

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14507

研究課題名(和文) ライプセルリン脂質輸送反応イメージングの開発

研究課題名(英文) Development of live-cell assay system for monitoring phospholipid transport

研究代表者

田村 康 (Tamura, Yasushi)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：50631876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に存在する複雑な膜構造(オルガネラ)の間で、どのように膜の主成分であるリン脂質輸送が配送、選別させるのかはほとんど明らかになっていない。この主な原因は細胞内リン脂質輸送を解析するための有効な実験系が不足していることだと考えられる。本研究では、細胞内リン脂質輸送メカニズムの新規解析手法の開発を行い、様々なオルガネラ膜間におけるリン脂質輸送を解析するための実験系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：It has been largely unknown how phospholipid, major constituents of cellular membranes, travel within cells due to lack of reliable assay system to analyze phospholipid transport. To overcome this shortcoming, we tried to develop a novel assay system for directly measuring phospholipid transport in cells. By expressing PssA, which is the E. coli PS (phosphatidylserine) synthetic enzyme in a number of cellular compartments within yeast cells, we succeeded to observe PS transport from various organelles to mitochondria.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：リン脂質 オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

近年、生体膜間リン脂質輸送が、オルガネラ形態制御や、アポトーシスなどの重要なイベントに関与する事が示され、その分子機構に注目が集まっている。またリン脂質輸送が異なるオルガネラ同士の近接部位で行われることが発見され、予期しないオルガネラ間相互作用を介してリン脂質輸送が仲介されている可能性も考えられる。出芽酵母では、リン脂質の多くが小胞体上で合成されるため、細胞内に存在する異なるオルガネラ膜が、独自の特徴的な脂質組成を維持するためには、適切なリン脂質輸送の調節が必須である。またミトコンドリアや、エンドソームもカルジオリピン (CL) やホスファチジルエタノールアミン (PE) と言った一部のリン脂質を合成するため、これらのオルガネラ膜からも脂質は分配されるはずである。しかしながら現在、オルガネラ膜間でリン脂質輸送を仲介する因子はほとんど同定されていない。また、異なるオルガネラ間でリン脂質輸送経路にどのようなものが存在するのかはほとんどと言ってよいほど不明である。さらにオルガネラ間リン脂質輸送を評価するための有用な解析手法にも乏しい。特定のリン脂質をモニターするためのプローブも開発されているが、特定の脂質に結合することで、脂質の流動性を阻害してしまう可能性があり、リン脂質輸送解析のためには、より特異的で、影響の小さいプローブを用いて解析することが重要である。このような状況からリン脂質輸送研究は、タンパク質輸送研究の分野に比べ研究がほとんど進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内リン脂質輸送メカニズムの新規解析手法の開発のために、蛍光性アミノリン脂質合成酵素の創成を目指した。このような蛍光性アミノリン脂質合成酵素を開発できれば、特定のオルガネラ膜上で合成させた蛍光性リン脂質の、時間経過による局在変化を蛍光顕微鏡下でモニターできるようになり、*in vivo* でのリン脂質輸送解析が可能となる。このような手法が開発できれば、細胞内のオルガネラ間リン脂質輸送機構解明のブレイクスルーになるはずである。

また蛍光アミノリン脂質合成酵素を創生できてもその細胞内局在を変化させることが出来なければ、意味がない。そこで本研究では、可溶性ホスファチジルセリン (PS) 合成酵素 PssA を利用する。可溶性の酵素であれば様々なオルガネラ局在化シグナルを付加することで、異なるオルガネラに思い通りの膜トポロジーで発現することが可能となる。最終目標である蛍光アミノリン脂質合成酵素の創成が達成できなくとも、異なる細胞内区画で PS を合成した研究はほとんどないため、リン脂質輸送機構解析における新しい研究ツールとしての応用が可能である。すな

わち、PS を合成した場所から、その他オルガネラへのリン脂質輸送を評価できる実験系の確立が可能である。本研究のバックアッププロジェクトとして、PssA を利用した細胞内リン脂質輸送解析法の確立を目指す。

3. 研究の方法

出芽酵母では、ホスファチジルセリン (PS) は高エネルギー中間体リン脂質 CDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG) とセリンを原料として、Cho1 と呼ばれる PS 合成酵素による触媒作用により合成される。しかし Cho1 は複数回膜貫通タンパク質であるため、改変が難しく、細胞内局在を変化させることも容易でない。そこで本研究では可溶性 PS 合成酵素である大腸菌の PssA と呼ばれるタンパク質に着目する。PssA も Cho1 と同様、CDP-DAG とセリンから PS を合成するが、突然変異を導入し構造を改変することにより、通常セリンではなく、蛍光ラベルしたセリンを特異的に基質として認識する改変 PS 合成酵素の創成を目指す。このような酵素を細胞内の特定の領域で発現させることにより、様々な細胞区画で合成された蛍光リン脂質の運命を追跡可能になるはずである。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母 PS 合成酵素 Cho1 の欠損株を相補する改変 PssA の創生

