

## 学位論文要旨 Dissertation Abstract

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  
Title of Dissertation 機構に関する研究

学位論文要旨：  
Dissertation Abstract

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。その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。

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。その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これら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。スフィンゴ脂質生合成経路は、まず小胞体(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。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 *Saccharomyces 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。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 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/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。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。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。

この TORC2-Ypk1 シグナルは、Orml1/2 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。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である。第一章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細胞を作製しスフィンゴ脂質合成の制御を試みた。この細胞を用いてスフィンゴ脂質代謝経路について詳細に解析した結果、細胞内のスフィンゴ脂質濃度を適正に保つための制御機構が存在することが明らかとなった。

第二章では eisosome を介した TORC2-Ypk1 経路の活性化メカニズムについて研究を行った。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。Eisosome は深さ 50 nm、長さが 200-300 nm の陥入構造であり、20 種類以上のタンパク質が局在する。我々は 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 に注目した。これらの 7 種類のタンパク質をすべて欠損させた細胞(*pill1Δ 6-tspΔ*)では増殖阻害が確認された。また *pill1Δ 6-tspΔ*細胞の SDS 感受性は TORC2-Ypk1 経路の機能低下によって抑圧された。この結果より、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 経路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。

第三章では TORC2-Ypk1 経路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 経路の過剰活性化が *pill1Δ 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 経路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 *pill1Δ 6-tspΔ*細胞の SDS 感受性を用いてサプレッサースクリーニングを実施し、下流因子の探索を実施した。その結果、TORC2-Ypk1 経路の新規下流因子として BAR ドメインタンパク質 Rvs161 と膜脂質 PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> の生合成に関与するキナーゼ Mss4、そして Mss4 の負の制御因子 Opy1 を取得した。解析の結果、*pill1Δ 6-tspΔ*細胞では PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> が蓄積しており、この蓄積を減少させる、または、PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 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 経路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。

本研究によって出芽酵母における膜ストレス応答経路のうち、「スフィンゴ脂質代謝におけるセラミドの代謝制御機構」と「Eisosome を介した膜ストレス応答経路の制御メカニズム」が明らかになった。「Eisosome と細胞膜を構成する脂質代謝経路との明確な関係性」についてはまだ不明な点が残されているが、eisosome を介したストレス応答経路での新規な下流因子が取得されており、これらに注目して解析を行うことで、膜ストレス条件下での eisosome を介したストレス応答経路と脂質代謝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おり、ヒトの疾患を理解する上でもその知見は重要である。本研究で得られた知見をもとに研究を行うことで、酵母研究だけでなく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。