

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 坂田 健太郎
Name

学位論文題目： 細胞膜マイクロドメインを介した酵母膜ストレス応答制御機構に関する研究
Title of Dissertation

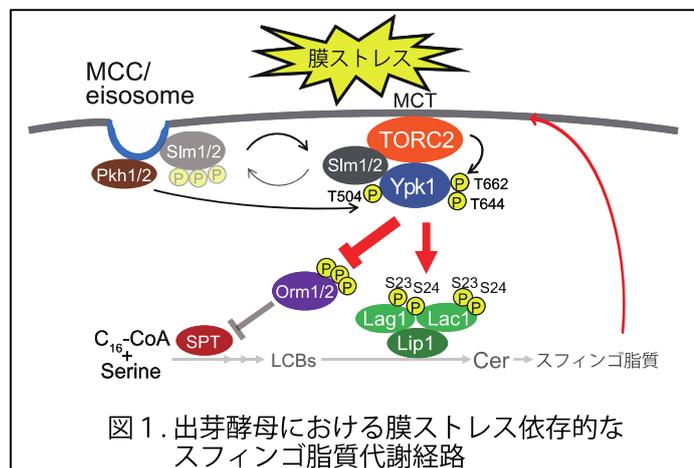
学位論文要約：
Dissertation Summary

生物は多種多様な環境変化にさらされながら生育しており、それらの変化に対して適切に対応することは正常に生育する上で必須である。これらの環境適応は「ストレス応答」と呼ばれる。ストレス応答にもさまざまな種類が存在するが、本研究では細胞膜の損傷によって引き起こされる「膜ストレス」に焦点をあて、膜ストレス応答の研究をモデル真核微生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて実施した。膜ストレスは、急激な膜の伸長や物理的損傷、または膜を構成する脂質の合成阻害などによって引き起こされるため、膜ストレス応答の理解には、「膜ストレスを感知するメカニズムの解明」と「膜を修復するための脂質代謝制御を伴うシグナル伝達経路の理解」が重要である。本論文は三章から構成されており、第一章では膜ストレス条件下でのスフィンゴ脂質代謝経路の制御機構の解明、第二章では細胞膜マイクロドメイン eisosome を介した TORC2-Ypk1 シグナルの制御メカニズムの解析、第三章では TORC2-Ypk1 シグナルよりも下流に存在する膜ストレス応答経路の探索、について述べる。

第一章 出芽酵母における細胞膜からのシグナルを介した小胞体でのスフィンゴ脂質合成の制御

細胞膜はグリセロ脂質・スフィンゴ脂質・ステロールから構成される。中でもスフィンゴ脂質はストレス応答におけるシグナル分子として機能し、スフィンゴ脂質の代謝異常はヒトにおいて様々な疾患の原因となることから、その理解は、これらに関連する疾患の理解や治療法の開発などにおいて重要である。スフィンゴ脂質合成経路は、小胞体 (ER) でセリンとパルミトイル CoA との縮合によるスフィンゴイド塩基の合成からはじまり、その後 ER においてセラミドが合成され、さらにゴルジ体においてセラミドから複合スフィンゴ脂質が合成される¹。ER におけるセラミドまでの合成経路は酵母から動物細胞まで保存されており、そのため出芽酵母 *S. cerevisiae* はスフィンゴ脂質代謝を研究する上で有益なモデルとして利用されてきた。

酵母におけるスフィンゴ脂質代謝制御には、Tor (Target of Rapamycin) 複合体 2 (TORC2) 経路を介した制御メカニズムがよく理解されている(図 1)。Tor は酵母からヒトを含む哺乳動物に至るまでほぼすべての真核生物に保存されているセリン/スレオニンキナーゼであり、TORC1 と TORC2 の 2 種類の複合体を形成する。そのなかでも TORC2 は細胞膜マイクロドメイン MCT (Membrane compartment containing TORC2) に局在し、膜ストレス



