

リン脂質非対称性により制御される細胞膜ステロールの保持機構

岸本 拓磨, 田中 一馬

1. はじめに

細胞膜は、細胞外と細胞内を分け隔てる器官であり、選択的な物質の出し入れやバリア機能など重要な機能を有する。細胞膜は、ステロール、リン脂質とスフィンゴ脂質から構成される脂質二重層構造を持ち、これら構成脂質の正常な分布は細胞膜機能の発現に欠かせない。哺乳類のコレステロールや真菌類のエルゴステロールなどのステロール類は、細胞膜に必須な成分であり、その恒常性は厳密に制御されている¹⁾。細胞膜には、細胞全体の60~90%以上ものステロール分子が存在しており、これらは膜の流動性や透過性など細胞膜の物性に大きく影響している²⁾。近年、多くの脂質輸送タンパク質 (lipid transfer protein: LTP) が明らかとなり、ステロールの細胞内恒常性について多くの議論がなされているが³⁾、どのように細胞膜にステロールが濃縮されているのかは明らかとなっていない。

細胞膜の脂質に関するもう一つの重要な特徴として、リン脂質が細胞膜二重層の細胞膜外層 (細胞外側層または extracellular leaflet) と細胞膜内層 (細胞質側層または cytoplasmic leaflet) で非対称な分布を示していることがあげられる。ホスファチジルセリン (phosphatidylserine: PS) やホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine: PE) は細胞膜内層に、スフィンゴミエリンに代表されるスフィンゴ脂質やホスファチジルコリンは細胞膜外層に多く分布しており、この分布様式は真核生物全般に認められる⁴⁾。この分布の維持には、4型P-type ATPaseであるフリッパーゼが関わっている。フリッパーゼは、細胞膜、ゴルジ体やエンドソームに分布し、主にPSやPEを細胞膜では外層から内層、また、オルガネラ膜では内腔

側層から細胞質側層にATP依存的に輸送する (図1)⁵⁾。フリッパーゼは、触媒領域を有する10回膜貫通タンパク質であるATPaseと2回膜貫通タンパク質の β -サブユニット (Cdc50ファミリータンパク質) からなる複合体として存在し、特定の基質特異性と細胞内局在を有している。出芽酵母では5種類、ヒトでは14種類のフリッパーゼが確認されている (図1)。出芽酵母では、Dnf1-Lem3およびDnf2-Lem3フリッパーゼ複合体が、主に細胞膜のリン脂質非対称性を制御している。一方、筆者らは以前に、細胞膜6回膜貫通タンパク質Sfk1 (哺乳類細胞のTMEM150ファミリータンパク質ホモログ) が、細胞膜脂質二重層間におけるリン脂質の移動を抑制する可能性を見いだしており⁶⁾、フリッパーゼと協調的にリン脂質非対称性を制御していると推測される。

細胞膜では、PSの露出など非対称性の変化が多くの上生命現象に関わることが知られているが⁷⁾、そもそも細胞膜内層になぜPSやPEが保たれているのかについての明確な答えが得られていないように思われる。本稿では、最近筆者らの出芽酵母実験系の研究によって明らかとなった細胞膜リン脂質非対称性の生理的意義について概説する⁸⁾。

2. 細胞膜のリン脂質非対称性制御システムとその役割

現在までに細胞膜のリン脂質非対称性に関わる遺伝子の単独または多重変異体では明確な表現型が見いだされておらず、生理的意義の解明が滞っている大きな要因となっている。筆者らは、この理由を非対称性制御機構が有するロバストネス、すなわち、一つまたは複数の因子の機能が喪失しても、なお他の因子での機能補完が可能であることに起因すると考えた。そこで、出芽酵母において二つの細胞膜フリッパーゼの不活性化を引き起こす*lem3*欠損変異と*sfk1*欠損変異の二重変異株に、さらに遺伝子変異を加えることにより致死性を誘起する合成致死遺伝子を探索した。その結果、別のフリッパーゼであるDnf3-Crf1複合体の変異を導入することで、劇的な生育障害が惹起されることを見いだした。出芽酵母のフリッパーゼは、Neo1を除き、エンドサイトーシス-リサイクリング経路 (ゴルジ体から細胞膜に輸送された後に、エンドサイトーシスされ、エンドソームを介して、ゴルジ体に戻る経路) により輸送されており、Dnf3-Crf1複合体は、主に細胞内膜構造に分

