

## 酵母エンドソーム選別輸送における脂質の役割の解析

基礎生物学研究所 野田健司

派遣期間 2004年5月3日～2006年12月11日

派遣機関 Cellular and molecular medicine, Medical School, University of California, San Diego, 9500 Gilman Dr. La Jolla Ca. 92037 USA

研究指導者 Prof. Scott D. Emr

### 研究成果

細胞は環境の変動に適応するために、自らを構成するタンパク質の成分の存在比を逐次変えていき、例えば単細胞生物の細胞膜では栄養状況の変化に応答して種々の輸送体の構成を最適化していく。ここでは、新しい環境に必要とされる分子を新たに合成することと同時に、エンドサイトーシスにより不必要となった分子を除去する。単細胞生物から獲得したこのエンドサイトーシスの機構は、多細胞生物において発生・分化や高次生物現象を調節するよう周囲の細胞とコミュニケーションするために、細胞膜で発現している様々な重要な膜分子の量的調節に使われている。そこに関わる分子機構は進化を通じて著明に保存されており、酵母のような単細胞生物からヒトまで、共通の視座からその分子機構の基盤・原理について見据えることを可能である。マルチベシキュラー・ボディとは、その内腔に多数の小胞を宿しているという形態的な特徴を有したオルガネラのことであり、ダイナミックな形態をとるエンドソームの一部であるが、後期エンドソーム、あるいは初期エンドソームおよびそれから後期エンドソームへ転換する過程の構造に相当すると目されている場合が多い。これら多数の小胞は、そのオルガネラの境界膜の一部がその内腔に向かい陥入することにより形成される。MVB (multivesicular

body) 経路とは小胞輸送により他のオルガネラからマルチベシキュラー・ボディ上に到達した膜タンパク質が、形成された小胞へ積載されその内腔へと輸送されていくタンパク質の輸送経路のことである。大きく分類して2種類のカーゴ(積み荷)タンパク質がMVB経路を経由する。一つは輸送体や信号受容体をはじめとした細胞膜で機能する膜タンパク質である。また液胞の内腔において機能するプロテアーゼなどのタンパク質もその生合成過程でMVB経路を利用する。MVB経路のカーゴタンパク質は、基本的にリソソーム・液胞(酵母等でリソソームに相当)の内腔へ送り込まれ、そこで小胞の膜成分が分解される。その結果カーゴタンパク質は液胞・リソソームのプロテアーゼに分解をされるが、生合成経路としてMVB経路を用いるカーゴタンパク質は、内腔で可溶性のタンパク質として機能することになる。

MVB経路へ積み荷として入るため何らかの選抜が行われており、そのシグナルが積み荷タンパク質にユビキチンが荷札(タグ)として付加することである。

ユビキチンが付加されることがその選別の十分なシグナルとして機能し、例えばDPAPBにユビキチンを人為的に融合させるとMVB経路へと輸送されるようになる。そこには大きく分けて積み荷にユビキチンタグを付け、それを輸送分子が認識し選別し、ユビキチンを回収するという三段階のステップが存在する。この選別のステップでは酵母の一連の変異株の原因遺伝子として得られたVps (Vacuolar protein sorting) 遺伝子群が重要な因子であった。60近いvps変異体が形態学的な特徴に従いいくつかのクラスに分類され、それらのうちでクラスE Vps表現型とは正常なマルチベシキュラー・ボディが形成されず、代わりに液胞の近傍に層状に積み重なったような異常な膜が存在する一群の変異株である。クラスE Vpsタンパク質の多くは、ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-I, II, IIIと名付けられた複合体のサブユニットである。一方これまでMVB経路における脂質の役割はあまり明らかになっていない。出芽酵母において唯一のフォスファティジルイノシトール3, 5リン酸キナーゼをコードするFab1遺伝子の欠損では、multivesicular body輸送の欠損があることが知られていた。そこではじめにFab1遺伝子のキナーゼ領域にランダムに変異を導入し、その活性が温度感受性を示す変異遺伝子アレルを取得した。FAB1と協調的に働く遺伝子を取得する目的で、その新規アレルfab1-17を用いSGA法を利用したスクリーニングを行った。SGA法は酵母全遺伝子約6000のうち生育に必須でないおよそ5000の遺伝子をそれぞれ破壊した株のコレクションに、今回作成したFAB1温度感受性遺伝子を導入し、2重変異により増殖に欠損を引き起こす遺伝子をスクリーニングする方法である。

スクリーニングの結果65の遺伝子がFAB1と合成成長阻害を起こすことが明らかになった。それらをさらに精査した結果、Fig4およびHrr25遺伝子の重要な役割が明らかになった。

Fig4はこれまでフォスファティジルイノシトール3,5リン酸を脱リン酸化するフォスファターゼであることが報告されていたタンパク質であるが、本研究の結果、フォスファターゼの機能に加えてフォスファティジルイノシトール3,5リン酸キナーゼの活性化因子であることが明らかになった。

Hrr25は、これまで役割があまり知られていないプロテインキナーゼであるが、multivesicular body輸送に関わることが示された。Hrr25欠損株では、2つの液胞酵素と、一種類の細胞膜タンパク質の輸送が欠損を示した。しかしこれは輸送基質のリン酸化を通じて欠損を示すわけでないことからmultivesicular body輸送過程の分子装置そのものになんらかの欠損を示すことが示唆された。

さらに特にフォスファティジルエタノールアミンに注目しリン脂質の役割の解析をおこなった。フォスファティジルエタノールアミンは酵母の生育に必須であるが、培地中にエタノールアミンを添加することに依存して、その生合成経路をバイパスさせることが可能であり、逆に培地からエタノールアミンを欠失させることで細胞内からフォスファティジルエタノールアミンを枯渇させることができる。そのようにフォスファティジルエタノールアミンを枯渇させた細胞中ではmultivesicular body輸送過程に欠損を示した。フォスファティジルエタノールアミンの特異的な役割が明らかになった。