

mTORC2 suppresses cell death induced by hypo-osmotic stress by promoting sphingomyelin transport

小野, 由美子

<https://hdl.handle.net/2324/4795531>

出版情報 : 九州大学, 2022, 博士 (理学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 小野 由美子

論 文 名 : mTORC2 suppresses cell death induced by hypo-osmotic stress by promoting sphingomyelin transport
(mTORC2 はスフィンゴミエリン輸送を促進することにより、低浸透圧ストレスによる細胞死を抑制する)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

生体膜を構成する脂質分子は数千種類に及ぶ。生体膜を構成する脂質の中でも、スフィンゴミエリンはユニークな性質を持つと考えられている。生体膜に含まれるリン脂質のうち、スフィンゴミエリンは炭素数 20 以上かつ二重結合を含まない長鎖飽和脂肪酸を有しており、脂肪酸鎖間において高いファンデルワールス力が働く。さらに、スフィンゴミエリンのセラミド骨格内のアミド結合と、コレステロールのヒドロキシル基の間で水素結合が生じる。これらの分子間相互作用により、人工脂質二重膜を用いた実験では、スフィンゴミエリンはコレステロールと共に、他のリン脂質によって形成される膜領域よりも、秩序だったマイクロスケールサイズの大きな膜ドメインを形成する。一方で、生体膜においてはこのような大きな膜ドメインの形成は認められず、生体膜におけるスフィンゴミエリンの存在量を厳密に制御する分子機構が存在すると考えられる。スフィンゴミエリンは形質膜の外層に多く分布しており、上皮細胞においてはアピカル膜に多く存在している。このような他のリン脂質とは異なる物性を示すスフィンゴミエリンの形質膜への輸送の制御機構は殆ど明らかになっていない。

本研究において、スフィンゴミエリンの形質膜への輸送の制御機構を明らかにするために、私はまず上皮細胞におけるスフィンゴミエリンの細胞内の輸送過程を可視化することを試みた。スフィンゴミエリンに特異的に結合することが報告されている、シマミミズ *Eisenia foetida* の体腔液由来タンパク質である Lysenin (Lys) に、分泌タンパク質のシグナル配列 (SS) 及び緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させたキメラタンパク質 (SS-GFP-Lys) を考案し、このコンストラクトを安定発現する上皮細胞を樹立した。共焦点顕微鏡を用いたライブイメージング観察を行うと、スフィンゴミエリンが生合成される Golgi 体に SS-GFP-Lys が集積する様子が観察された。さらに Golgi 体から出芽する輸送小胞においては、アピカル膜に局在する膜タンパク質を含む輸送小胞に SS-GFP-Lys が含まれることを見出した。このことから、Golgi 体からアピカル膜への輸送小胞の形成の際にスフィンゴミエリンを含む輸送小胞が形成されることが明らかになった。

次に、スフィンゴミエリンの形質膜への輸送を制御する分子機構を明らかにする目的で、SS-GFP-Lys を安定発現する上皮細胞に対して、スフィンゴミエリンの輸送に影響を及ぼす化合物のライブラリースクリーニングを行った。細胞内にスフィンゴミエリンの輸送小胞の蓄積をもたらす化合物として、Torin-1 と Ku-0063794 を同定した。これらの化合物はいずれも mammalian target of rapamycin (mTOR) に対する阻害剤であることから、mTOR complex (mTORC) 経路がスフィンゴミエリンの輸送に関与することが示唆された。mTORC は mTOR キナーゼ以外の構成

タンパク質群の違いによって mTORC1 と mTORC2 の 2 種類存在することが報告されている。そこで、各 mTOR 複合体のキナーゼ活性に必須の足場タンパク質である Raptor (mTORC1) と Rictor (mTORC2) をそれぞれノックダウンした細胞を樹立した。Rictor ノックダウン (Rictor KD) 細胞のみ、mTOR に対する阻害剤で処理した細胞と同様の表現型を示したことから、mTORC2 経路がスフィンゴミエリンの細胞内輸送過程を制御すると結論した。Rictor KD 細胞において、アピカル膜へのスフィンゴミエリンの輸送が障害された結果、アピカル膜のスフィンゴミエリン量が減少し、アピカル膜の微絨毛が消失していることを見出した。