北海道大学・遺伝子病制御研究所・分子間情報分野 (〒060-0815 北海道札幌市北区北15条西7丁目)

Retention mechanism of plasma membrane sterols regulated by phospholipid asymmetry

Takuma Kishimoto and Kazuma Tanaka (Division of Molecular Interaction, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Nishi 7, Kita 15, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0815, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940082

© 2022 公益社団法人日本生化学会

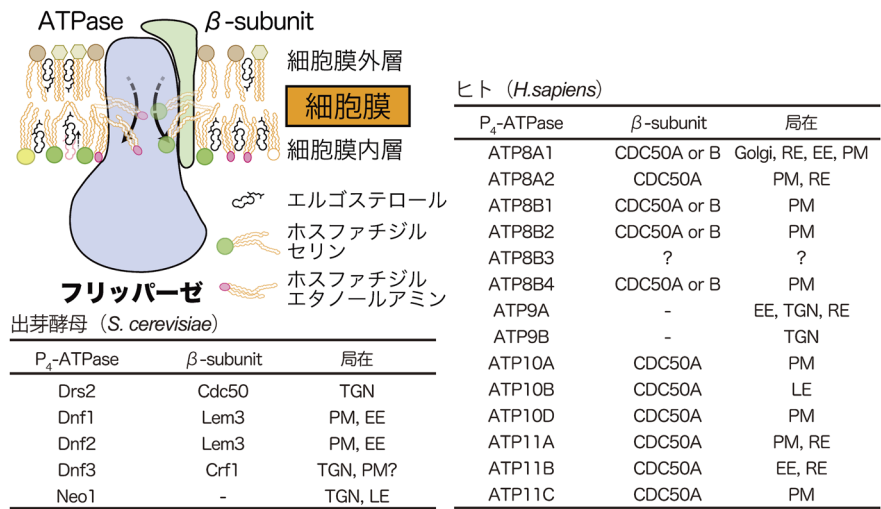


図1 フリッパーゼによる細胞膜リン脂質非対称性の制御
フリッパーゼは、ホスファチジルセリンやホスファチジルエタノールアミンを細胞膜内層に輸送する。表は、出芽酵母5種類、ヒト14種類のフリッパーゼ複合体の構成因子と細胞内局在を示す^{5, 15)}。RE：リサイクリングエンドソーム、EE：初期エンドソーム、LE：後期エンドソーム、Golgi：ゴルジ体、TGN：トランスゴルジネットワーク、PM：細胞膜。

布する。そのため、内膜構造での機能が主であると考えられていたが、最近、細胞膜でPSを輸送する可能性が示唆された⁹⁾。そこで、筆者らは、高温で致死となる温度感受性 *crf1 lem3 sfk1-2* 三重変異株（以下、三重変異株）を作製し、その表現型解析を行ったところ、通常、細胞膜外層にあまり存在しないPSやPEが、二重変異株と比較して過剰に露出することを見いだした。野生株と比較して三重変異株においては、PSおよびPEを含めリン脂質量や組成の大きな変化はみられなかったことから、この分布変化は細胞膜二重層におけるリン脂質分布の変化であると推測される（データは割愛）。さらに、細胞膜の透過性の上昇や膜密度の減少、細胞膜タンパク質の局在異常など、多岐にわたる細胞膜の異常を見いだした。これらの結果は、フリッパーゼと *Sfk1* により制御される細胞膜リン脂質非対称性が、細胞にとって必須な機能を有することを示唆している。

リン脂質非対称性の異常が細胞の生育阻害や細胞膜の機能不全を引き起こす原因は何であろうか？ この疑問を解明するために、三重変異株にマルチコピープラスミドライブラリーを導入することで、高発現により生育阻害を抑制する遺伝子を探した。その結果、オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質（oxysterol-binding protein-related protein：ORP）に属する *KESI* が単離された。ORPは、オルガネラ間の脂質輸送を担うLTPで、真核生物に広く保存されている。*KESI*は、出芽酵母に存在する7種類のORPの一つで、小胞体からゴルジ体や細胞膜へエルゴステロールを輸送することが示唆されている¹⁰⁾。エルゴステロール結合能が失われた変異 *KESI* では三重変異株の生育阻害が抑制されないことから、リン脂質の非対称性の

