膜脂質の非対称性とタンパク質輸送制御 脂質がかかわる新しい細胞機能

生体膜を形成する脂質二重層にはさまざまな脂質分子種が存在し、これら脂質の振る舞いは細胞の機能発現に重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、脂質が低分子であるためにその挙動を解析することが困難であることから、未解明な点が多いと考えられている。真核細胞の生体膜では、脂質二重層間で脂質が非対称に分布することが知られており、膜リン脂質の非対称性と呼ばれている。一般に脂質分子はそれが存在している層内では比較的自由に動くことができるが、自身では二重層間を横切ることとはできず、これには何らかのタンパク質の助けが必要と考えられている。細胞膜や細胞内膜の脂質二重層において細胞質側の層とその反対側の層（非細胞質側層）を考えたときに、非細胞質側層から細胞質側層への輸送はフリッパーと呼ばれ、この反応を進めるタンパク質はフリッパーゼと呼ばれる。したがって、フリッパーゼは脂質の非対称性形成に貢献することで何らかの役割を果たしていると考えられるが、その機能には解明すべき点が多い。Type 4 P-type ATPase (P4 ATPase) は、ATP 依存的にリン脂質をフリッパーするフリッパーゼであると考えられており、酵母からヒトまで保存されて、膜リン脂質非対称性の形成に重要な役割を担っている⁽¹⁾。これらの機能としては、輸送小胞の形成⁽²⁾や細胞極性形成⁽³⁾、また細胞運動⁽⁴⁾への関与が報告されている。またその遺伝子異常がヒト胆汁うっ滞症の原因となるフリッパーゼも知られている⁽⁵⁾。ここでは、出芽酵母において最近見いだされた、Lem3-Dnf1/Dnf2 フリッパーゼの新規な機能としてトリプトファン輸送体の細胞膜への輸送制御機構を紹介する⁽⁶⁾。

酵母の Lem3-Dnf1 および Lem3-Dnf2 フリッパーゼは非触媒サブユニット Lem3 と触媒サブユニット Dnf1 あるいは Dnf2 とからなっており、細胞膜や後期ゴルジ体 (trans-Golgi network; TGN) に局在する。まず、*lem3* 変異株では、トリプトファン輸送体 Tat2 が細胞膜へ正常に輸送されず、液胞へ誤輸送されて分解されることが見いだされた。*lem3* 変異に後期ゴルジ体から後期エンドソームへ向かう経路の遺伝子変異を加えることにより、Tat2 は再び細胞膜へと輸送されたことから、*lem3* 変異株では Tat2 が後期ゴルジ体から後期エンドソーム

を経て液胞へ輸送されることが示唆された。一方、カーゴタンパク質のユビキチン化が液胞への輸送シグナルとなることが知られている。そこで、ユビキチン化酵素である Rsp5 の変異を *lem3* 変異と組み合わせたところ、Tat2 は正常に細胞膜へと輸送された。このことは、*lem3* 変異により、後期ゴルジ体の脂質非対称性が異常となり、その結果 Tat2 のユビキチン化が引き起こされることを示唆する。Tat2 は 10 回膜貫通型タンパク質であり、その N 末端および C 末端領域は細胞質側を向いていると考えられている。以前のほかのグループの研究から、Tat2 はその N 末端領域でユビキチン化を受け、これが液胞への輸送シグナルとなることが知られていた。そこで、Tat2 の N 末端領域が膜脂質と相互作用し、この相互作用がユビキチン化制御に関与している可能性について検討した。まず、Tat2 の N 末端領域を酵母で発現して精製し、脂質リポソームとの結合を検討したところ、フォスファチジルセリン (PS) 依存的にリポソームに結合した。PS は酸性の脂質であることから、この結合には塩基性アミノ酸が関与するものと考えられた。Tat2 N 末端領域には塩基性アミノ酸に富む配列が 2 カ所 (Region 1 と Region 2) 存在し (図 1)、この領域の変異体を作成したところ、PS 含有リポソームへの結合が大きく減弱した。この変異を有する Tat2 は、正常の Lem3-Dnf1/Dnf2 をもつ株でも、細胞膜へ輸送されずにユビキチン化依存的に液胞へと誤輸送された。