に応答してスフィンゴ脂質合成を促す。具体的には膜ストレス条件下で別の膜ドメイン MCC (Membrane compartment occupied by Can1) /eisosome に局在する Slm1/2 が MCT に移行し、AGC キナーゼである Ypk1/2 を TORC2 が存在する MCT にリクルートする²³。TORC2 は Ypk1/2 をリン酸化し、リン酸化により活性化された Ypk1/2 はさらに下流の Orm1/2 をリン酸化する⁴。また、Ypk1/2 の活性化には哺乳類の phosphoinositide dependent kinase である PDK1 のオースログである Pkh1/2 によってもリン酸化される⁵。Orm1/2 はスフィンゴ脂質代謝の初発酵素であるセリンパルミトイル転移酵素(SPT) を負に制御しており、Orm1/2 が Ypk1/2 にリン酸化されることにより SPT の抑制が解除され、スフィンゴ脂質合成が促進される⁶。この TORC2-Ypk1 シグナルは、Orm1/2 のリン酸化だけでなく ER に局在する Lag1/Lac1 複合体の N 末端部位をリン酸化することでセラミド合成の制御にも関わる⁷。Lag1/Lac1 複合体には 1 回膜貫通タンパク質である Lip1 も含まれており、Lip1 は Lag1/Lac1 の制御サブユニットとしてセラミド合成を調節すると考えられているがその詳細は不明だった。

本研究ではスフィンゴ脂質合成の制御機構を明らかにするために、染色体上の *LIP1* プロモーターを、ドキシサイクリン(Dox)依存的に発現制御可能な Tet-off プロモーターに置換した株 (*lip1-1*, *lip1-3* 株)を作製しスフィンゴ脂質合成の制御を試みた。その結果、*lip1-3* 細胞においては、Dox 添加による増殖阻害などの影響は、見られなかったが、*lip1-1* 細胞において Dox 依存的な増殖阻害とスフィンゴ脂質合成量の顕著な減少が認められた(図 2A,B)。また、SPT の阻害剤であるミリオシン(Myr)含有培地において、*lip1-1* 株は Dox 依存的な増殖阻害を示した(図 2A)。*lip1-1* と *lip1-3* の *LIP1* ORF 領域の塩基配列を解析したところ、*lip1-3* 対立遺伝子では特に変異は観察されなかったが、*lip1-1* 対立遺伝子では *LIP1* ORF 遺伝子内に 1 塩基欠失変異が確認された。これより *lip1-1* 細胞ではフレームシフト変異により機能的な Lip1 タンパク質の発現低下が起これ、セラミドの合成に異常が起きていることが確認された。

