

学位論文の要旨

論文題目 酵母におけるセラミドの非小胞輸送に関する研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

学生番号 D174413

氏名 池田 敦子

脂質は生体膜の重要な構成要素であり、膜上では多種類の脂質が不均一かつ複雑に配置されている。細胞が生命活動を正常に行う上で、細胞膜の脂質の存在量や分布は正常に保たれている必要がある。そのために、脂質合成の場である小胞体から機能すべき場所への輸送や選別は厳密に制御されていると考えられる。酵母細胞において、セラミドは小胞体で合成され、ゴルジ体へ運ばれた後複合スフィンゴ脂質の一つであるイノシトールリン酸セラミド(IPC)へ変換される。小胞体とゴルジ体はそれぞれの膜によって区画化されているため、セラミドがその間を移動するためには適切な輸送過程が必要になる。セラミドの輸送は、輸送小胞を介する小胞輸送およびそれを介さない非小胞輸送によって行われることが知られている。酵母におけるセラミドの小胞輸送についてはこれまでに多くの知見が得られている。一方の非小胞輸送については、ヒト細胞においてセラミドを特異的に輸送するタンパク質として *ceramide transport protein (CERT)* が知られているが、酵母細胞には *CERT* のホモログが存在しない。そのためセラミドの非小胞輸送に関与する未知の因子の存在が示唆されているが、実体は不明である。そこで、本研究では、酵母のセラミドの非小胞輸送に関わる因子を明らかにすることを目的とした。具体的には、候補として見出した *Tcb* タンパク質ファミリーのセラミド非小胞輸送における役割について、および他の細胞機能との関連について解析を行った。

1. *TCB* 遺伝子破壊株における表現型の解析

Tcb タンパク質ファミリーをコードする *TCB* 遺伝子 (*TCB1*, *TCB2*, *TCB3*) を破壊した株は、スフィンゴ脂質合成の初期ステップを阻害する薬剤である *myriocin* に対して感受性を示すことが報告されている。また当研究室でのこれまでの解析から、スフィンゴ脂質合成に損傷を持つ細胞では、液胞が断片化することが明らかにされている。本研究の解析において、*TCB1* 遺伝子と *TCB3* 遺伝子の単独破壊株は *myriocin* に対して感受性を示し、*TCB* 遺伝子の各単独破壊株および三重破壊株の液胞が断片化していることが見出されたことから、*Tcb* タンパク質がスフィンゴ脂質の代謝に関与している可能性が示唆された。

2. *Tcb* タンパク質の局在性の解析

Tcb タンパク質は、小胞体膜への局在化に必要な膜貫通ドメイン、カルシウムイオンに依存して脂質と結合する C2 ドメイン、脂質結合および脂質輸送能をもつと推定される *SMP* ドメインという 3 つの機能性ドメインから構成される。C 末端に GFP をタグ付けし *TDH3 promoter* 下で恒常的に過剰発現させた *Tcb3-GFP* は、細胞膜に近接したメッシュ状の小胞体である cortical ER (cER) だけでなく核の外膜とつながった perinuclear ER (nER) にも局在した。全てのドメインを所有する *Tcb3(Full)-GFP* と比較して、C2 ドメインを欠いた *Tcb3(ΔSMP-C2)-GFP* や *Tcb3(ΔC2)-GFP* は nER に強く局在し、cER への局在比率が減少した。興味深いことに、*Tcb3-GFP* の一部がドット状の局在

を示した。Tcb3-GFP のドットを持つ細胞の割合は、C2 ドメインを欠いた Tcb3(Δ SMP-C2)-GFP や Tcb3(Δ C2)-GFP を発現させた細胞では減少した。これらの結果から、Tcb3-GFP の cER への局在とドット形成には Tcb3 の C2 ドメインが関与していることが示唆された。さらに、Tcb3-GFP のドットはゴルジ体と近接しており、ゴルジ体の中間層と優先的に共局在することが分かった。したがって、Tcb3 の一部は小胞体とゴルジ体膜が近接している領域(membrane contact site; MCS)に局在することが示唆された。

内在性の *TCB3* promoter 下で発現させた Tcb3-GFP は cER に局在するが、小胞体ストレスを誘導させると Tcb3-GFP のドットを持つ細胞の割合が増加することを見出した。また、このときの Tcb3-GFP のドットはゴルジ体中間層と隣接して局在している様子が見られた。このことから、小胞体ストレス時に Tcb3 が小胞体とゴルジ体膜の MCS に局在化することが示唆された。また、タイムラプス観察において、Tcb3-GFP とゴルジ体が接触したり乖離したりする様子が見られ、小胞体とゴルジ体膜の MCS がダイナミックな挙動をしていることが明らかとなった。

3. 小胞体-ゴルジ体コンタクトサイトの形成に関する解析

MCS は、脂質代謝、シグナル伝達、低分子の輸送やオルガネラの形態制御など様々な生命現象に関与していると考えられている。過去の *in vitro* のから、よってセラミドの非小胞輸送は ATP 非依存的であるが、小胞体とゴルジ体膜の MCS を必要とすることが示唆されている。そこで、小胞体とゴルジ体膜の MCS の形成に Tcb タンパク質が関与しているかを調べた。その結果、*TCB* 遺伝子の破壊株では野生株と比較して、cER または nER と接しているメディアルゴルジが顕著に減少していた。また、*TCB3* 遺伝子の破壊株に Tcb3 を過剰発現させたところ、小胞体とゴルジ体膜間の MCS 形成の回復が見られた。SMP ドメインを欠いた Tcb3(Δ SMP)も MCS の形成を回復させたが、C2 ドメインを欠いた Tcb3(Δ SMP-C2)および Tcb3(Δ C2)は回復させなかった。これらの結果から Tcb タンパク質が繫留因子(tether)として小胞体とゴルジ体膜の MCS の形成に関与することが示唆された。また、Tcb3 の C2 ドメインがその機能に重要であることが示唆された。

