

真菌感染症の予防を目指した脂質非対称シグナル伝達機構の解明

小原 圭介

名古屋大学大学院 理学研究科

研究の目的

病原性真菌が臓器内部に侵入する深在性真菌感染症は致死率が高く、人類の大きな脅威となっている。また、稲熱病やうどんこ病などの真菌感染症は農作物を脅かし続けている。病原性真菌は真核生物であるため、薬剤で副作用なく攻撃できる箇所が限定される。近年、細胞膜の脂質非対称（内外層で脂質組成が異なること）の乱れに対して適応反応を引き起こす Rim101 経路が、病原性真菌の宿主内での増殖に必須であることが判明した。私は以前に脂質非対称の変化を感知する脂質非対称センサー Rim21 を出芽酵母で同定し、Rim101 経路の一連を解明してきた。Rim21 は、Rim101 経路を最上流で司り、かつ細胞表面に露出していることから真菌感染症の新たな創薬標的として理想的である。Rim101 経路の中で、大きな未解明部分は Rim21 が脂質非対称の状態変化を感知してシグナルを次の因子に出力する分子機構である。本研究ではこの部分を解明し、Rim21 を真菌感染症の創薬標的として確立するための知的基盤を形成することを目指した。

方法

Rim21 は C 末端側の細胞質領域（Rim21C）を触角の様に用いて細胞膜内層との相互作用を繰り返すことで脂質非対称の状態をモニターする¹。そこで、Rim21C 部分の組換えタンパク質を調整し、脂質分子との相互作用を lipid overlay assay で解析した。大腸菌や動物細胞を用いた発現系では Rim21C 組換えタンパク質の十分な発現が認められなかったため、コムギ胚芽抽出液の *in vitro* 発現系を用いた。

Rim101 経路のシグナル伝達には、ユビキチンリガーゼ Rsp5 が必要である²。そこで、Rim21 がユビキチン化を受けているか否かを調べた。His タグを付加したユビキチンを発現した細胞から pull-down 法でユビキチン化 Rim21-HA を精製した。網羅的な解析から Rim21 の K363 残基がユビキチン化されることが報告されている。そこで、Rim21(K363R)変異体を用いて Rim101 経路の進行や Rim21 のユビキチン化の有無を調べた。

ユビキチンリガーゼ Rsp5 が持つ 3 つの WW ドメイン（基質認識ドメイン）にそれぞれ点変異を導入した細胞株を用いて、Rim101 経路の進行に関わる WW ドメインを調べた。WW ドメインが認識するとされる基質の PxxY モチーフに類似した配列が Rim21 に一箇所存在した。そこで、このモチーフに変異を導入した Rim21 を作製し、Rim101 経路の活性化をモニターした。

C. glabrata の Rim21C に相当する部分をクローニングし、GFP 融合タンパク質として出芽酵母細胞に発現し、脂質非対称変化に対する挙動を追跡した。

結果

コムギ胚芽抽出液の *in vitro* タンパク質発現系を用いて GST-Rim21C を発現したところ、大腸菌や動物細胞ではほとんど認められなかった発現が確認できた。これを精製したところ、lipid overlay assay に必要な収量が得られた。精製した GST-Rim21C を用いて lipid overlay assay を行ったところ、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール (4,5) ニリン酸など、負電荷を有する脂質との結合が見られた (図 1)。私たちは、酵母細胞を用いたこれまでの解析から、Rim21C 内

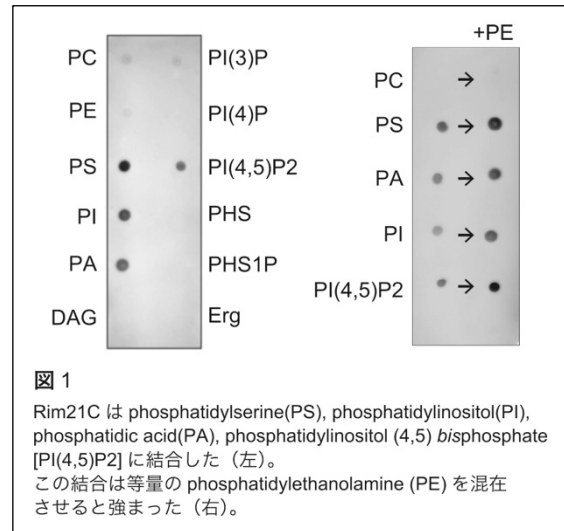


図 1
Rim21C は phosphatidylserine(PS), phosphatidylinositol(PI), phosphatidic acid(PA), phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate [PI(4,5)P2] に結合した (左)。この結合は等量の phosphatidylethanolamine (PE) を混在させると強まった (右)。