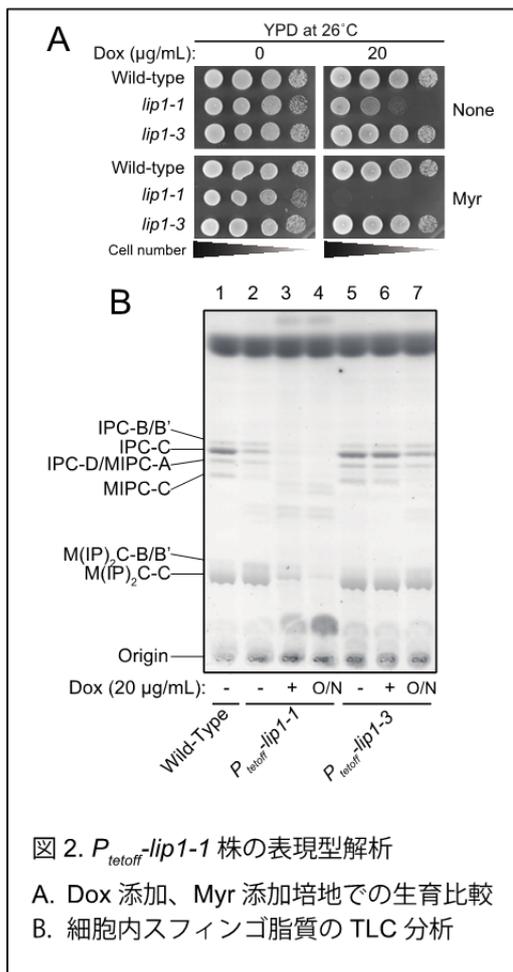


図 2. *P_{tetoff}-lip1-1* 株の表現型解析

- A. Dox 添加、Myr 添加培地での生育比較
- B. 細胞内スフィンゴ脂質の TLC 分析

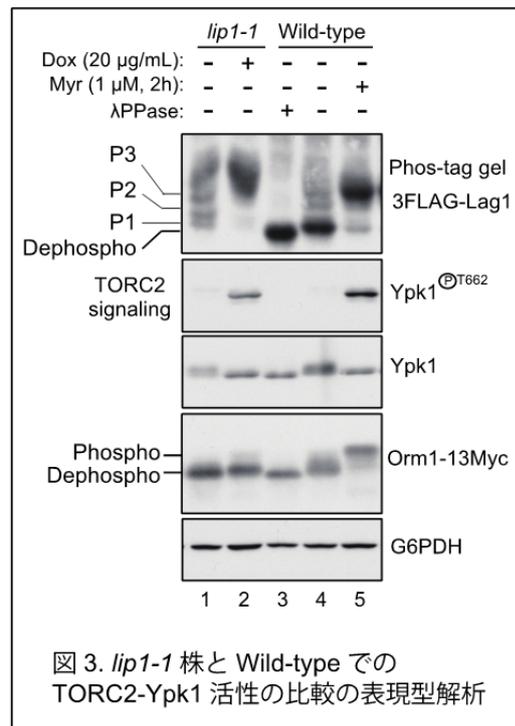


図 3. *lip1-1* 株と Wild-type での TORC2-Ypk1 活性の比較の表現型解析

そこで、*lip1-1* 株を用い、セラミド合成量の減少が TORC2-Ypk1 シグナルに与える影響について検討した。野生型細胞 (Wild-type) では Myr 処理時に Ypk1 が TORC2 と Pkh1/2 の両上流キナーゼを介して活性化され、その下流の Orm1 のリン酸化も起こる (図3 レーン5)。また、この時 Lag1 のリン酸化も確認された。*lip1-1* 細胞では、Dox 存在下において Ypk1 が TORC2 と Pkh1/2 の両上流キナーゼを介して活性化され、Lag1 が高リン酸化されたが、その一方で他の Ypk1 基質である Orm1 のリン酸化は起こらなかった (図3 レーン2)。以上の結果から、スフィンゴ脂質合成の各段階において、TORC2-Ypk1 シグナルを介した代謝酵素の活性制御機構が存在することが明らかとなった⁸。

第二章 ストレス応答における MCC/eisosome 関連タンパク質である Pil1 と 4 回膜貫通タンパク質による TORC2 シグナルの協調的制御

脂質代謝阻害などの膜ストレス条件下でのスフィンゴ脂質代謝の制御機構は明らかになったが、その一方で「細胞がどのように膜ストレスを感知するのか？」については不明であった。そこで我々は膜マイクロドメイン eisosome に注目した。細胞膜 (PM) は、様々な脂質や膜タンパク質が不均一に分布しており、小さな脂質ラフトから哺乳類細胞に見られるカベオラのような大きなタンパク質で組織化されたドメインまで、多くの種類の膜マイクロドメインを含んでいる。出芽酵母 *S. cerevisiae* の PM には、Can1 が占める膜区画 (MCC)、TORC2 が占める膜区画 (MCT)、Pma1 が占める膜区画 (MCP) という少なくとも 3 種類の異なるマイクロドメインが存在する⁹。その中でも MCC は、細胞膜の細胞質側に結合するタンパク質が複合体を形成し、深さ約 50 nm、長さ 200~300 nm の安定な溝状構造である eisosome と呼ばれる膜構造を形成する (図4B : Wild-type)¹⁰。Eisosome のような陥入構造は、*Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus nidulans* および *A. fumigatus* など他の真菌種でも存在する¹¹。高等真核生物には eisosome は存在しないが、カベオラ (Caveolae) と呼ばれる eisosome と同様に細胞膜が内側に陥入した膜マイクロドメインが存在しており、eisosome との類似性が示唆される。Eisosome には 20 種類以上のタンパク質が局在し、その中には eisosome の構造に必須な BAR ドメインタンパク質 Pil1 と、機能未知の 6 種類の 4 回膜貫通タンパク質 (6-Tsp) が含まれる。

我々は eisosome 関連遺伝子の欠損株を用いて膜ストレス条件下での生育比較を実施した。その結果、Pil1 欠損株や 6-Tsp 欠損株は Wild-type と同様に生育したが、これらの 7 種類のタンパク質をすべて欠損させた細胞 (*pillΔ 6-tspΔ*) では高温や高食塩、界面活性剤である SDS に対して顕著な増殖阻害が確認された (図4A)。また、それぞれの欠損株の eisosome 構造解析を実施した結果、Wild-type 細胞では典型的な膜の溝が形成されていたが、*pillΔ* 細胞では eisosome の陥入構造が崩壊していた (図4B)。さらに *6-tspΔ* 細胞では、膜上の陥入構造の数が減少しており、*pillΔ 6-tspΔ* 細胞では、陥入構造が消失していた (図4B)。これらの結果は、6-Tsp タンパク質が Pil1 と協調して、正常な eisosome の組み立てと MCC/eisosome を介したストレス耐性に役割を果たしていることを示している。