4. 小胞輸送における Tcb タンパク質の機能解析

小胞体からゴルジ体への小胞輸送に Tcb タンパク質が関与するかどうかを調べた。GPI アンカー型タンパク質である Gas1 および非 GPI アンカー型タンパク質である carboxypeptidase Y は、小胞輸送によって小胞体からゴルジ体、そして細胞膜や液胞へ運ばれる過程で成熟型へと変換される。*TCB* 遺伝子の破壊は、これらのタンパク質の成熟の程度に影響を及ぼさなかったことから、Tcb タンパク質は小胞輸送経路には関与していないことが示唆された。また、小胞体から輸送小胞が出芽する場である ER exit sites (ERES)の数を調べたところ、野生株と *TCB* 遺伝子破壊株の間に有意な差は見られなかったことから、*TCB* 遺伝子の破壊株では ERES の形成が正常であることが示唆された。これらの結果と一致して、Tcb3-GFP のドットは ERES と共局在しなかった。

5. セラミド非小胞輸送における Tcb タンパク質の機能解析

セラミドの非小胞輸送経路に Tcb タンパク質が関与するかどうかを調べた。小胞体からゴルジ体への小胞輸送がブロックされる *SEC* 遺伝子変異株において、*TCB* 遺伝子破壊は IPC 合成量を減少させた。この結果から、Tcb タンパク質は非小胞輸送依存的な IPC 合成に関与していることが示された。また、*TCB* 遺伝子の破壊は、IPC 合成酵素の活性低下や基質であるセラミドの合成の異常によるものではないことが示された。以上の結果を併せて考えると、IPC 合成における *TCB* 遺伝子破壊の影響は、セラミドを IPC 合成酵素がある区画へと送り届ける過程であると考えられるため、Tcb タンパク質はセラミドの非小胞輸送に関与していることが強く示唆された。

Tcb3 の過剰発現は、*SEC* 遺伝子変異株において IPC の合成量を増加させた。このときタンパク質の輸送に影響は見られなかったことから、Tcb3 の過剰発現がセラミドの非小胞輸送を促進させることが示唆された。SMP ドメイン、C2 ドメインのいずれかまたは両方を欠いた Tcb3 タンパク質の過剰発現は *SEC* 遺伝子変異株における IPC の合成を促進させなかった。C2 ドメインを欠いた Tcb3 タンパク質が IPC 合成を促進させなかったのは、小胞体とゴルジ体間の MCS を形成できないことが原因

であると考えられる。これに対して、SMP ドメインを欠いた *Tcb3* タンパク質を発現する細胞では MCS の形成が正常に起こることから、SMP ドメインの欠損により、膜からのセラミドの引き抜きやゴルジ体への受け渡しができなくなっている可能性が考えられる。

6. セラミド非小胞輸送と他の細胞機能との関係に関する解析

小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送に障害を持つ細胞では、セラミドが小胞体に異常蓄積していると考えられる。小胞体における脂質の過剰な蓄積は小胞体ストレスを引き起こすことから、細胞にとって有毒である。その毒性を緩和させるため、細胞は、過剰に生産された脂質を中性脂質へと変換されて脂肪滴(lipid droplet; LD)に隔離させる仕組みを備えている。*TCB* 遺伝子の破壊株ではアシルセラミドが蓄積していたことから、*Tcb* タンパク質の欠損によるセラミド非小胞輸送の障害は LD 形成を促進させる可能性が考えられる。そこで LD の観察を行った結果、*TCB* 遺伝子の破壊株で LD の形成が増加していた。また、非許容温度の *SEC* 遺伝子変異株でも LD の増加が見られ、*SEC* 遺伝子変異株の *TCB* 遺伝子を破壊することでさらに増加した。このことから、セラミドの輸送障害によって蓄積したセラミドがアシルセラミドへ変換し、それによって LD の形成が促進したと考えられる。

Tcb3 の過剰発現は、非許容温度の *SEC* 遺伝子変異株における LD 形成の増加を抑圧した。このことは、小胞輸送の障害による LD 形成の増加をセラミドの非小胞輸送が緩和できることを示しており、小胞輸送の異常により蓄積したセラミドが非小胞輸送を介してゴルジ体へバイパスされることを示唆している。

総括

本研究の解析において、*Tcb* タンパク質は小胞体とゴルジ体膜の MCS の形成にも関与しており、セラミドの非小胞輸送において重要な役割を持つことが明らかとなった。また本研究では、*Tcb* タンパク質による小胞体からゴルジ体へのセラミドの非小胞輸送の促進がセラミドの有毒な蓄積を防ぎ、LD 形成を押さえる役割があることが示唆された。以上のことは、セラミドの輸送がセラミドの量を適切に保つために重要であることを示している。