異常がステロールに関連する可能性が示唆された。

*KESI*の結果を踏まえて、Filipin（ステロール染色用蛍光試薬）染色によりエルゴステロール分布を解析した。野生株や二重変異株では、ステロールはその大部分が細胞膜に分布しており、細胞内には検出されなかった（図2A左、二重変異株のデータは割愛）。一方、三重変異株では、細胞膜のシグナルが失われ、細胞内膜構造に染色像が確認された（図2A左）。蛍光（TopFluor）-コレステロールを細胞外から導入した実験では、野生株では細胞膜に保持される蛍光シグナルが三重変異株では観察されず、細胞内の膜構造に観察された（図2B）。これらの膜構造は、脂肪滴のマーカータンパク質（*Faa4* など）と一致していた（図2C）。また、脂質を抽出してステロールを定量したところ、三重変異株では、細胞膜に多く分布する遊離型エルゴステロールが減少していた一方で、脂肪滴の主成分であるエルゴステロールエステルが増加していた。したがって、細胞膜のリン脂質非対称性はステロール分子の保持において重要な役割を持ち、その機能が失われると、エルゴステロールが細胞膜に保持されず細胞内に輸送され、小胞体においてエルゴステロールエステルに変換されて脂肪滴に蓄積されたものと考えられる。

リン脂質非対称性の異常により、なぜ細胞膜からエルゴステロールが失われるのであろうか？ これについて筆者らは、ステロールとリン脂質間の相互作用の欠如に起因すると考えている。リン脂質は、その頭部基や脂肪酸鎖を介してステロールと相互作用し、これは膜脂質の秩序化や脂質のパッキングに寄与する¹¹⁾。ステロール構造は、リン脂質の不飽和脂肪酸鎖よりも飽和脂肪酸鎖に対してより高い