さらに、イヌ腎臓尿細管上皮細胞 MDCK 細胞の 3 次元培養を用いて、mTOR 経路がアピカル膜形成に与える影響を検討した。スフィンゴミエリンの生合成阻害剤もしくは mTOR 阻害剤を添加した条件で培養を行うと、いずれの場合も、アピカル膜の形成と管腔の融合が障害され、複数の管腔を有する異常な管腔構造を示すことが明らかになった。このような表現型は、先行研究において低分子量 G タンパク質 Rab35 のノックアウト細胞の表現型とよく一致していたことから、Rab35 が mTORC2 経路の下流でスフィンゴミエリンの輸送を制御するのではないかと考え、その可能性を検証した。Rab35 の恒常活性化型の過剰発現は、mTORC2 経路の障害によるスフィンゴミエリンを含む輸送小胞の蓄積を解消することを見出した。また逆に Rab35 の恒常不活性化型を過剰発現した細胞においては、スフィンゴミエリンの輸送小胞が細胞内に蓄積する様子が観察された。このことから、mTORC2 経路の下流において Rab35 が活性化することが示唆された。

最後に、mTORC2 経路によって制御されるスフィンゴミエリンのアピカル膜への輸送機構の生理的な役割について検討を行った。上皮細胞は体表や臓器の表面に位置し、様々な浸透圧溶液に曝されている。消化管上皮細胞においては、アピカル膜側の管腔を流れる唾液 (30 mOsm/L) や真水などの極めて浸透圧の低い溶液に曝されている。私は、このような低浸透圧溶液に曝された上皮細胞において、1 分以内に急速にアピカル膜のみが選択的に拡大するという現象を見出した。その意義として、アピカル膜が拡大することによって細胞の容積を増加させ、水分子の流入による膨圧を和らげて、細胞膜の破裂による細胞死を回避していると考えた。低浸透圧溶液の負荷に対するアピカル膜の選択的な拡大において、アピカル膜を構成するスフィンゴミエリンの輸送が重要な役割を果たしているのではないかと考えて、アピカル膜へのスフィンゴミエリンの輸送が障害される Rictor KD 細胞並びに Rab35 KO 細胞を低浸透圧溶液に曝したところ、野生型細胞と比較して、形質膜の破裂を伴う細胞死が有意に増加した。さらに、Rictor KD 細胞に Rab35 の恒常活性化型を発現させると、低浸透圧ストレスによる形質膜の破裂が抑制された。このことから、mTORC2 経路の下流において Rab35 の活性化が、上皮細胞の低浸透圧ストレス応答に必須であることが示唆された。

上皮細胞を低浸透圧溶液に曝した際に、アピカル膜のアクチン皮質が著しく減少する一方で、基底側膜のアクチン皮質はほとんど変化しないことから、mTORC2-Rab35 経路はアピカル膜のアクチン皮質の選択的な分解を促進している可能性が示唆された。そこで mTORC2-Rab35 経路の下流で働くアクチン皮質の制御に関わる因子を探索したところ、アクチン皮質の形質膜への係留に必要な細胞膜脂質である phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) が低浸透圧ストレスによって急激に減少することを見出した。解析の結果、mTORC2-Rab35 経路の下流で、PI(4,5)P₂ の分解酵素が活性化し、アピカル膜のアクチン皮質が減少することで、スフィンゴミエリンを含むアピカル膜への輸送小胞と形質膜の融合が促進されることが明らかになった。

以上のことから、本研究によって上皮細胞のスフィンゴミエリンの輸送に関わる分子機構として、mTORC2-Rab35 経路を同定した。さらに、この経路を介したスフィンゴミエリンの輸送は、上皮細胞が低浸透圧ストレスに対する細胞死を回避する上で必須であることを見出した。