以上の結果から考えられるモデルを図 2 に示した。後期ゴルジ体膜では、Lem3-Dnf1/Dnf2 フリッパーゼの作用を受けて、PS が細胞質側の層へと輸送されている。

図 1 ■ Tat2 の N 末端細胞質領域に存在する塩基性アミノ酸に富んだ領域 (Region 1 と Region 2)

Region 1 と Region 2 のアミノ酸配列を下側に示す。緑字は塩基性のアミノ酸で、このうち星印はユビキチン化を受けるリジン残基を示す。Region 2 の 2 つのリジンおよびアルギニン残基をアラニンに置換した Tat2 変異体は、PS 含有脂質リポソームへの結合に欠損を示すとともに、ユビキチン化に依存した液胞への誤輸送を示した。

図2 ■ Lem3-Dnf1/2フリッパーゼによるトリプトファン輸送体Tat2の輸送制御機構 (モデル)

リン脂質フリッパーゼが後期ゴルジ体 (TGN) 膜の細胞質側層へPSを輸送すると, Tat2 N末端領域のユビキチン化が抑制され, したがってTat2は細胞膜へと輸送される。

Tat2のN末端領域はRegion 1とRegion 2でこのPSに結合しており, このためRsp5-Bul1/2ユビキチン化酵素はTat2のN末端領域をユビキチン化できず, したがってTat2は細胞膜へと輸送される。このメカニズムがTat2の細胞膜への輸送制御にどのように関与しているのかは今後の解析を待つ必要があるが, 細胞外トリプトファンによるTat2の輸送制御や, あるいはTat2の品質管理に関与している可能性も考えられるかもしれない。

ここでは, 膜脂質の非対称性がタンパク質輸送を制御するメカニズムの一端を明らかにした。細胞内小胞輸送の分野では, そこで働くタンパク質の役割については多くが明らかにされているが, 脂質も重要な構成メンバーであるにもかかわらず, その役割については多くが不明のままである。脂質は膜タンパク質の周囲に存在し, その活性や輸送を制御している可能性が考えられる。今後さらに脂質の重要な役割が明らかにされることが期待される。

- 1) K. Tanaka, K. Fujimura-Kamada & T. Yamamoto: *J. Biochem.*, **149**, 131 (2011).
- 2) T. T. Sebastian, R. D. Baldrige, P. Xu & T. R. Graham: *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**, 1068 (2012).
- 3) K. Saito, K. Fujimura-Kamada, H. Hanamatsu, U. Kato, M. Umeda, K. G. Kozminski & K. Tanaka: *Dev. Cell.*, **13**, 743 (2007).
- 4) U. Kato, H. Inadome, M. Yamamoto, K. Emoto, T. Kobayashi & M. Umeda: *J. Biol. Chem.*, **288**, 4922 (2013).

- 5) V. A. van der Mark, R. P. Elferink & C. C. Paulusma: *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 7897 (2013).
- 6) T. Hachiro, T. Yamamoto, K. Nakano & K. Tanaka: *J. Biol. Chem.*, **288**, 3594 (2013).

(田中一馬, 鉢呂 健, 山本隆晴, 北海道大学遺伝子病制御研究所分子間情報分野)

プロフィール

田中 一馬 (Kazuma TANAKA)

＜略歴＞1981年大阪大学工学部醸酵工学科卒業／1983年サントリー(株)研究員／1986年広島大学工学部助手／1991年東京大学理学部助手／1992年神戸大学医学部助手／1994年大阪大学医学部助手, 助教授／1998年北海道大学教授＜研究テーマと抱負＞出芽酵母をモデル系に用いた, 膜脂質ダイナミクスによる細胞機能制御機構の解析＜趣味＞読書, 映画鑑賞

鉢呂 健 (Takeru HACHIRO)

＜略歴＞2005年北海道大学工学部情報工学科卒業／2013年北海道大学生命科学院博士課程修了

山本 隆晴 (Takaharu YAMAMOTO)

＜略歴＞1998年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修了／1999年北海道大学附属癌研究施設助手／2000年北海道大学遺伝子病制御研究所・助手, 助教, 現在に至る＜研究テーマと抱負＞細胞内輸送・細胞極性形成における脂質の役割＜趣味＞マラソン, 音楽・演劇鑑賞