

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小林 新吾

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、脂質の輸送と代謝によって構築、維持されていると考えられている。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。本論文は、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ものである。本論文は序章、終章を含む 5 章よりなり、第 1 章から第 2 章において研究の成果が述べられている。

第 1 章では、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を試みている。細胞内 PE 輸送に関しては現時点では全く不明であるが、これは実験系が存在しないために PE 輸送の解析ができないことが原因であった。そこで細胞内 PE 輸送を評価するため、酢酸菌由来の PE メチルトランスフェラーゼである Pmt を利用した戦略を考案し、新規の実験系を構築した。まず出芽酵母自身の PE メチルトランスフェラーゼを欠損した状態で Pmt をミトコンドリア内膜に係留しておく。この細胞に³H]エタノールアミンを与えて小胞体膜上に³H]PE を合成させる。³H]PE はミトコンドリアへと運ばれた場合にのみホスファチジルコリン (PC) へと変換される。これにより、³H]PC の合成量を指標に小胞体からミトコンドリアへの PE 輸送を評価できるようになった。さらにこの実験系を発展し、Pmt を異なるオルガネラに係留すれば他のオルガネラ間 PE 輸送解析にも応用できると期待された。

第 2 章ではミトコンドリアへの PE 搬入に関わる因子の取得を目的とし、*psd1Δ*株の乳酸資化能欠損に対するマルチコピーサプレッサーの探索を行った。その結果、高発

現により顕著な抑圧を示す遺伝子として *SFH1* を取得した。その遺伝子産物 Sfh1p は phosphatidylcholine/phosphatidylinositol transfer protein (PC/PITP) として知られる Sec14p のホモログであり、人工膜間で PC や PI を輸送できることが知られていた。また Sfh1p は PE と結合しうることが報告されていた。本論文では、*SFH1* 高発現によりミトコンドリアの PE 量が回復することを確認し、これが Psd2p を介した PE 合成の亢進によることを明らかにした。しかし Sfh1p は脂質合成活性そのものには影響しなかったことから、脂質輸送を介して Psd2p 周辺の脂質フローを変化させることで、間接的にリン脂質代謝に影響を与えたと考えられた。

第 3 章では、Sfh1p の細胞内機能について詳細な解析を行なっている。まず人工膜間で Sfh1p が PE や PS を輸送できるか検討した結果、Sfh1p は PE を輸送できるが PS を輸送できないことが分かった。また出芽酵母細胞内における Sfh1p のリガンドを特定するため、C 末に ZZ タグを付加した Sfh1ZZp を出芽酵母で生産、精製して脂質を抽出した。回収した脂質についてその分子種を ESI-MS/MS で解析した結果、Sfh1ZZp には主に PC、PE、PI が挿入されていることが示唆された。さらに Sfh1p が主にエンドソームや液胞に存在する微量脂質である PI(3,5)P₂ に結合することを明らかにした。ホスホイノシチドは、多くの Lipid Transfer Protein (LTP) の膜標的に重要であることから、Sfh1p がエンドソームや液胞に一過的に局在して脂質を輸送している可能性も考えられた。

以上、本研究は出芽酵母における細胞内 PE 輸送機構の解明に挑戦し、Sfh1p が PE 輸送を担うことを示唆した。さらには、これまで細胞内機能が明確には証明されていなかった Sec14p ファミリー蛋白質について、その機能がリン脂質輸送である可能性を提示した。これらは真核生物におけるオルガネラ間脂質輸送を解明する上で極めて重要な基礎的知見であり、学術的に貢献する所が少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。