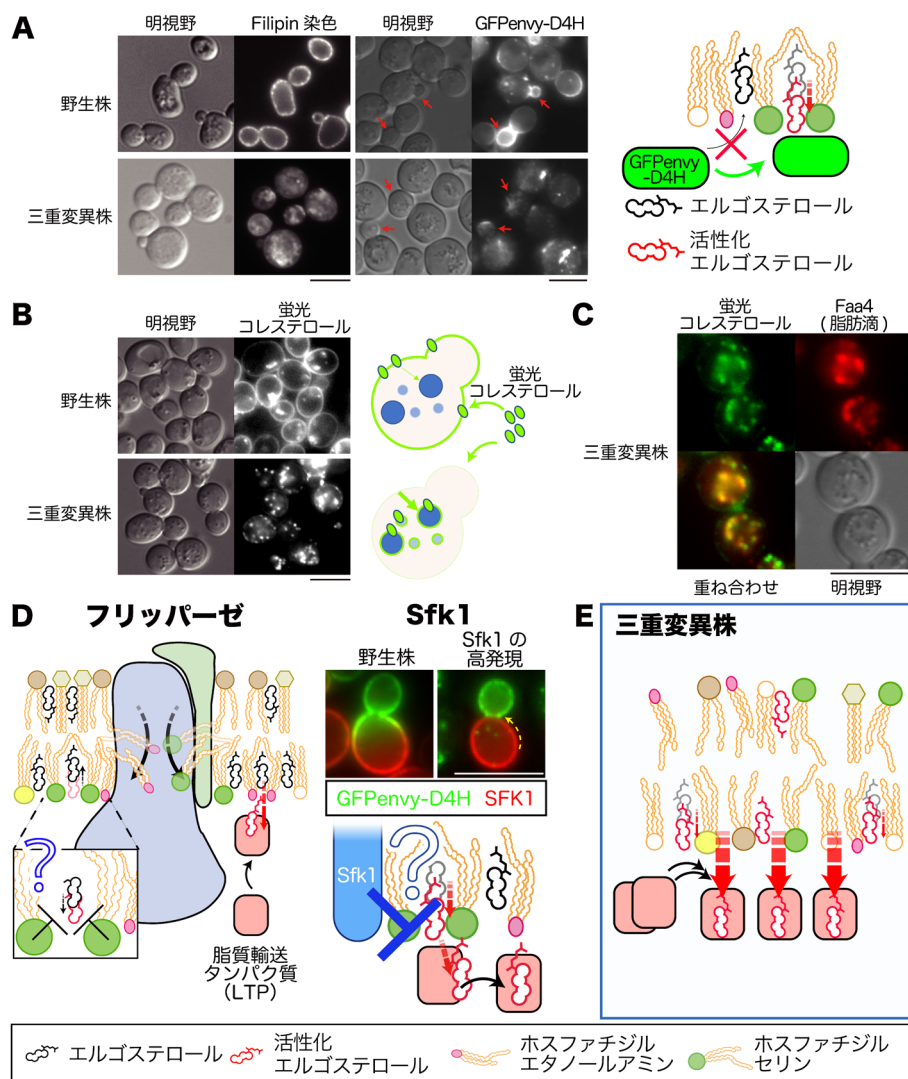


図2 リン脂質非対称性の異常が引き起こす細胞膜ステロールの消失

(A) フリッパーゼ β -サブユニット2種の欠損変異 (*crf1 lem3*) とリン脂質非対称性制御遺伝子 *sfk1* 欠損変異を組み合わせた *crf1 lem3 sfk1* 三重変異株 (三重変異株) では、細胞膜リン脂質非対称分布の異常 (データは割愛) と細胞膜ステロールの消失が確認された。Filipin 染色 (左) とステロールプローブ GFPenvy-D4H (中央) により野生株と三重変異株の細胞膜ステロール分布を観察した。各遺伝子の二重変異株は表現型が観察されなかった (データは割愛)。GFPenvy-D4H は、細胞膜の内部から細胞質側に露出するエルゴステロール (活性化ステロール) を検出すると考えられる (右)。図中央の矢印は、出芽 (母細胞の一部から娘細胞が形成され次第に成長し新個体となる分裂様式) 部位を表す。(B) 野生株と三重変異株に細胞外から蛍光コレステロール (TopFluor-コレステロール) を導入し、その動態を解析した。(C) 三重変異株で観察された細胞内蛍光コレステロール (緑) の斑点状膜構造は脂肪滴マーカー (Faa4-mCherry, 赤) と一致した。(D) フリッパーゼと Sfk1 によるステロール活性化の抑制機構の可能性。かさ高い頭部を有するホスファチジルセリンがフリッパーゼにより輸送され、細胞膜内層側に保持されることにより、ステロールの活性化を抑制する可能性が考えられる (左)。GFPenvy-D4H (緑) は出芽部位に局在化し、母細胞に局在する Sfk1 (Sfk1-mCherry, 赤) とは逆相関の分布パターンを示しており、Sfk1 の高発現により出芽部位での GFPenvy-D4H 分布が縮小化した (右)。このような結果から、Sfk1 は活性化ステロールを抑制している可能性が示唆された。(E) 三重変異株では、フリッパーゼと Sfk1 によるエルゴステロールの活性化を抑制する機能を喪失したことにより、過剰に生じた活性化ステロールが脂質輸送タンパク質 (LTP) により抽出され、細胞膜からエルゴステロールが失われたのではないかと推測される。Bar は 5 μ m。文献8の一部を改変。

親和性を示す¹¹⁾。出芽酵母の細胞膜に存在する PS および PE の脂質種は、他のオルガネラに比べて飽和脂肪酸鎖の割合が高く¹¹⁾、ステロールに対してより強固な相互作用を

持つと予測される。加えて、膜中では、リン脂質の頭部基が非極性のステロールを細胞質相から遮断することが提唱されている (図2D左)。実際、大きな頭部基を有する PS

は、他のリン脂質よりもコレステロールへの親和性が高い^{12, 13)}。そのため、リン脂質が細胞膜内層に維持されることにより、相互作用が担保され細胞膜内部にステロール分子が保持されるが、そのような保護機能が失われると、ステロール分子がLTPなどにより過剰に細胞膜から引き抜かれる可能性が推測される (図2E)。

