

生体膜脂質の代謝調節機構とその生理的意義の解明

谷 元洋

(九州大学大学院 理学研究院化学部門)

研究の目的

生体膜脂質二重層を構成する膜脂質には、グリセロリン脂質とスフィンゴ脂質の大きな二グループが知られており、その分子種は数千に及ぶとされている。しかも細胞の各機能ユニットにおいて、その組成は固有であり且つ厳密に調節されている。この膨大な構造多様性と脂質組成の維持は、生体膜が細胞の生命維持に必要な様々な機能を担うために必須であるとされている。しかし生体膜脂質の代謝制御機構の大部分は不明である。これまでに我々は、出芽酵母を用いて、複合スフィンゴ脂質の代謝異常が誘導する生育阻害に対して、高感受性を示すような酵母変異株の探索を行ってきた¹⁾。その結果、ホスホイノチシドホスファターゼ遺伝子 (*SAC1*)欠損によるホスファチジルセリン (*PS*)の低下が高感受性を誘導することを明らかにしてきた。本研究では、*SAC1* 欠損による *PS* 低下のメカニズム解明を目指し研究を行った。

方法

³²P 無機リン酸で出芽酵母を代謝標識し、リン脂質を抽出、TLC でその組成パターンを解析した。また細胞内 *PS* の分布は *PS* の特異的プローブである GFP 融合 Lactadherin C2 domain²⁾を用い、蛍光顕微鏡下で観察を行った。

結果

SAC1 欠損株では *PS* の合成速度が低下している

これまでの研究で、*SAC1* が欠損することで *PS* が低下することを見出しているが¹⁾、そのメカニズムは不明であった。今回、³²P 無機リン酸での短時間のパルスラベルを行うことで主要リン脂質 (ホスファチジルコリン (*PC*)、ホスファチジルエタノールアミン (*PE*)、ホスファチジルイノシトール (*PI*)、ホスホイノチシド (*PIP*)、*PS*)の合成速度を野生株と *SAC1* 欠損株で比較した (Fig. 1A)。その結果、*PS* の合成速度のみが顕著に低下することが判明した。*PS* は CDP-ジアシルグリセロールとセリンから *PS* 合成酵素 (*Pss1*)を介して生合成された後、*PS* 脱炭酸酵素 (*Psd1*, *Psd2*)によって *PE* へと変換される³⁾。そこで、*PSD1*, *PSD2*, *SAC1* の三重欠損株を作製し、リン脂質の合成速度を調べた結果、*PSD1*, *PSD2* 二重欠損株と比較して三重欠損株の *PS* 合成速度は有意に低下していた (Fig. 1B)。しかしながら一方で、*PS* 合成酵素の発現量や細胞内局在は *SAC1* 欠損では変化はしなかったことから、*PS* 合成低下は *PS* 合成酵素の量的変化によって起こる現象ではないことが示唆された⁴⁾。

ホスホイノチシドの代謝バランスの崩壊が *PS* の合成低下をもたらす

Sac1 の *PIP* ホスファターゼ活性が *PS* 合成維持に重要な役割を調べるために、*SAC1* 欠損

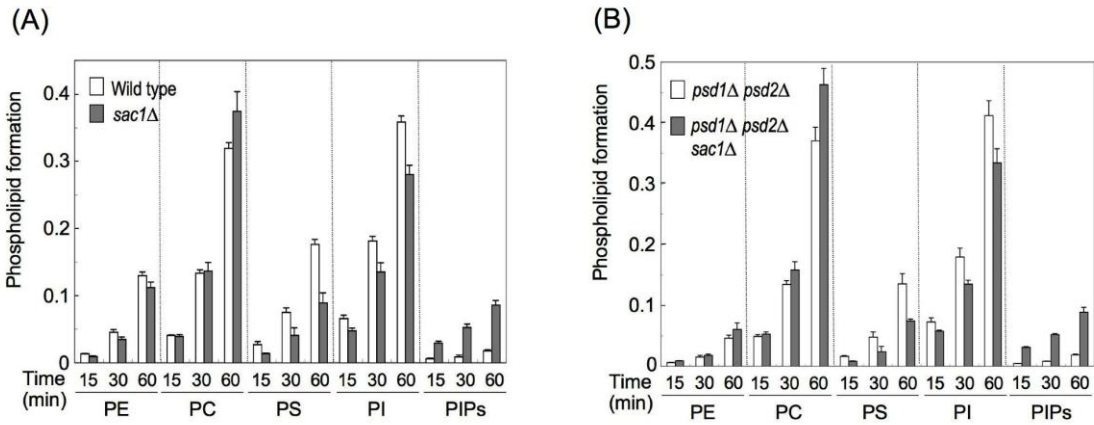


Fig. 1. Pulse radiolabelling of *SAC1*-deleted cells with [³²P]

株に catalytic inactive form である *Sac1*-C392S 変異体を発現させたが、PS 合成の回復は認められなかった。*SAC1* 欠損は、PI(4)P の過剰蓄積を引き起こす。この PI(4)P は PI 4-kinase の一つである *Stt4* によって生成されたものであることが知られている³⁾。つまり、*Stt4* による PI(4)P 合成を抑制してやれば、*SAC1* 欠損株での PI(4)P 蓄積が抑えられ、PS 合成低下が回復すると考えられる。そこで、*Stt4* の発現抑制と *SAC1* 欠損を組み合わせることで PS 量にどのような影響が出るのか解析した。その結果、予想外にも *Stt4* を単独で発現抑制させても PS は減少し、*Stt4* 発現抑制と *SAC1* 欠損の二重変異によって更に減少することが判明した (Fig. 2A)。*SAC1* 欠損は、*Vps34* 由来の PI(3)P の蓄積を引き起こすため、*Sac1* 発現抑制と *VPS34* 欠損の二重変異株の PS 量を調べた。その結果、*Stt4* の場合と同様に二重変異では PS 量が更に低下することが確認された (Fig. 2B)。以上のことより、細胞内における PIP の正常な代謝バランスの崩壊が PS 合成に大きく影響を与えることが示唆された⁴⁾。