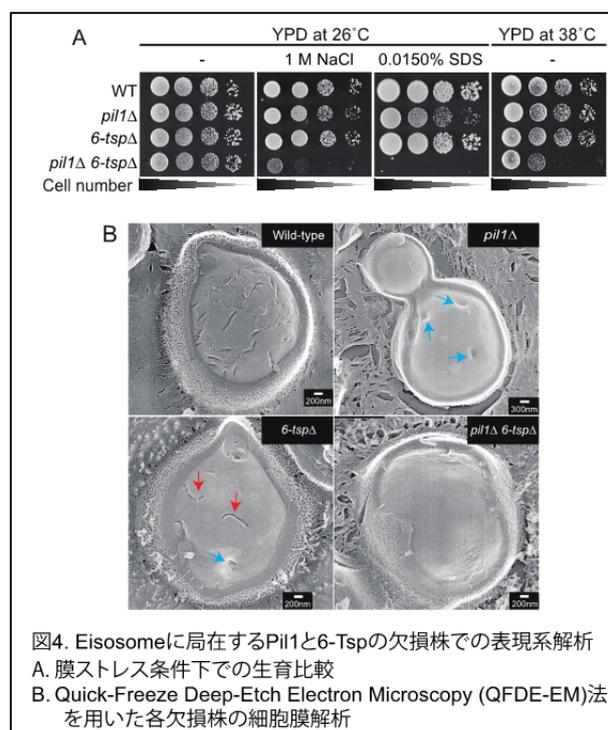
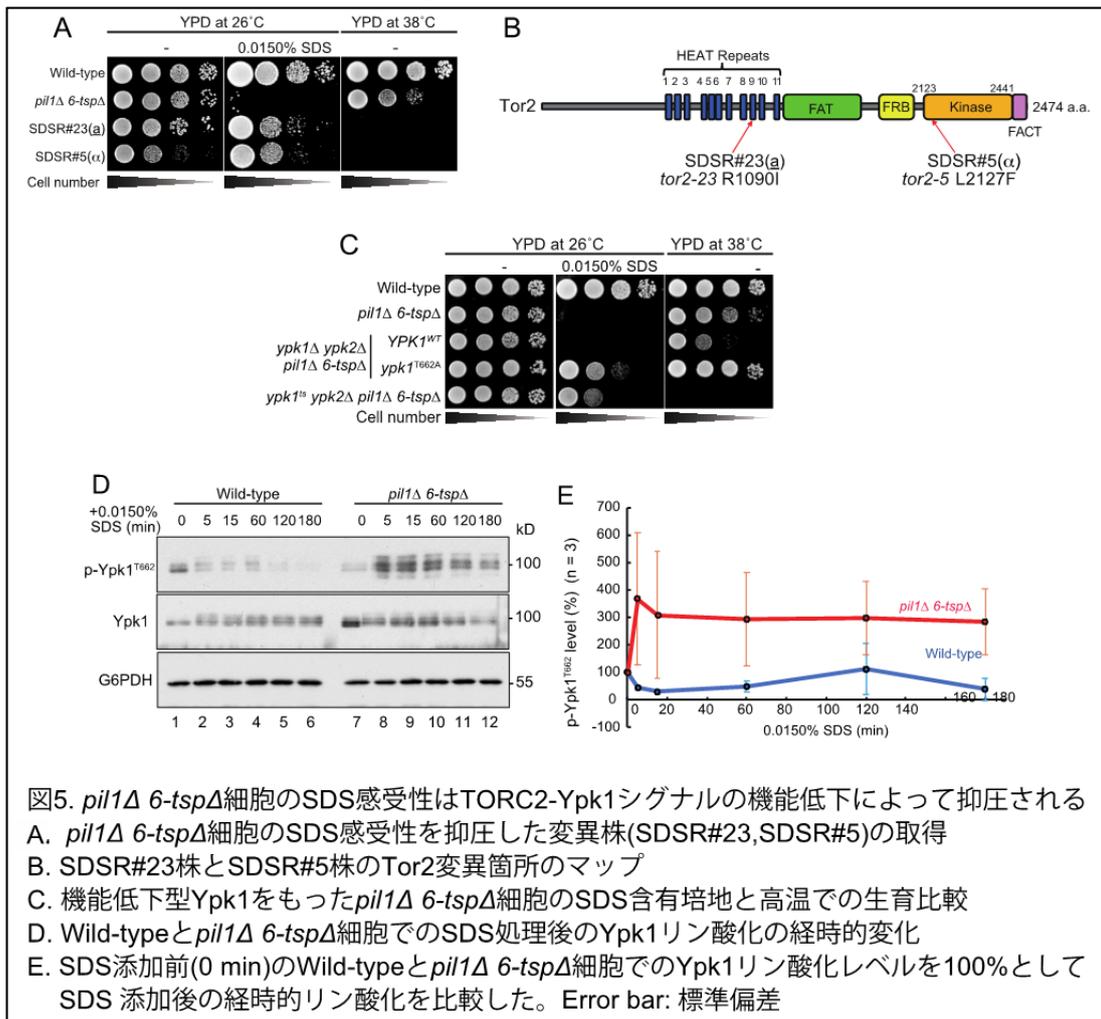


