

学 位 論 文 要 旨

氏名 黒川 夕奈

題 目：

急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法を用いた生体膜におけるホスファチジルイノシトール4リン酸 (PI4P) の局在解析に関する研究

論文要旨：

【背景】生体を構成する核酸、たんぱく質、脂質は、生命機能維持に重要である。しかし脂質に関しては、有用な解析方法が少なく不明な点が多い。特に近年では、膜脂質ホスホイノシタイド (PIs) の内、ホスファチジルイノシトール4リン酸 (PI4P) が生体膜動態の中心的役割を果たす可能性が示されてきた。そこで本研究では、急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL: Quick-Freezing & Freeze-fracture Labeling) 法を用いて、オートファジー膜構造物、細胞膜におけるPI4Pの微細局在解析を行い、PI4P機能解明を目指した。PI4P微細局在解析のため、哺乳類Huh7細胞と出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いた。出芽酵母は真核生物のモデルとされ、出芽酵母を用いた研究では、オートファジーなど様々な細胞内現象が解明されてきた。出芽酵母のゲノム情報は整備されており、分子生物学が駆使できる。また出芽酵母が持つ分子の多くは高等生物と保存性が高い。そこで本研究では、哺乳類細胞のPI4P局在解析に加え、出芽酵母の遺伝子改変技術を利用しPI4P局在解析を行った。

【方法】QF-FRL法は、脂質二重層の間で割断することで、細胞質側 (PF: Protoplasmic Face)、管腔側または細胞外側 (EF: Exoplasmic Face) を区別し、脂質二重層の“非対称性分布”解析を可能とする。この方法を用いて、オートファジー膜構造物、および、細胞膜のPF、EFを区別し、PI4P微細局在解析を行った。また、出芽酵母におけるPI4P産生酵素Pik1p、Stt4pの温度感受性株を用いてPI4P産生を制御し、より詳細なPI4P分子機序を追及した。QF-FRL法では、哺乳類細胞および出芽酵母細胞を、それぞれ高圧凍結法、メタルサンドウィッチ法により急速凍結し、凍結割断後、白金と炭素を真空蒸着しレプリカを作製した。SDS溶液処置後、抗PI4P抗体に続き金コロイド結合抗体で標識し、電子顕微鏡で観察した。

【結果/考察1】オートファジーは、基質をリソソーム/液胞に運び、消化する経路である。主なオートファジー経路の内、マクロオートファジーでは、基質を隔離する二重膜構造「オートファゴソーム」が出現する。脂質はその主要構成要素である。マクロオートファジーにおいて、数々の関連たんぱく質が解明されてきたが、脂質に関する研究は未だ発展段階

である。特に近年、PI4Pのマクロオートファジーへの関与が示唆されているが、詳細は不明である。本研究の哺乳類細胞を用いたPI4P微細局在解析結果では、PI4Pはオートファゴソーム膜PFにおいてオートファジー後期に働くRab7と共局在した。つまり、PI4Pはオートファゴソーム膜PFでオートファゴソームとリソソームとの融合に働くことが示唆された。

【結果/考察2】 結果1に引き続き、出芽酵母のPI4P局在を解析したところ、哺乳類細胞と異なり、オートファゴソーム膜EFにPI4Pが局在した。つまり、真核生物間で保存されていると考えられてきた経路に、何らかの差異があることが示された。さらに、Pik1p、Stt4pの温度感受性株を用いた実験によって、Pik1pはオートファゴソームの形成に、Stt4pはオートファゴソームと液胞との融合に働くことが示唆された。

【結果/考察3】 ミクロオートファジーは、リソソーム/液胞膜が陥入することで基質を取り込み、消化する経路である。本研究では、特にミクロオートファジーによる脂肪滴取り込み「マイクロリポファジー」に着目した。出芽酵母のマイクロリポファジーでは、PI4Pは液胞内マイクロリポファジー小胞膜PFに高密度に局在した。さらに、PI4Pが高密度に局在する液胞膜上のラフト様ドメインが陥入し、脂肪滴を飲み込むことで、マイクロリポファジー小胞が形成されることが分かった。さらに、Pik1p、Stt4pの温度感受性株を用いた実験によって、Pik1p、Stt4p両方がマイクロリポファジーに重要であり、液胞膜PI4Pがステロール輸送や、液胞膜ラフト様ドメインの拡張に働くことが示唆された。

【結果/考察4】 出芽酵母では、細胞膜に局在するStt4pによって細胞膜PI4Pが生成されると考えられている。PI4Pは細胞膜において、ホスファチジルイノシトール(4,5)ニリン酸(PI(4,5)P₂)の前駆体としての役割、また、PI4P独自の役割を果たすが、その具体的な機能や分子機序は不明である。そこで、QF-FRL法を用いてPI4P、PI(4,5)P₂ 微細局在解析を行い、以下の結果が得られた。(1)PI4P、PI(4,5)P₂ は細胞膜PFに局在した。しかしPI(4,5)P₂ はPI4Pとは異なり、溝状構造に集中した。(2)Pik1p、Stt4pそれぞれの不活化条件ではPI4P局在は失われた。つまり、細胞膜PI4Pの生成には、Stt4pだけでなくPik1pも寄与することが分かった。(3)Pik1p、Stt4pそれぞれの不活化条件ではPI(4,5)P₂ 局在は変化せず、Pik1p、Stt4p両方の不活化条件でのみPI(4,5)P₂ 局在が失われた。すなわち、細胞膜PI(4,5)P₂ レベル維持のため、Pik1p、Stt4p両方によるPI4P生成が必要であることが示唆された。

【結論】 本研究では、生体膜動態におけるPI4Pの本質的な機能や制御について追究した。本研究結果を踏まえ、PI4Pが膜動態制御の鍵として役割を担う期待は大きいといえる。生体膜脂質の局在や制御の解明は、脂質分布や代謝の異常が原因で起こる様々な疾患の解決策を見出すことに直結する。今後のさらなる脂質研究の発展により、生体膜動態を解明し、ライフイノベーションの推進に大きく貢献できることが期待される。

(和文2,000字又は英文800語程度)