

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目

The roles of membrane contact sites in ceramide trafficking and intracellular homeostasis

(セラミドの輸送と細胞内ホメオスタシスにおける膜接触部位の役割に関する研究)

広島大学大学院統合生命科学研究科

プログラム Program of Food and AgriLife Science

学生番号 D213444

氏 名 SCHLARMANN, PHILIPP CHRISTOPH JOSEPH

スフィンゴ脂質は膜脂質の一種であり、その分子構造や細胞内局在によって様々な機能を持つ。構造的に単純なスフィンゴ脂質の前駆体であるセラミドは、小胞体に蓄積するとアポトーシスを誘導することが知られている。一方、構造的に複雑なスフィンゴ脂質は、細胞増殖時に細胞膜を成長させるのに必須である。スフィンゴ脂質は細胞の生死を制御するため、スフィンゴ脂質代謝の破綻は、無秩序な細胞増殖を特徴とする癌の発生と関連している。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* とヒト細胞では、スフィンゴ脂質のホメオスタシスとアポトーシスの制御において大きな相同性を持つことから、出芽酵母はスフィンゴ脂質を研究するモデル生物として用いられてきた。出芽酵母におけるセラミドのイノシトールホスホリルセラミド (IPC) への変換は、小胞体セラミドレベルを維持するための主要な方法であり、ゴルジ体で行われる。セラミドは GPI アンカー型タンパク質とともに COPII 小胞に選別されるか、小胞体-ゴルジ体膜接触部位 (メンブレンコンタクトサイト; MCS) を介した非小胞輸送によってゴルジ体に輸送される。最適な生育条件下ではそれほど重要ではないが、セラミドの非小胞輸送と小胞体-ゴルジ体 MCS 形成は、セラミドレベルの上昇を引き起こすストレス条件下で誘導される。そのため、セラミドの非小胞輸送は、セラミド毒性に能動的に対応するメカニズムであると考えられる。哺乳動物細胞では、小胞体-ゴルジ体 MCS におけるセラミドの非小胞輸送はよく特徴付けられている。哺乳類におけるセラミド輸送の特徴の一つは、セラミドがその種類に基づいて異なる経路に振り分けられることである。長鎖セラミドは小胞輸送により、短鎖セラミドは CERT を介した非小胞輸送により輸送される。酵母において、哺乳動物細胞と同様にセラミドサブクラスが別々の経路に分かれているかどうかは不明であり、本論文の第 I 章で取り上げる。酵母では、CERT のようなセラミド輸送タンパク質はまだ同定されていないが、いくつかの小胞体-ゴルジ体テザータンパク質が、ストレス条件下でセラミドの非小胞輸送を促進することが示された。テザータンパク質は、対向する 2 つの膜のいずれかに結合し、それによってオルガネラ間の物理的な結合を確立し、MCS を形成する。酵母におけるセラミドの非小胞輸送に関連するテザータンパク質として、トリカルピentanパク質 (Tcb1、Tcb2、Tcb3) および Nvj2 が同定された。これらはそれぞれ、通常は小胞体-細胞膜および小胞体-液胞の MCS に局在するが、小胞体ストレスにより小胞体-ゴルジ体の MCS にリクルートされる。

セラミドを IPC に変換する以外に、セラミドをアシルセラミドに変換して脂質滴 (リピッドドロップレット; LD) に貯蔵することも、毒性的なセラミドの蓄積を減らすもう一つの方法である。

哺乳動物細胞において、セラミドのアシル化は、化学療法によるアポトーシスに対する抵抗性を引き起こすことが知られている。出芽酵母を用いたこれまでの研究で、*Nvj2* とトリカルビンの欠失はともに LD を伴う応答を引き起こすことが示された。アシルセラミド合成酵素とともに *Nvj2* を欠失させると成長障害が起こる一方で、*Tcb3* を欠失させると LD とアシルセラミドの蓄積が誘導される。これらの結果は、セラミドの非小胞輸送と LD 機能との直接的な関連を示しているのかもしれない。本研究では、テザータンパク質が LD からゴルジ体へのアシルセラミドの輸送を促進するという仮説を立てた。このモデルの検証を、本論文の第 II 章で行った。

MCS は、セラミドの輸送とホメオスタシスを制御する以外にも、様々な細胞機能の制御に関与している。しかし、MCS が遺伝子発現を制御しているかどうかは不明である。本論文の第 III 章では、遺伝子発現制御におけるトリカルビタンパク質の役割を調べた。

本論文では、セラミドの輸送とホメオスタシスにおける MCS の新規機能を明らかにすることを目的とし、以下の 3 つのプロジェクトの成果を報告する。

第 I 章：出芽酵母において、セラミドの非小胞輸送への選別はアシル鎖の長さに依存しない

内在性セラミド合成酵素をコットン由来の *GhLag1* 遺伝子で置換した *GhLag1* 株は、C26 ではなく C18 の短鎖セラミドを産生する。ATP 欠乏による小胞輸送の阻害、あるいは温度感受性 *sec* 変異体の使用により、WT と *GhLag1* のバックグラウンドで IPC 合成が同程度に減少することを示した。小胞輸送を阻害した際の残りの IPC 合成はセラミドの非小胞輸送の効率を示すので、この結果は、短鎖セラミドのみが存在する場合、セラミドの非小胞輸送は阻害も促進もされないことを示している。従って、この結果は、出芽酵母において、セラミドの非小胞輸送への選別がアシル鎖の長さに依存しないことを示唆している。

第 II 章：酵母における小胞体からゴルジ体へのセラミドの非小胞輸送に LD が関与する

第 II 章では、酵母の LD がセラミドの非小胞輸送に直接関与しているかどうかを調べた。本研究では、ER、LD、ゴルジ体を含む新しい三者間 MCS に局在するテザータンパク質を発見した。さらに、小胞輸送を阻害し、加えて LD 合成を欠損させると、生育障害と IPC 合成の減少が見出した。これは、LD がゴルジ体へのセラミドの非小胞輸送に関与し、セラミドの蓄積を緩和することを示唆している。これらの結果に基づき、セラミドの非小胞輸送には、セラミドのアシルセラミドへの中間変換と LD への取り込みが必要であるというモデルを提案する。

第 III 章：膜接触部位テザーのトリカルビンファミリーは *S. cerevisiae* のグルコースに対する転写応答に関与する

第 III 章では、遺伝子発現における MCS の役割を調べるため、RNA シーケンス解析を行った。その結果、*tcb1Δ2Δ3Δ* 株では、解糖、発酵、アミノ酸合成、低親和性グルコース取り込みなど、高グルコース環境に応答する経路がアップレギュレートされていることがわかった。逆に、TCA 回路、呼吸、高親和性グルコース取り込みなど、グルコース枯渇時に重要な経路は、発現が低下していた。さらに、グルコース代謝における *tcb1Δ2Δ3Δ* の遺伝子発現の変化が、増殖、グルコース消費、CO₂ 産生、エタノール生成の増加と相関することを示した。結論として、これらの発見は、トリカルビタンパク質の欠失が、高グルコース環境に対する細胞応答を模倣した遺伝子発現パターンを示すことを明らかにした。このことは、MCS がグルコースに応答して遺伝子の転写を調節する感知およびシグナル伝達経路において役割を果たしていることを示唆している。