図4. Eisosomeに局在するPil1と6-Tspの欠損株での表現系解析
A. 膜ストレス条件下での生育比較
B. Quick-Freeze Deep-Etch Electron Microscopy (QFDE-EM)法を用いた各欠損株の細胞膜解析

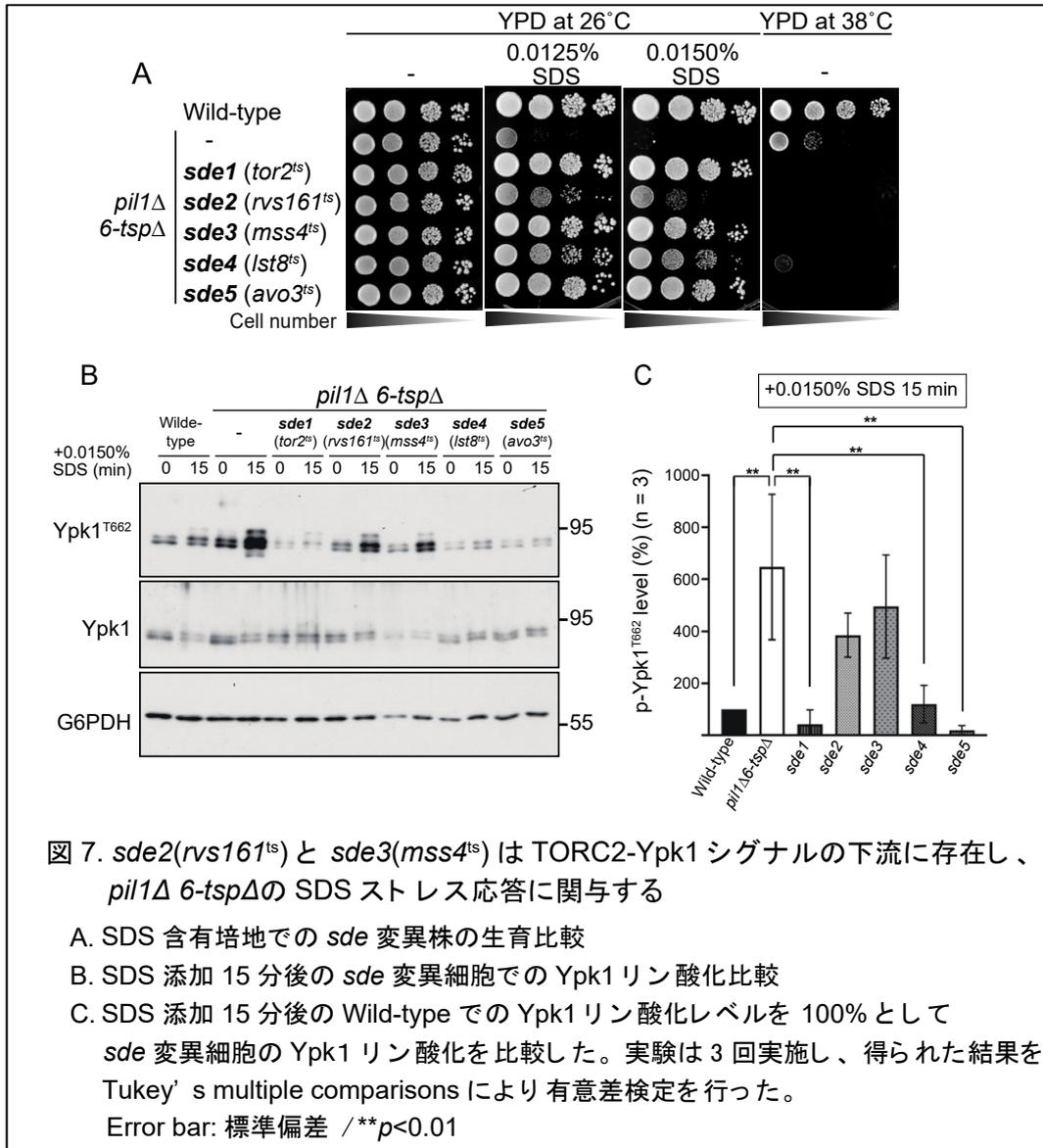
Eisosome を介したストレス応答経路の解析を目的として、我々は *pillΔ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性を抑圧する変異細胞のスクリーニングを実施した。その結果、SDS 感受性、高塩ストレス感受性を回復