研究開始当初は、出芽酵母 PS 合成酵素 Cho1 を欠損した株の小胞体内腔に PssA を発現させても、その PS 合成酵素活性は Cho1 の 20% 程度であり、Cho1 欠損による増殖阻害をほとんど相補できないことがわかっていった。そこでまず、出芽酵母で十分量の PS を合成できる PssA の創出を目標にした。まず組換え PssA を大腸菌から精製し、これを抗原として用いることにより PssA を特異的に認識する抗体を作製した。この抗体を用いてウェスタンブロッティングをおこない、PssA が出芽酵母において発現しているかを確認した。その結果、小胞体内腔に PssA を発現させた場合その発現が検出できるものの、ミトコンドリア外膜、膜間部、マトリクス、サイトゾル側小胞体膜、ペルオキシソーム膜、脂肪滴など様々なオルガネラに標的した PssA の発現は確認できなかった (Fig.1)

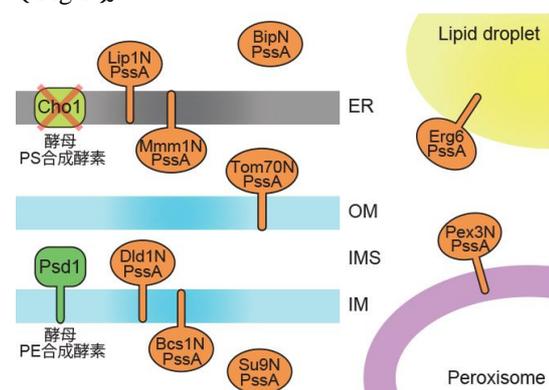


Fig. 1 異なるオルガネラ膜でのPssAの発現

この低い発現量の原因が、大腸菌のゲノムからクローニングした遺伝子を出芽酵母に導入したこと、すなわち大腸菌と出芽酵母間のコドンの相性が悪い可能性を考慮し、出芽酵母の発現用にオプティマイズした PssA 遺伝子を出芽酵母に導入したところ、PssA が安定して発現することを確認した (Fig.2)。

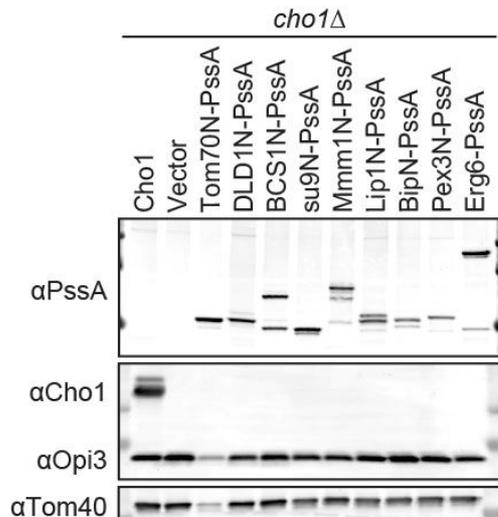


Fig. 2 PssAの発現確認

さらに Cho1 の欠損を、これら様々なオルガネラ膜上に発現させた PssA が機能的に相補するかを、酵母株の増殖を指標に検討した。その結果、小胞体内腔側から小胞体膜に挿入された PssA (Lip1N-PssA) や、ペルオキシソーム (Pex3N-PssA)、脂肪滴 (Erg6-PssA) に標的化した PssA が、Cho1 の欠損による増殖阻害を回復させることがわかった (Fig.3)。

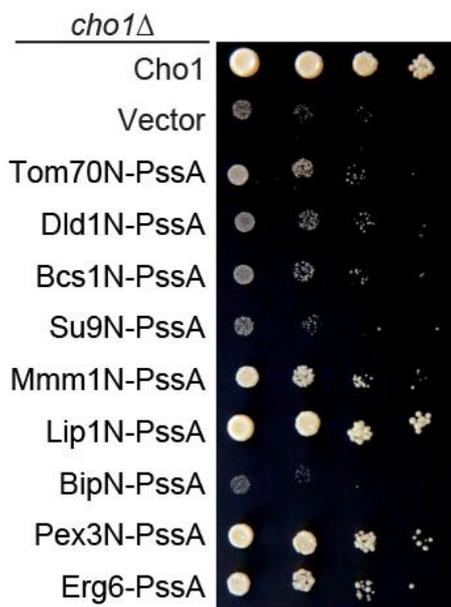


Fig. 3 PssAの発現Cho1欠損株の増殖

その一方で、PssA が持つホスホリパーゼ D 活性に重要な HDK モチーフに変異を導入した、PssA-H138A 変異体、PssA-H357A 変異体を、Lip1N や Pex3N の融合タンパク質として発現させても、Cho1 欠損株の増殖阻害を回復させることができなかったことから、PssA の活性が Cho1 欠損株の増殖回復に重要であることを確認した (Fig.4)。