の塩基性アミノ酸残基が細胞膜への結合に必要であり、酸性残基のクラスターが細胞膜からの反発に必要であると提唱している¹。今回の結果は、この仮説を支持する結果となった。ホスファチジルエタノールアミンは電荷を有していないが、そのほとんどが細胞膜内層に存在し、脂質非対称性を象徴する脂質である。そこで、ホスファチジルエタノールアミンを結合が確認された先述の脂質と混合して lipid overlay assay を行ったところ、Rim21C との結合が増強された。ホスファチジルエタノールアミンはプロトン受容能を持つアミノ基を有しているため、負電荷を有する脂質の平衡がより負に傾いたためだと考えられる。

His タグ付きユビキチンを発現する細胞の膜面分からユビキチン化タンパク質を pull-down したところ、ユビキチン化された Rim21 が検出された。Rim101 経路が活性化するアルカリストレス下では、Rim21 のユビキチン化が亢進していた。これまでにユビキチン化が報告されている K363 残基に変異を導入したところ、Rim101 経路不活性化時には Rim21 のユビキチン化はほぼ完全に失われたが、アルカリストレス下には Rim21 のユビキチン化は減少したものの残存していた。また、Rim21C 内に存在する PxxY 類似モチーフに変異を導入

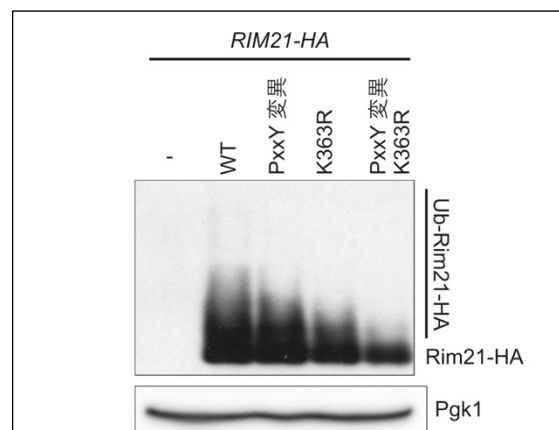


図 2
Rim101 経路を活性化させると Rim21-HA のユビキチン化が亢進した (WT; Ub-Rim21-HA)。PxxY 類似モチーフの変異体や K363 残基の変異体ではユビキチン化修飾が減少し、両者の二重変異体ではほぼ完全に消失した。

するとユビキチン化は減少した。K363 残基への変異と PxxY 類似モチーフへの変異を組み合わせると Rim21 のユビキチン化はアルカリストレス下でもほぼ完全に消失した (図 2)。それぞれの変異体でアルカリストレスによって Rim101 経路を刺激したところ、K363 部位の変異は Rim101 経路の進行に影響を及ぼさなかった。一方、PxxY 類似モチーフの変異体では Rim101 経路の活性化がほぼ完全に失われていた。

Rsp5 に存在する 3 つの WW ドメインに点変異を導入すると、3 つ目の WW ドメインに変異を導入した場合に Rim101 経路の活性化が大きく損なわれた。

C. glabrata の Rim21C に GFP を融合し、出芽酵母細胞で挙動を調べたところ、出芽酵母の GFP-Rim21C の場合と同様に、通常は細胞膜に結合し、脂質非対称が変化した変異体では細胞膜から解離した。

結論

Rim21C は負電荷を有する幾つかの脂質と結合する。また、ホスファチジルエタノールアミンが共存するとその結合が強まる。結合した酸性脂質とホスファチジルエタノールアミンは、いずれもそのほとんどが細胞膜では内層に存在しているため、実際の細胞内でも Rim21C と相互作用し得るトポロジー関係にある。脂質非対称の変化に伴って起こる細胞膜内層の負電荷の増減を Rim21C が感知して、内層から解離することでシグナル伝達が発火する可能性がある。

Rim21 はユビキチン化修飾を受けており、Rim101 経路活性化時にはユビキチン化が亢進する。既知の K363 残基以外にもユビキチン修飾を受けており、Rim101 経路の活性化にはその K363 残基以外のユビキチン化が重要である。Rim21 のユビキチン化および Rim101 経路の活性化には Rim21C 内に存在する PxxY 類似モチーフが必要である。

Rsp5 は 3 つ有する WW ドメインのうち、主に 3 番目の WW ドメインを用いて Rim21C を認識してユビキチン化すると考えられる。

C. glabrata の Rim21C 部分は、脂質非対称変化に応じて出芽酵母の Rim21C と同様の挙動を示す。出芽酵母の Rim21 の詳細な機能解析が真菌感染症の創薬に結びつく可能性が示された。

文献

- 1) Nishino, K., Obara, K., and Kihara, A. (2015) The C-terminal cytosolic region of Rim21 senses alterations in plasma membrane lipid composition: Insights into sensing mechanisms for plasma membrane lipid asymmetry. *J. Biol. Chem.* **290**: 30797-30805.
- 2) Obara, K. and Kihara, A. (2014) Signaling events of the Rim101 pathway occur at the plasma membrane in a ubiquitination-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **34**: 3525-3534.