3. Sfk1が示す新しい脂質制御機構の可能性

筆者らは、細胞膜ステロール保持機構の解析の過程で、新たにステロールプローブ GFPenvy-D4Hを開発した。動物細胞の実験系を中心に、ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) のコレステロール結合型毒素 perfringolysin O のステロール結合ドメイン4 (domain 4: D4) をプローブとして用いたステロール分布の解析が行われている^{13, 14)}。筆者らがD4プローブを元に開発したGFPenvy-D4Hは、エルゴステロールを25%以上含む人工膜に結合する。出芽酵母内でのGFPenvy-D4Hの発現により細胞膜内層のエルゴステロールを検出したところ、Filipin染色同様にGFPenvy-D4Hの分布は、野生株では細胞膜に認められる一方、三重変異株では細胞膜にはみられなかった (図2A中央)。興味深いことに、細胞膜全体のステロールを検出するFilipin染色とは異なり、野生株でのGFPenvy-D4Hは、出芽部位に極性分布する特徴的なパターンを示した (図2A中央-上図、矢印)。これについて筆者らは、膜におけるステロールの分子状態の違いを反映していると考えている。ステロール分子は通常、周囲のリン脂質により細胞膜中に包埋され膜外の物質との接触が制限されているが、最近、ステロール濃度の上昇や周囲の膜脂質環境の変化が起こることによってその制限が解除され膜表面に露出する「ステロール活性化」または「ステロールアクセシビリティの上昇」と呼ばれる膜内状態を示すことが分子モデルとして提唱されている¹⁾。活性化ステロールは、細胞質中のLTPとの接触確率が高まり、膜脂質交換反応が促進されると考えられるため、ステロール恒常性に密接に関わる現象であると予測される。Filipin染色の結果、ステロール分子は細胞膜では均一に分布することが示されたことから、筆者らは、GFPenvy-D4Hがこのような露出したステロール分子に結合しており、出芽部位と母細胞でのエルゴステロールの物理的な状態の違いを検出していると推測している (図2A右)。出芽部位の細胞膜は新生膜であるため、リン脂質非対称性が形成途上にある膜である。このような膜では、ステロールの細胞質相への露出が頻繁に起こるため、GFPenvy-D4Hにより検出される活性化ステロールが多いと考えられる。それに対して、母細胞の細胞膜は成熟した脂質分布になっており、ステロール分子はリン脂質による遮蔽効果により検出されにくいと考えられる。

興味深いことに、野生株でのSfk1は母細胞の細胞膜に分布しており、GFPenvy-D4Hの出芽部位における極性分布とは逆相関の分布像を示している (図2D右)。さらに、Sfk1を高発現させたときには、出芽部位でのGFPenvy-D4Hの分布がより縮小化していることから、Sfk1が、母細胞において活性化ステロールを抑制している可能性が考えられる (図2D右)。以前の筆者らの研究で、Sfk1はリン脂質の二重層間の移動を抑制する可能性を示している⁶⁾。したがって、Sfk1は、フリッパーゼとは異なる機構でリン脂質の非対称性を維持することで、ステロールの活性化を抑制しているのかもしれない。また、Sfk1が直接、脂質間相互作用を強めることにより、活性化エルゴステロールを減少させることも興味深い可能性として考えられる。Sfk1の活性はほとんど未解明であり、詳細な解明が待たれる。

4. おわりに

細胞生物学の中でも細胞膜のリン脂質非対称性が有する生理的意義については、長い間、解決されていない疑問であった。筆者らの結果は、その機能の一つの可能性を見いだしたものであるが、細胞膜ステロール恒常性を維持する機構においてどのような位置づけとなるかは今後も解析を続けていく必要がある。筆者らが見いだしたSfk1によるステロール活性化の抑制の可能性についても、*sfk1*の単独変異株では、ステロールに関して表現型がみられないことから、他にも関わる因子が存在すると予測される。Sfk1の機能解析に加えて、このような因子の同定も必要であろう。また、フリッパーゼやSfk1によるステロール保持機能とは競合的に働く細胞膜からステロールを抽出するLTPの同定も必要であろう。活性化ステロールに関しては、出芽部位と母細胞間でのGFPenvy-D4Hの分布様式の違いの生理的意義や詳細な制御機構、さらには膜の成熟との相関について今後の興味深い課題となると考えている。