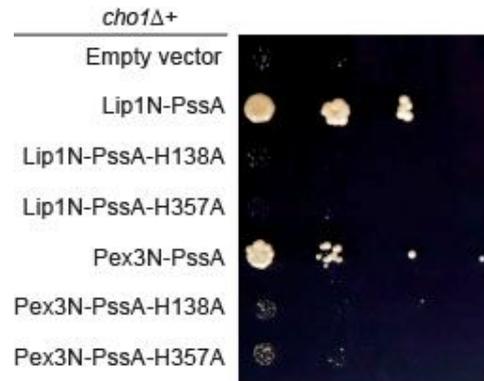


Fig. 4 PssA 不活性変異体の発現では、Cho1 の欠損を相補できない

さらに実際に Pex3N-PssA や Erg6-PssA がペルオキシソームや脂肪滴に標的化しているかを確認するため、C 末端に GFP を融合した PssA を発現させて見たが、これら GFP 融合 PssA は、Cho1 欠損を相補することができなかった (Fig. 5)。

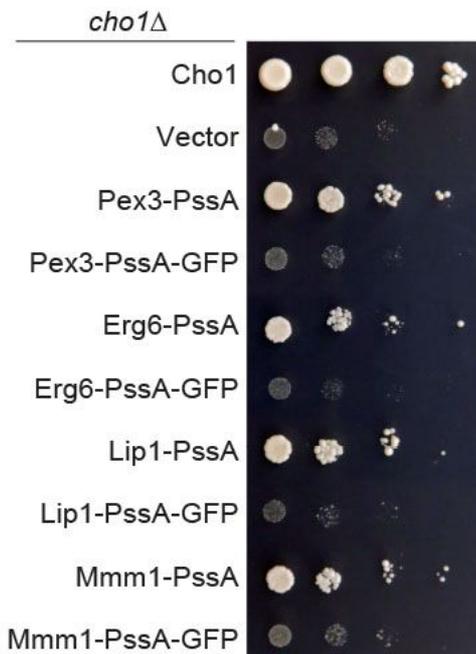


Fig. 5 GFP 融合 PssA は機能できない

同様の実験をシグナル配列と PssA の間に GFP を挿入したタンパク質でも行ったが、同様に Cho1 欠損株の増殖を回復させることはできなかった。これらの結果は PssA の N 末端もしくは C 末端に GFP を融合すると PssA が不活性化することを示唆している。これ

ら PssA タンパク質の細胞内局在の確認は、今後の PssA 抗体を用いた蛍光体法などにより検証していく予定である。

Cho1 欠損株において Lip1N-PssA や Pex3N-PssA を発現すると増殖が回復することがわかったため、これらの酵母株におけるリン脂質組成が Cho1 欠損株と比較して、どのように変化しているかを検討した。具体的にはこれらの酵母株を 32P-リン酸を加えた液体培地で培養後、細胞を破碎してミトコンドリアや小胞体を含む膜画分を回収した。これらの膜画分からリン脂質を抽出し、TLC で展開後オートラジオグラフィにより検出した。その結果、興味深いことに Lip1N-PssA を発現した酵母株では PS の量が野生型と同程度まで回復していた一方で、他の増殖が回復した Mmm1N-PssA, Pex3N-PssA, Erg6-PssA 株では PS の蓄積はほとんど見られなかった。また他のリン脂質ホスファリジルエタノールアミンなどの量もほとんど回復していなかった (Fig. 6)。

