

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：34419  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22790093  
 研究課題名（和文） 分裂酵母モデル生物を用いたイノシトールリン脂質経路の制御因子の  
 同定と機能解析  
 研究課題名（英文） Analysis of inositol phospholipid signaling pathway in fission yeast  
  
 研究代表者  
 喜多 綾子（KITA AYAKO）  
 近畿大学・薬学部・助教  
 研究者番号：00388498

研究成果の概要（和文）：本研究は、分裂酵母モデル生物を用いて、脂質代謝の制御因子を同定しその生理機能を明らかにすることを目的としている。本研究の成果として、新規イノシトールリン脂質経路制御因子、細胞内輸送制御因子の同定に成功するとともに新たな細胞内輸送機構を提唱することができた。また、脂質代謝と細胞内輸送に関わりについての興味深い知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：This project aims to identify regulatory factors of lipid metabolism thereby elucidating their physiological functions in fission yeast. We identified regulators of inositol phospholipid signaling pathway and membrane trafficking pathway, and demonstrated novel membrane trafficking mechanism. We also obtained interesting observations regarding the relationship between inositol phospholipid signaling pathway and membrane trafficking pathway.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：イノシトールリン脂質経路、細胞内輸送、分裂酵母モデル生物、クラスリンアダプター複合体、低分子量Gタンパク質、カルシニューリン、免疫抑制薬

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、分裂酵母においてもカルシニューリンが免疫抑制薬の標的分子であることに着目したゲノム薬理学的アプローチにより、免疫抑制薬感受性原因遺伝子群を網羅的に同定し、特に細胞内輸送において重要な働きをする因子について機能解析

を行ってきた。免疫抑制薬感受性原因遺伝子群として同定されてきたものの中には、イノシトールリン脂質経路において、PI(4,5)P<sub>2</sub>産生に必須な酵素であるPI(4)P<sub>5</sub>キナーゼが存在し、この、PI(4)P<sub>5</sub>キナーゼを細胞内で過剰発現すると、細胞増殖抑制を示すことや、脂質代謝の変化に伴って、細胞内で異常な膜

構造が蓄積することを発見し、分裂酵母の増殖を指標とした遺伝学的なアプローチにより、イノシトールリン脂質制御因子の同定が可能であると考えた。スクリーニングの結果、RabGAP などの細胞内輸送に関わる因子の同定に成功したことから、イノシトールリン脂質経路が細胞内輸送と密接に関わっているという知見を得た。この独自の遺伝学的アプローチを駆使することにより、イノシトールリン脂質代謝経路を制御する因子の同定と機能解析を行うことで、それらの因子がどのようなメカニズムでイノシトールリン脂質経路制御に関わっているのかを明らかにしようと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、高等生物に極めて近い細胞内シグナル伝達経路と脂質代謝経路を有する分裂酵母モデル生物を用いた「独創的な遺伝学的アプローチ」と「ゲノムワイドなアプローチ」を軸として、イノシトールリン脂質制御因子群の同定と生理機能の解明を通して、脂質代謝のメカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究では、イノシトールリン脂質代謝という高等生物にも高度に保存された分子を標的としていることより、脂質代謝における生理機能を明らかにすることは、ヒトにおける脂質代謝異常に伴う病態の解明など臨床・医療へ繋がる成果が得られると期待できる。

## 3. 研究の方法

本研究では、分裂酵母モデル生物を用いて「遺伝学的アプローチ」と「ゲノムワイドなアプローチ」を駆使することにより、イノシトールリン脂質代謝を制御する遺伝子群の取得を行い、その代謝制御に関わる遺伝子群の機能を明らかにする。

具体的な方法については以下に示す。

### (1) 遺伝学的スクリーニング

分裂酵母において、イノシトールリン脂質 PI(4,5)P2 産生酵素である PI(4)P5 キナーゼを過剰発現すると細胞増殖抑制を示すことから、イノシトールリン脂質経路を制御する因子を同定することを目的として、PI(4)P5 キナーゼを過剰発現に伴う細胞増殖抑制を回復する因子をスクリーニングにより取得する。

