

学位論文審査の結果の要旨

氏名	坂田 健太郎
審査委員	主査 田淵 光昭 副査 田中 直孝 副査 杉山 康憲 副査 関藤 孝之 副査 大西 浩平

論文名

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

審査結果の要旨

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、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) 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。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。

申請者は 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 (*pill1Δ 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を見出した。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、*pill1Δ* 細胞では eisosome の陥入構造が崩壊していた。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、*pill1Δ 6-tspΔ* 細胞では、陥入構造が消失していた。これらの結果から 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た。

Eisosome を介したストレス応答経路の解析を目的として、申請者は *pill1Δ 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、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。この 2 種類の変異株はともに Tor2 の機能低下株であった。Tor2 は膜ストレス応答に関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) と細胞壁完全性 (CWI) (Rho1-Pkc1 シグナル) に関与している。申請者は、*pill1Δ 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ることを見出した。

そこで、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。一方、*pill1Δ 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。これらの結果から、TORC2-Ypk1 シグナルの過剰活性化が *pill1Δ 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 *pill1Δ 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 *pill1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性を回復しなかった。この結果から、申請者は、*pill1Δ 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を明らかにした。つぎに申請者は *pill1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性と高温感受性を用いてサプレッサー変異株 *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 の機能低下変異と Mss4 の抑制因子である Opy1 の過剰発現が *pill1Δ 6-tspΔ* 細胞の SDS 感受性を抑圧することを見出した。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、*pill1Δ 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 *pill1Δ 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。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。申請者は、細胞内の Mss4 により産生される PtdIns(4,5)P₂ の局在を調べたところ、eisosome 構造が崩壊する *pill1Δ* 細胞は野生型細胞と同様に PtdIns(4,5)P₂ 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 *pill1Δ 6-tspΔ* 細胞では PtdIns(4,5)P₂ が細胞内に Dot 状に局在することを見出した。さらに Mss4 の負の制御因子である Opy1 を過剰発現させることで細胞内の PtdIns(4,5)P₂ が減少させると *pill1Δ 6-tspΔ* 細胞は SDS 感受性から回復した。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。これらの結果より *pill1Δ 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を明らかにした。

本研究で申請者は出芽酵母における膜ストレス応答経路のうち、「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」について研究を行い、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。「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と考えられ、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。

本論文に関する公開審査会は、令和 5 年 2 月 5 日に愛媛大学農学部で開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会で、本論文の内容を慎重に審議した結果、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するものと判定した。