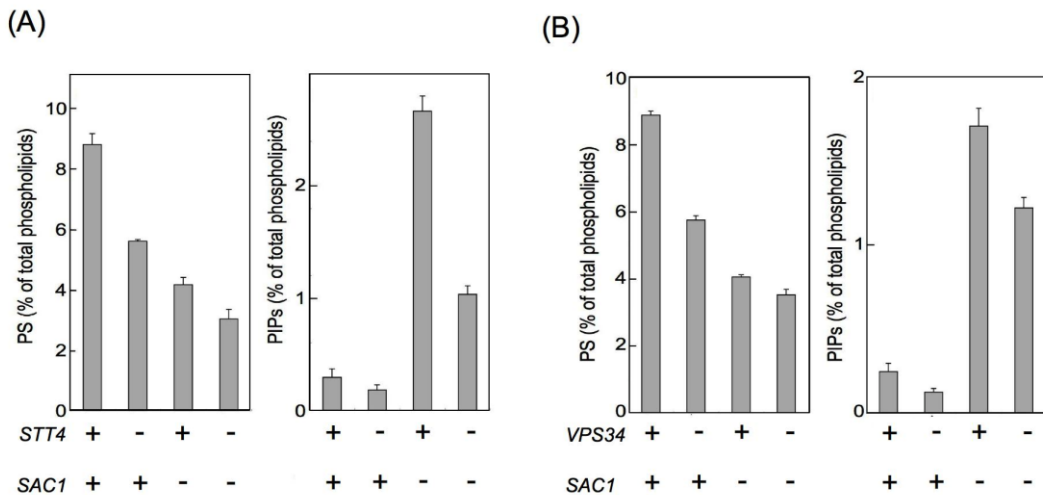


Fig. 2. Effects of mutation of *SAC1*, *STT4*, and *VPS34* on PS and PIP levels.

SAC1 欠損株では PS の液胞への異常分布が観察される

SAC1 欠損の細胞内 PS 分布への影響を調べるために、PS の特異的プローブである GFP 融合 Lactadherin C2 domain²⁾を *SAC1* 欠損株に発現させ観察を行った。野生株では形質膜に PS が優位に存在することが確認されたが、*SAC1* 欠損株では PS が細胞内に異常分布することが

明らかとなった (Fig. 3A)。SAC1 欠損株において PS は主に液胞に蓄積していることが示唆された (Fig. 3B)。このように SAC1 欠損によって、PS の合成低下のみでなく PS の細胞内局在にも異常が生じる事がわかった⁴⁾。

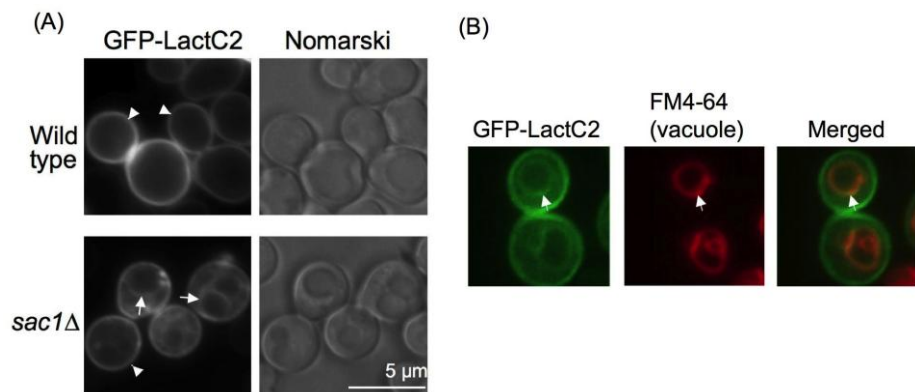


Fig. 3. Distribution of GFP-Lact-C2 in *sac1Δ* cells.

結論

本研究によって PIP の正常な代謝が維持できなくなると細胞内 PS の量と局在に大きな影響が出る事が明らかとなった。これは、生体膜における異なる分子種のリン脂質同士の機能的ネットワークの存在を示唆している。実際、これまでも PS と複合スフィンゴ脂質といった異なるリン脂質間における機能的相互作用の存在が示されている^{1,5)}。出芽酵母において PS は生命維持に必須なリン脂質ではないが、細胞内小胞輸送等様々な生物現象に関与することが知られている。ホスホイノシチドによる PS の量及び局在制御の生理的意義は今後の課題である。

文献

- 1) Tani M, and Kuge O. (2010) Requirement of a specific group of sphingolipid-metabolizing enzyme for growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* under impaired metabolism of glycerophospholipids. *Mol Microbiol.* **78**: 395-413.
- 2) Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A. and Grinstein, S. (2008) Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* **319**: 210-213.
- 3) Henry, S. A., Kohlwein, S. D. and Carman, G. M. (2012) Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**: 317-349.
- 4) Tani M, and Kuge O. Involvement of Sac1 phosphoinositide phosphatase in metabolism of phosphatidylserine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (2014) *Yeast* **31**: 145-158.
- 5) Tani M, and Kuge O. Involvement of complex sphingolipids and phosphatidylserine in endosomal trafficking in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (2012) *Mol Microbiol.* **86**: 1262-1280.