文 献

- 1) Lange, Y. & Steck, T.L. (2020) Active cholesterol 20 years on. *Traffic*, **21**, 662–674.
- 2) Das, A., Brown, M.S., Anderson, D.D., Goldstein, J.L., & Radhakrishnan, A. (2014) Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. *eLife*, **3**, e02882.
- 3) Wong, L.H., Copic, A., & Levine, T.P. (2017) Advances on the transfer of lipids by lipid transfer proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 516–530.
- 4) van Meer, G. (2011) Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, a004671.
- 5) Panatula, R., Hennrich, H., & Holthuis, J.C. (2015) Inner workings and biological impact of phospholipid flippases. *J. Cell Sci.*, **128**, 2021–2032.

- 6) Mioka, T., Fujimura-Kamada, K., Mizugaki, N., Kishimoto, T., Sano, T., Nunome, H., Williams, D.E., Andersen, R.J., & Tanaka, K. (2018) Phospholipid flippases and Sfk1p, a novel regulator of phospholipid asymmetry, contribute to low permeability of the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*, **29**, 1203–1218.
- 7) Bevers, E.M. & Williamson, P.L. (2016) Getting to the outer leaflet: Physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol. Rev.*, **96**, 605–645.
- 8) Kishimoto, T., Mioka, T., Itoh, E., Williams, D.E., Andersen, R.J., & Tanaka, K. (2021) Phospholipid flippases and Sfk1 are essential for the retention of ergosterol in the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*, **32**, 1374–1392.
- 9) Frøsig, M.M., Costa, S.R., Liesche, J., Osterberg, J.T., Hanisch, S., Nintemann, S., Sorensen, H., Palmgren, M., Pomorski, T.G., & Lopez-Marques, R.L. (2020) Pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae* involves protein kinase-regulated lipid flippases. *J. Cell Sci.*, **133**, jcs.235994.
- 10) Antonny, B., Bigay, J., & Mesmin, B. (2018) The oxysterol-binding protein cycle: Burning off PI(4)P to transport cholesterol. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 809–837.
- 11) Mesmin, B. & Maxfield, F.R. (2009) Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 636–645.
- 12) Nyholm, T.K.M., Jaikishan, S., Engberg, O., Hautala, V., & Slotte, J.P. (2019) The affinity of sterols for different phospholipid classes and its impact on lateral segregation. *Biophys. J.*, **116**, 296–307.
- 13) Mackawa, M. & Fairn, G.D. (2015) Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J. Cell Sci.*, **128**, 1422–1433.
- 14) Kishimoto, T., Ishitsuka, R., & Kobayashi, T. (2016) Detectors for evaluating the cellular landscape of sphingomyelin- and cholesterol-rich membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**(8 Pt B), 812–829.
- 15) Shin, H.W. & Takatsu, H. (2019) Substrates of P4-ATPases: Beyond aminophospholipids (phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine). *FASEB J.*, **33**, 3087–3096.

著者寸描

●岸本 拓磨 (きしもと たくま)



北海道大学遺伝子病制御研究所助教。博士(医学)。

■略歴 1976年北海道札幌市に生まれる。2000年北海道大学工学部卒業。02年同大学院修士過程修了。06年同大学院医学博士課程修了。06年米国カリフォルニア大学バークレー校博士研究員。10年理化学研究所特別研究員(11年より基礎科学特別研究員)。杏林大学での勤務を経

て、17年より現職。

■研究テーマ 細胞膜脂質の分布様式とその生理的意義の解明。

■抱負 酵母と動物細胞の実験系で検証し、細胞膜構成脂質(特にステロールとリン脂質)分布制御機構やその機能など真核生物に普遍的に存在するシステムを解明したい。

■ウェブサイト <https://www.igm.hokudai.ac.jp/molint/>

■趣味 スノーボード(新雪攻め)、料理、寺社巡り。