

氏 名	こ ばやし たか ふみ 小 林 孝 史
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 49 号
学位授与の日付	平 成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	ホスファチジルイノシトール 4 リン酸 5 キナーゼである Mss4 のスフィンゴ脂質生合成阻害剤 ISP-1 に対する耐性機構に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 小 堤 保 則	教 授 西 田 栄 介	教 授 稲 葉 カ ヲ
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

スフィンゴ脂質生合成阻害剤である ISP-1 は、細胞内スフィンゴ脂質量を減少させることにより細胞死を誘導することが示されている。しかし、スフィンゴ脂質がどのように細胞の生存に関与しているのかについては、未知な点が多く残されている。申請者は、出芽酵母をモデル生物として用いて ISP-1 誘導性の細胞死に対するマルチコピーサプレッサー遺伝子を単離することにより、スフィンゴ脂質の機能に関与する遺伝子の単離を試みてきた結果、*SLI6* の単離に成功した。*SLI6* はイノシトールリン脂質のリン酸化酵素であるホスファチジルイノシトール 4 リン酸 5 キナーゼ (PI4P 5-kinase) をコードする *MSS4* と同一遺伝子であり、*MSS4* の強制発現株はスフィンゴ脂質の生合成を回復することなく ISP-1 耐性を上昇させた。そのことから、*Mss4* の ISP-1 耐性機構を解明することにより、未知なイノシトールリン脂質とスフィンゴ脂質の生理的機能との関連が解明されることが期待された。

次に、*Mss4* のリン酸化活性を失わせた変異体は強制発現しても ISP-1 耐性を示さないことから、*Mss4* 強制発現株の ISP-1 耐性にはその PI4P 5-kinase 活性が重要であることが示された。また、*Mss4* の産物であるホスファチジルイノシトール (4,5) 二リン酸 (PI(4,5)P₂) の加水分解酵素である *Plc1* の欠損株では ISP-1 耐性の上昇が見られたことから、*Mss4* の ISP-1 耐性は細胞内の PI(4,5)P₂ 量が上昇することに起因することが示唆された。ISP-1 処理した細胞では *Mss4* の PI4P 5-kinase 活性が減少していたこと、およびその減少は ISP-1 と膜透過性のスフィンゴ脂質のひとつであるファイトスフィンゴシンの同時処理により回復したことから *Mss4* の正常な活性にはスフィンゴ脂質が必要であることが示唆された。EGFP-*Mss4* の融合タンパクの発現コンストラクトを作製し *Mss4* の細胞内局在を観察したところ、*Mss4* は ISP-1 処理により細胞膜から細胞質中に局在を変えたことから、スフィンゴ脂質により *Mss4* の細胞内局在も調節を受ける可能性が示唆された。

Mss4 の下流因子の一つとして知られている Rho1 および Rho2 の活性化を介する経路と *Mss4* の ISP-1 耐性との関連を調べたところ、Rom2, Rho2, Pkc1 などこの経路上の遺伝子のいくつかは、*Mss4* と同様に強制発現により ISP-1 耐性を上昇させることが明らかにされた。また、PI(4,5)P₂ により出芽部分や分裂溝への局在が安定化される Rom2 が、ISP-1 処理により局在を変化させたことから ISP-1 処理は Rho1 および Rho2 の活性化を介する経路を阻害していることが考えられた。

以上に記したように、本研究により申請者は PI4P 5-kinase をコードする *MSS4* の強制発現株がスフィンゴ脂質生合成阻害剤 ISP-1 に対する耐性を上昇させることを明らかにした。また、*Mss4* の PI4P 5-kinase 活性および細胞膜への局在が、スフィンゴ脂質によって調節を受けていることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生体膜の構成脂質として知られているスフィンゴ脂質は、近年の研究により細胞増殖やエンドサイトーシス、ストレス応

答、シグナル伝達系への関与など多くの生理機能を有していることが明らかにされてきている。申請者の所属する研究室では、これまでに免疫抑制物質として知られる ISP-1 がスフィンゴ脂質の生合成経路を阻害するツールとして使用できることを明らかにしている。ISP-1 処理によりスフィンゴ脂質の生合成量が減少し、その結果として、哺乳動物細胞や酵母細胞の増殖が停止し、最終的に細胞死に至る。

申請者は、遺伝的操作が容易な出芽酵母をモデル生物として ISP-1 誘導性の細胞死に対するマルチコピーサプレッサー遺伝子 (ISP-1 耐性遺伝子) を単離し、その耐性機構の解析を行うことにより、スフィンゴ脂質の新たな機能を明らかにしようと考えた。このような方法を用いて単離した *SLI6* は、*MSS4* と同一の遺伝子であった。*MSS4* のコードするタンパク質 Mss4 は、スフィンゴ脂質と同様に生体膜の構成脂質であるイノシトールリン脂質の分子種の一つホスファチジルイノシトール 4, 5 ニリン酸 (PI(4,5)P₂) を産生するホスファチジルイノシトール 4 リン酸 5 キナーゼ (PI4P 5-kinase) 活性を持つことが知られている。そこで、Mss4 強制発現による ISP-1 耐性機構について詳細に検討を行うことでスフィンゴ脂質と Mss4 の関係を明らかにした。本研究の中で評価すべき点は以下の通りである。

1. Mss4 強制発現による ISP-1 耐性には、その PI4P 5-kinase 活性が必要であることが示された。また、Mss4 の産物である PI(4,5)P₂ の加水分解酵素である Plc1 の欠損株では野生株に比べて ISP-1 耐性を上昇させたことから、Mss4 強制発現株の ISP-1 耐性の上昇は細胞内 PI(4,5)P₂ 量の増加によるものであることが明らかにされた。
2. ISP-1 処理により Mss4 の PI4P 5-kinase 活性が減少すること、さらに Mss4 の細胞膜局在が阻害されることを明らかにした。また、種々のスフィンゴ脂質生合成欠損株を用いることにより、Mss4 の細胞膜局在に必要なスフィンゴ脂質分子は MIPC であると推定された。
3. Mss4 の下流のシグナル分子である Rom2 の細胞内局在が ISP-1 処理や MIPC 欠損株により変化したことから、これらスフィンゴ脂質の変化は Mss4 の機能を損なうことにより Rom2 以下の下流のシグナルを阻害することが明らかにされた。
4. ISP-1 処理によるアクチンケーブルの消失が Mss4 を強制発現することにより回復することから、Mss4 強制発現株の ISP-1 耐性の上昇はアクチン局在の異常を回復することによるものであると推定された。

これらの知見は、酵母の PI4P5-kinase である Mss4 の機能及びその下流のシグナル伝達にはスフィンゴ脂質が重要な役割を果たしていることを示すものである。

以上より本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。更に、平成17年 5 月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。