### (2) イノシトールリン脂質経路、細胞内輸送に関わる因子の解析

① 遺伝子ノックアウト細胞および遺伝子過剰発現細胞を作製し、増殖や細胞内輸送に与える影響、薬物や温度に対する感受性などの表現型を解析する。

② 遺伝子を GFP ラベルすることで細胞内局在を可視化する。

③ 細胞内構造の詳細な解析を行う。特に電子

顕微鏡を用いて、細胞内構造を観察し、オルガネラを中心に細胞内構造の異常の有無を解析する。

## 4. 研究成果

新たなイノシトールリン脂質経路制御因子や細胞内輸送制御因子の同定および新規 Golgi/endosome 間の細胞内輸送機構の提唱に成功した。

### (1) 遺伝学的スクリーニング

イノシトールリン脂質 PI(4,5)P2 産生酵素である PI(4)P5 キナーゼを過剰発現させた分裂酵母細胞の細胞増殖抑制を回復する因子として、すでに同定されていた RabGAP (*slp1<sup>+</sup>*: Suppressor of the Lethality induced by PI4,5P2 overproducing 1) 以外に、PI(4,5)P2 と結合する PH ドメイン (pleckstrin homology domain) を有するタンパク質をコードする遺伝子 *slp2<sup>+</sup>* を同定した。

### (2) イノシトールリン脂質経路、細胞内輸送に関わる因子の解析

① PI(4)P5 キナーゼを過剰発現させた分裂酵母細胞の細胞増殖抑制を回復する因子の解析

分裂酵母内で PI(4,5)P2 産生酵素である PI(4)P5 キナーゼを過剰発現させると、細胞内に異常な膜構造が形成されるが、同定した PI(4,5)P2 シグナル制御因子を過剰発現させると、異常な膜構造の形成が抑制された。さらに、クラスリンアダプター複合体の機能が低下した分裂酵母細胞や細胞内輸送機能が低下した分裂酵母細胞においては、PI(4)P5 キナーゼの過剰発現による細胞増殖抑制効果の低下と細胞内の異常な膜構造形成が抑制されることが明らかとなり、イノシトールリン脂質シグナルが細胞内輸送によって制御されていることを示す知見が得られた。

② 分裂酵母におけるクラスリンアダプター複合体と低分子量 G タンパク質 Rho3 の機能的な関連

クラスリンアダプター複合体の機能が低下した細胞 (*apm1* 破壊株) は温度感受性を示す。この *apm1* 破壊株の表現型を回復する因子として、低分子量 G タンパク質である Rho3 を同定し Rho3 の細胞内輸送における新たな役割を明らかにするとともに、クラスリンアダプター複合体の構成因子である Apm1 と Rho3 が共にゴルジ体に存在し、結合することを証明した。

③ 分裂酵母におけるクラスリンアダプター複合体の新規アクセサリタンパク質の生理機能

免疫抑制薬 FK506 と高温感受性を示す変異細胞である *its* (immunosuppressant and temperature-sensitive) 変異細胞の原因遺伝子の一つである、クラスリンアダプター複合

体 AP-1 のアクセサリタンパク質をコードする *its4+/sip1+* 遺伝子を同定した。*sip1* 変異細胞は Golgi/endosome 間の細胞内輸送に異常を示すこと、クラスリンアダプター複合体の構成因子である Apm1 を過剰発現することにより *sip1* 変異細胞の細胞内輸送の異常を回復することができることを明らかにした。さらに Sip1 が *trans*-Golgi/endosome において AP-1 複合体と結合することにより、協調的に Golgi/endosome 間の膜輸送を制御していることを証明した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Sip1, a Conserved AP-1 Accessory Protein, is Important for Golgi/Endosome Trafficking in Fission Yeast.  
Yu Y, Kita A, Udo M, Katayama Y, Shintani M, Park K, Hagihara K, Umeda N, Sugiura R.  
PLoS ONE 7(9):e45324.  
Doi:10.1371/journal.pone.0045324  
Sep 17, 2012 査読有
- ② Role of the RNA-binding Protein Nrd1 in Stress Granule Formation and Its Implication in the Stress Response in Fission Yeast  
Sato R, Tanaka A, Kita A, Morita T, Matsumura Y, Umeda N, Takada M, Hayashi S, Tani T, Shinmyozu K, Sugiura R.  
PLoS ONE 7(1): e29683.  
doi:10.1371/journal.pone.0029683.  
January 19, 2012 査読有
- ③ The stress granule protein Vgl1 and poly-A binding protein Pab1 are required for doxorubicin resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.  
Morita T, Sato R, Umeda N, Kita A, Sugiura R.  
Biochemical and Biophysical Research Communications 6;417(1):399-403.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.127.  
Dec 8, 2011 査読有
- ④ Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway.  
Sugiura R, Sato R, Ishiwata S, Umeda N, Kita A.  
Journal of Signal Transduction Volume 2011 (2011), Article ID 109746, 8 pages  
doi:10.1155/2011/109746