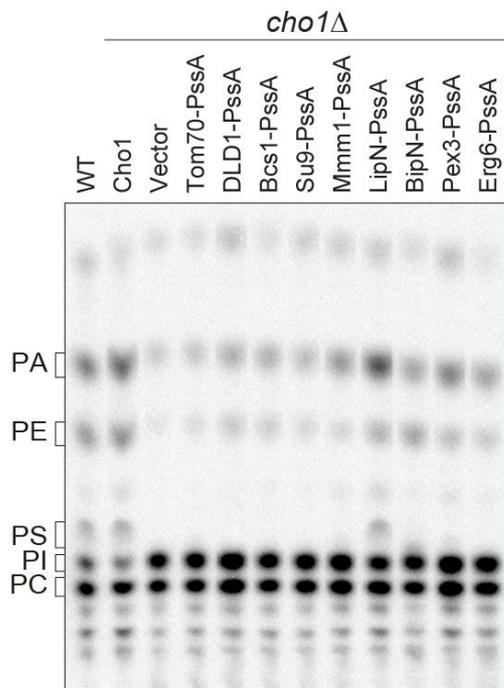


Fig. 6 PssA 発現 Cho1 欠損株のリン脂質組成

これらの結果から、これら PssA 発現株の増殖の回復は、単純に PS の量が、ミトコンドリアや小胞体回復することが、増殖にポジティブな影響を与えているわけではないことがわかった。今後、全細胞におけるリン脂質組成を調べて、膜画分以外で PS 量が増加するか、その他のリン脂質の組成にも変化があるかを検証していく。

(2) 蛍光セリンを基質として認識する人工蛍光 PS 合成酵素の探索

error-prone PCR キットを用いて、PssA 遺伝子全長にランダム変異を導入し PssA 変異体発現プラスミドライブラリーを構築した。こ

れらのライブラリーを導入し、現在蛍光セリン (NBD-セリン) を特異的に認識する PssA 変異体のスクリーニングを試みているが、現時点で目的の変異体は得られていない。そこで今回作製した細胞を用いて、細胞内リン脂質輸送を解析する実験系の構築を試みた。

(3) 様々な細胞内区画に PssA を発現させた細胞を用いたリン脂質輸送アッセイ型の開発

Cho1 欠損株の様々な細胞内区画に PssA を発現させることで、細胞内の異なる区画で PS を合成することが可能となった。PS はホスファチジルエタノールアミン (PE) の前駆体脂質であるため、PE 合成酵素が存在するミトコンドリア内膜に PS が輸送されれば PE に変換される。この PS→PE の変換をモニターすることで、様々な細胞内区画からミトコンドリアへの PS 輸送をモニターすることが出来る。32P-リン酸を加えた液体培地で培養し、定常状態のリン脂質をラベルした場合には PS はほとんど検出されなかったが、PssA 発現 Cho1 欠損株から調製した膜画分を、14C セリン存在下でインキュベートすると、PS が合成され PE さらにホスファチジルコリン (PC) に変換される様子が観察された (Fig. 7A)。

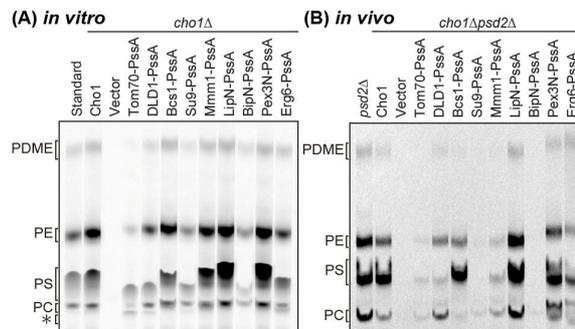


Fig. 7 (A) PssA 発現 Cho1 欠損株から単離した膜画分、もしくは (B) PssA 発現 Cho1, Pss2 欠損株を 14C-セリン存在下でインキュベートし、合成されたリン脂質を薄層クロマトグラフィで解析した。

これらの結果が、ペルオキシソームや脂肪滴からミトコンドリアへの PS 輸送経路が存在すること、さらにミトコンドリアマトリクスから膜間部側へ PS が効率よくトランスロケーションすることを示唆している。このような in vitro の実験に加え、in vivo においても PS が合成され PE, PC に変換される様子が観察できた (Fig. 7B)。Fig. 5B では、ゴルジに存在する PE 合成酵素は欠損させているため PS→PE の変換はミトコンドリアのみで起きる。このような実験系の開発は、リン脂質輸送を解析するための非常に有効なツールとなり、将来的に様々なオルガネラ間でのリン脂質輸送因子の探索や解析に応用可能な重要な研究成果であると考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

古田 詩唯奈, 小島 理恵子, 遠藤 斗志也, 田村 康, 大腸菌 PS 合成酵素 PssA を利用した細胞内リン脂質輸送経路の解析, 第 83 回日本生化学会東北支部例会, 平成 29 年 5 月 27 日, 東北大学(宮城県, 仙台市)

〔図書〕(計1件)

Tamura Y. and Endo T. (2017) Role of intra- and inter-mitochondrial membrane contact sites in yeast phospholipid biogenesis, *Organelle Contact Sites: From Molecular Mechanism to Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology* (ed Mitsuo Tagaya, Thomas Simmen), Springer. DOI: 10.1007/978-981-10-4567-7

〔産業財産権〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 康 (TAMURA, Yasushi)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号: 50631876