

# 平成 25 年度「地神芳文記念研究助成」 成果報告要旨

研究題目：脂質非対称センサーの解剖

研究者：小原 圭介

所属：北海道大学大学院薬学研究院

細胞膜の脂質二重層では、内層（細胞質側）と外層（細胞外側）で脂質組成が大きく異なっている。例えば、ホスファチジルセリン（PS）はほとんどが内層に存在し、複合スフィンゴ脂質は外層に多い。このような「脂質非対称」の適切な維持・

制御は、膜電位形成、極性形成、小胞輸送、アポトーシス細胞の除去など様々な過程に関わり、その部分的な破綻でさえ様々な疾患をもたらす。私達はこれまでに、脂質非対称の乱れを Rim101 経路が感知する事を見出し、そのセンサータンパク質として Rim21 を同定した。さらに、Rim21 の C 末端領域（Rim21C）にセンサーモチーフが存在する事も示唆している。そこで、本研究では Rim21C の網羅的変異解析を行い、センサーモチーフの絞り込みを行った。Rim21C が荷電アミノ酸残基に非常に富んでいたため、まずは荷電アミノ酸残基に対する Ala スキャンを行った。その結果、Rim21C 内の N 末端側に位置する 3 つの Glu 残基が Rim21 の機能に必須であることを見出した。そこで、その 3 つの Glu を Ala に置換した Rim21C（Rim21C (3E→3A)）部分と GFP を融合したタンパク質の局在を酵母細胞内で観察した。通常の GFP-Rim21C は、これまでの結果通り、野生株では細胞膜に結合し、脂質非対称が乱れた *lem3Δ* 株では細胞膜から完全に遊離しており、脂質非対称の変化を感知して反応（細胞膜からの遊離）する事が出来た（図 1）。しかし、Rim21C (3E→3A) は *lem3Δ* 株でも細胞膜に結合したままであり、脂質非対称の変化を感知出来なくなっていた。この事から、この 3 つの Glu 残基がセンサーモチーフ、あるいはその一部である事が示唆された。そこで周辺領域の変異解析を進めたところ、近傍にある GluArgLysGluGlu という配列も脂質非対称センシングに関与する事が明らかになり、「GluArgLysGluGlu による細胞膜への親和性」と「3 つの Glu 残基による細胞膜からの反発力」のバランスによって脂質非対称が感知されている様子が浮かび上がってきた。

その一方で、Rim21 が感知する脂質分子種の絞り込みも行った。細胞膜内層に多い PS が全く存在しない *cho1Δ* 株では、GFP-Rim21C は細胞膜から遊離した（図 1）。しかし、Rim21C (3E→3A) は細胞膜に結合したままであった。この事から、3 つの Glu 残基が少なくとも細胞膜内層の PS の有無を見分けている事が示唆された。