Feb 9, 2011 査読有

- ⑤ Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome Trafficking through Functional Interaction with Adaptin in Fission Yeast.  
Kita A, Li C, Yu Y, Umeda N, Doi A, Yasuda M, Ishiwata S, Taga A, Horiuchi Y, Sugiura R.  
PLoS ONE 6(2):e16842  
doi: 10.1371/journal.pone.0016842  
Feb 3, 2011 査読有  
他 3 件

[学会発表] (計 77 件)

- ① Chemical Genetic Analysis of the Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signaling  
Yu Y, Hagihara K, Kita A, Sugiura R.  
10th International Conference on Protein Phosphatase  
Feb 7-9, 2013(Tokyo)
- ② クラスリンアダプターAP-1 複合体結合タンパク質 Its4/Sip1 の細胞内輸送における役割  
片山雄大、于陽、喜多綾子、有働雅子、朴貴和、新谷真未、杉浦麗子  
第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会  
2012 年 10 月 20 日 (兵庫)
- ③ PH ドメインタンパク質 S1p2 によるイノシトールリン脂質シグナルの制御  
李翠芳、喜多綾子、橋本佑香、井原美沙子、加藤彩香、阪井康能、奥公秀、伊藤俊樹、杉浦麗子  
酵母遺伝学フォーラム 第 45 回研究報告会 2012 年 9 月 4~6 日 (京都)
- ④ 細胞内輸送とイノシトールリン脂質シグナル伝達経路の機能的関係  
李翠芳、喜多綾子、橋本佑香、井原美沙子、加藤彩香、石渡俊二、杉浦麗子  
第 54 回日本脂質生化学会  
2012 年 6 月 7~8 日 (福岡)
- ⑤ クラスリンアダプターAP-1 複合体結合タンパク質 Its4 のメンブレントラフィックにおける役割  
有働雅子、于陽、喜多綾子、朴貴和、片山雄太、新谷真未、杉浦麗子  
日本薬学会第 132 年会  
2012 年 3 月 28~31 日 (北海道)
- ⑥ 細胞内輸送とイノシトールリン脂質シグナル伝達経路の機能的関係  
李翠芳、喜多綾子、橋本佑香、井原美沙子、加藤彩香、石渡俊二、杉浦麗子  
第 5 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会  
2012 年 1 月 19~20 日 (大阪)
- ⑦ 低分子量 G タンパク質 Rho3 とクラスリンアダプター複合体の細胞内輸送システムにおける機能的関連

喜多綾子、李翠芳、于陽、梅田奈苗、土井章、安田光都子、石渡俊二、杉浦麗子  
第120回日本薬理学会近畿部会  
2011年11月11日(京都)

- ⑧ クラスリンアダプターAP-1 複合体結合タンパク質 Its4 のメンブレントラフィックにおける役割  
于陽、喜多綾子、高田宏文、有働雅子、朴貴和、杉浦麗子  
酵母遺伝学フォーラム 第44回研究報告会 2011年9月5~7日(九州)
- ⑨ A Role for Its4, a Clathrin Adaptor Ap-1 Complex Binding Protein, in Membrane Trafficking  
Yu Y, Kita A, Takada H, Udo M, Park K, Sugiura R.  
THE SIXTH INTERNATIONAL FISSION YEAST MEETING, pombe2011 25-30 June, 2011, Boston
- ⑩ クラスリンアダプターAP-1 複合体結合タンパク質 Its4 のメンブレントラフィックにおける役割  
于陽、喜多綾子、高田宏文、有働雅子、李翠芳、杉浦麗子  
酵母遺伝学フォーラム 第43回研究報告会 2010年9月9日~11日(奈良)  
他67件

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計10件)

名称: mRNA発現を指標にしたMAPキナーゼシグナリングのリアルタイム測定法の開発と抗がん剤探索法

発明者: 杉浦麗子、高田宏文、石渡俊二、喜多綾子

権利者: 学校法人近畿大学

種類: 特許

番号: 特願2010-162093

出願年月日: 2010年7月16日

国内外の別: 国内

他9件

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/genome/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

喜多 綾子 (KITA AYAKO)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号: 00388498

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

杉浦 麗子 (SUGIURA REIKO)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号: 90294206