し、高温感受性を示す2種類の変異株 (SDSRM#5, SDSRM#23)を取得した (図5A)。この2種類の変異株はともに Tor2 の機能低下株であった (図5B)。Tor2 は膜ストレス応答に關与するキナーゼ複合体 TORC2 の構成因子でありスフィンゴ脂質代謝経路 (TORC2-Ypk1 シグナル)^{2,3}と細胞壁完全性 (CWI) (Rho1-Pkc1 シグナル)¹²に關与している。研究の結果、*pil1Δ 6-tspΔ*細胞の SDS 感受性は TORC2-Ypk1 シグナルの機能低下によって抑圧された (図5C)。

SDS ストレス条件下での TORC2 下流シグナル伝達経路の異常をさらに解析するために、リン酸化特異的抗体を用いて各ストレス応答経路の下流キナーゼの活性化レベルを調べた。Wild-type では、SDS 添加後5分以内に TORC2 による Ypk1^{T662} のリン酸化が低下した (図5D; lane1-6、図5E 青線)。一方、*pil1Δ 6-tspΔ*細胞では、SDS 添加後5分以内に Ypk1^{T662} のリン酸化が上昇していた (図5D; lane7-12、図5E 赤線)。これらの結果から、TORC2-Ypk1 シグナルの過剰活性化が *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性の原因であることが明らかとなった。



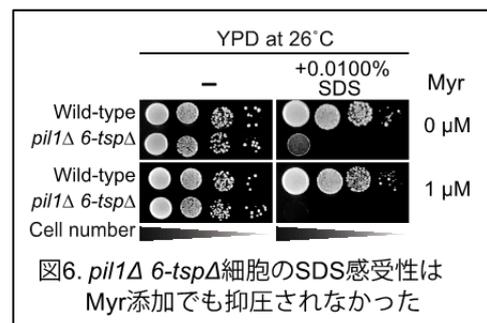
TORC2-Ypk1 シグナルの下流にはスフィンゴ脂質代謝経路が存在しており、スフィンゴ脂質、特に長鎖塩基(LCB)の過剰蓄積は酵母にとって毒性を示すことから、TORC2-Ypk1 シグナルの過剰活性化がスフィンゴ脂質の蓄積に関連して SDS 感受性を引き起こすと仮定した。この仮説を検証するために、スフィンゴ脂質の合成を阻害することで *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性を回復できるかどうかを調べた。しかし、スフィンゴ脂質の合成阻害剤である Myr の添加は *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性を回復しなかった (図 6)。



この結果から、*pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性は、TORC2-Ypk1 シグナル過剰活性化に伴う過剰なスフィンゴ脂質合成によるものではなく、未知の下流の異常が原因であることが明らかになった。

ここまでの結果から、我々は eisosome の陥入構造に局在する Pil1 と 6-Tsp が協調的に膜ストレス感知に関わっており、膜ストレス応答において TORC2-Ypk1 シグナルを負に制御する未知下流因子を制御することで膜ストレスへと適応することを明らかにした¹³。

第三章 MCC/eisosome を介した SDS ストレスの応答に



関与する因子の網羅的探索

第三章では TORC2-Ypk1 シグナルよりも下流に存在する未知の膜ストレス応答経路の探索を行った。第二章の結果より、TORC2-Ypk1 シグナルの過剰活性化が *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の膜ストレス感受性の原因であることが明らかになったが、TORC2-Ypk1 シグナルの下流がどのようにして膜ストレス応答に関与しているのか?については不明であった。そこで我々は *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性と高温感受性を用いてサブレッサー変異株 *sde* (Suppressor mutants for SDS sensitivity of eisosomal deletion mutant with temperature sensitivity) のスクリーニングを実施した。その結果、すでに取得されていた Tor2 を含む TORC2 構成因子の機能低下変異株以外にも、BAR ドメインタンパク質 Rvs161/167 の機能低下変異、PtdIns(4,5)P₂ の生合成に関与する Mss4 の機能低下変異が *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性を抑圧することを見出した (図 7A)。

