセファロースビーズを用いてSfh1ZZpを精製した。精製したSfh1ZZpから脂質を抽出し、質量分析装置で検出した。その結果、Sfh1pには酵母の主要リン脂質であるPC、PE、PI、PSが挿入されていた。検出された脂質の量と細胞内リン脂質組成比から、細胞内でSfh1pには主にPC、PE、PIが挿入されていると考えられた。

脂質輸送蛋白質の多くは膜への標的にホスホイノシチドを利用することが示唆されている。そこでSfh1pがホスホイノシチドに結合するか検討した。その結果、Sfh1pはPI(3,5)P₂に特に強く結合することが明らかとなった。PI(3,5)P₂は主として液胞やエンドソームに存在する微量脂質であることから、Sfh1pがエンドソーム周辺で機能する際にPI(3,5)P₂が関与する可能性が考えられた。

総括

第1章の結果から、これまで解析が困難であった小胞体からミトコンドリアへのPE輸送について、これを評価することができるようになった。

第2章と第3章の結果から、Sfh1pがエンドソーム周辺でのPE輸送に関与すると考えられた。またSfh1pには人工膜間でPEを輸送する能力があったことから、細胞内でPEを輸送している可能性も考えられた。これらの結果から、Sfh1pはエンドソームからPEを運び出すことで、Psd2pに対する生産物阻害を抑制し、その結果PE合成を亢進した可能性が考えられた。また、Sfh1pが細胞内脂質輸送を担う因子の一つであるならば、やはり脂質輸送こそがSec14pファミリー蛋白質に共通した機能であるという可能性も考えられた。