さらに解析したところ、TORC2 機能低下変異株である *sde1, sde4, sde5* では、*pil1Δ 6-tspΔ* 細胞において SDS 処理後 15 分に観察される Ypk1 のリン酸化の増加が野生株同様に見られず、有意に低下していたが、その一方で *sde2, sde3* では *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞と同様に Ypk1 のリン酸化が増加したままであった (図 7B,C)。この結果は Rvs161 と Mss4 が eisosome を介した膜ストレス応答において、TORC2-Ypk1 シグナルの下流で機能することを示唆していた。

sde3 の原因遺伝子である Mss4 は、酵母の唯一の Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase である (図 8A)。Mss4 によって PtdIns(4)P から合成される PtdIns(4,5)P₂ はシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして機能しており、その代謝異常はストレス応答経路やアクチン細胞骨格の極性化に機能する。我々は、細胞内の PtdIns(4,5)P₂ の局在を PtdIns(4,5)P₂ を特異的に認識する PLC1δ 由来 PH ドメインと赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合した mCherry-2xPH^{PLC1δ} を用いて調べた。その結果、eisosome 構造が崩壊する *pil1Δ* 細胞は野生型細胞と同様に mCherry-2xPH^{PLC1δ} が細胞膜に広く分布していることが確認されたが、その一方で *6-tspΔ* 細胞と *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞では mCherry-2xPH^{PLC1δ} が細胞内に Dot 状の局在を示す細胞が有意に多く観察された (図 8B, C)。さらなる探索のために、我々は酵母マルチコピーゲノムライブラリーを用いて *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性を抑圧するマルチコピーサブレッサーの探索を行なった。その結果、*OPY1* 遺伝子を含むマルチコピープラスミドが取得された。Opy1 は Mss4 の負の制御因子として報告されており、過剰発現させることで細胞内の PtdIns(4,5)P₂ が減少する (図 8A)¹⁴。Opy1-GFP を Tet-off プロモーターを用いて過剰発現させると *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞は SDS 感受

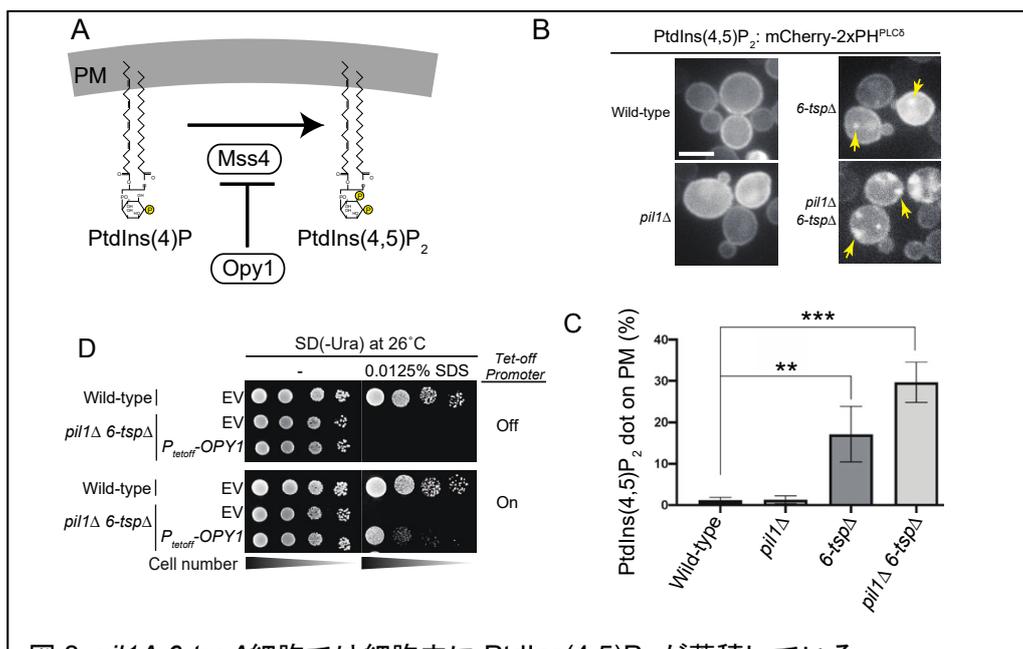


図 8. *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞では細胞内に PtdIns(4,5)P₂ が蓄積している

- A. PtdIns(4,5)P₂ は Mss4 によって合成され、Opy1 は Mss4 の活性を負に制御する
- B. 細胞内の PtdIns(4,5)P₂ 局在確認
- C. 300 細胞以上を観察し、n=3 で観察した結果を Tukey' s multiple comparisons により有意差検定を行った。Error bar: 標準偏差 / ***p*<0.01, ****p*<0.001
- D. Opy1 を過剰発現させた *pil1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 含有培地での生育比較

性から回復した (図 8D)。また、*sde2* の原因遺伝子である Rvs161 は BAR ドメインをもち、PtdIns(4,5)P₂ と相互作用することで細胞膜に局在すると推測されている¹⁵。

これらの結果より *pillΔ 6-tspΔ* 細胞では細胞内に PtdIns(4,5)P₂ が蓄積しており、この蓄積を減少させる、または、PtdIns(4,5)P₂ と結合する BAR ドメインを持つ膜タンパク質 Rvs161 の機能を低下させることで TORC2-Ypk1 シグナルが恒常的に活性化した条件下でも SDS ストレス含有培地において生育可能なことが明らかになった。

まとめ

本研究では出芽酵母における膜ストレス応答経路のうち、「セラミド合成阻害に伴う膜ストレス応答経路の解析」と「細胞膜マイクロドメイン MCC/eisosome を介した膜ストレス応答経路の遺伝学的解析」について研究を行った。その結果、eisosome を介したストレス応答経路における TORC2-Ypk1 経路とその下流経路を明らかにした。今後、さらにこれらに注目して解析を行うことで、eisosome を介した膜ストレス応答経路の制御機構の全貌が明らかになるだろう。「細胞膜マイクロドメインを介した膜ストレス応答制御機構」は出芽酵母だけでなく動物細胞に至るまで進化的に保存されていることが期待される。本研究で得られた知見は、酵母研究だけでなく膜ストレス応答の破綻に伴うヒト疾患の研究においても理解が進むことが期待される。

引用文献

1. Breslow, D. K. & Weissman, J. S. Membranes in Balance: Mechanisms of Sphingolipid Homeostasis. *Mol. Cell* **40**, 267 (2010).
2. Berchtold, D. *et al.* Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *TL - 14. Nat. Cell Biol.* **14** VN-r, 542–547 (2012).
3. Niles, B. J., Mogri, H., Hill, A., Vlahakis, A. & Powers, T. Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1536–1541 (2012).
4. Roelants, F. M., Breslow, D. K., Muir, A., Weissman, J. S. & Thorner, J. Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19222–19227 (2011).
5. Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J. & Alessi, D. R. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.* **9**, 186–197 (1999).
6. Breslow, D. K. *et al.* Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nat.* **2010** 4637284 **463**, 1048–1053 (2010).
7. Muir, A., Roelants, M., Timmons, G., Leskoske, K. L. & Thorner, J. Down-regulation of TORC2-Ypk1 signaling promotes MAPK-independent survival under hyperosmotic stress. 1–13 (2015) doi:10.7554/eLife.09336.
8. Ishino, Y. *et al.* Regulation of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum via signals from the plasma membrane in budding yeast. *FEBS J.* **289**, 457–472 (2022).
9. Ziolkowska, N. E., Christiano, R. & Walther, T. C. Organized living: Formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol.* **22**, 151–158 (2012).
10. Walther, T. C. *et al.* Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**, 998–1003 (2006).
11. Douglas, L. M. & Konopka, J. B. Fungal Membrane Organization: The Eisosome Concept. *Annu. Rev. Microbiol.* **68**, 377–393 (2014).
12. Nomura, W. & Inoue, Y. Methylglyoxal Activates the Target of Rapamycin Complex 2-Protein Kinase C Signaling Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1269–1280 (2015).
13. Sakata, K. *et al.* Coordinated regulation of TORC2 signaling by MCC/eisosome-associated proteins, Pill and tetraspan membrane proteins during the stress response. *Mol. Microbiol.* 1–18 (2022) doi:10.1111/mmi.14903.
14. Ling, Y., Stefan, C. J., MacGurn, J. A., Audhya, A. & Emr, S. D. The dual PH domain protein Opy1 functions as a sensor and modulator of PtdIns(4,5)P₂ synthesis. *EMBO J.* **31**, 2882–2894 (2012).
15. Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J. S., Winsor, B. & Munn, A. L. The BAR Domain Proteins: Molding Membranes in Fission, Fusion, and Phagy. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 37 (2006).