

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03805

研究課題名(和文) ミトコンドリアにおける新たな脂肪酸輸送・代謝機構の解明

研究課題名(英文) .

研究代表者

梅田 眞郷 (UMEDA, Masato)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：10185069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT1)は、ミトコンドリア内への長鎖脂肪酸の輸送および引き続く酸化の律速酵素として働き、エネルギー代謝制御の中心的な役割を担う。しかし、炭素鎖12までの短・中鎖脂肪酸はCPT1非依存的にミトコンドリアへ輸送されるとされるが、その輸送機構の詳細及び制御機構は明らかではない。本研究では、ショウジョウバエの遺伝子スクリーニングにより、CPT1経路を代替するミトコンドリアへの新たな脂肪酸輸送経路を見出し、その詳細な解析により短・中鎖脂肪酸のミトコンドリア内への輸送に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で新たに同定した脂肪酸輸送体は、ミトコンドリアSolute carrier (SLC)トランスポーターであるSLC25A50のショウジョウバエ相同分子であった。一方、ヒトSLC25A50の一塩基多型は肥満との相関が報告されており、同分子が哺乳動物における脂肪酸代謝にも深く関与することを示唆している。本研究で得られた知見は、従来の脂肪酸代謝経路の大幅な見直しを迫るものであり、肥満をはじめとする脂質代謝異常症の新たな視点からの理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) is indispensable to transport long-chain fatty acids into the mitochondria. CPT1 deficiency causes fatal metabolic disorders in humans and embryonic lethality in mice. We report that *Drosophila melanogaster* efficiently catabolize fatty acids in the absence of CPT1. Defective expression of CPT1 had no significant effect on the metabolic rates, body weight, or ATP concentration in *Drosophila*. Genetic screening using CPT1-suppressed flies revealed that the solute carrier 25a50 (SLC25a50), a *Drosophila* ortholog of mitochondrial carrier homolog (MTCH), acted as a surrogate for CPT1-mediated fatty acid transport. Our genetic and biochemical analyses demonstrate that SLC25a50 resides in the mitochondrial inner membrane and mediates the transport of fatty acids, notably including medium-chain fatty acid, in a mitochondrial proton gradient-dependent manner.

研究分野：生化学

キーワード：ミトコンドリア 脂肪酸 輸送体 エネルギー代謝 ショウジョウバエ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内においてトリアシルグリセロール(TAG)として貯蔵されている脂肪酸は、エネルギー産生が必要な時に動員され、ミトコンドリアにて酸化を受ける。しかし、長鎖脂肪酸から形成されるアシル CoA はそのままの形ではミトコンドリア内膜を通過することができない。このため、アシル CoA はカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT1) によりアシルカルニチンへと変換されることにより、酸化の場であるミトコンドリアマトリクスへと輸送される。CPT1 はミトコンドリア内への長鎖脂肪酸の輸送および引き続く β 酸化の律速酵素として働き、エネルギー代謝制御の中心的な役割を担う。また、同酵素の哺乳動物における欠損は胎生致死をもたらすことから、ミトコンドリアマトリクスへの長鎖脂肪酸の輸送のために必須の酵素であると考えられていた。

申請者らは、エネルギー代謝活性が亢進し低温選好性を示す *atsugari* 変異体(*Science* 323:1740, 2009)の垂株を樹立・解析する過程で、CPT1 を欠損したショウジョウバエ個体が致死性を示さず、エネルギー代謝にも全く異常を示さないことを見出した。さらに、CPT1 の完全欠損個体や組織特異的な発現抑制個体を作製・解析したところ、CPT1 欠損により個体の体重、寿命、飢餓耐性、糖代謝にも顕著な異常を示さず、ペルオキシゾーム酵素との相関も認められない事が確認された。これらの知見により、ショウジョウバエミトコンドリアに CPT1 経路を介さない新たな脂肪酸輸送・代謝経路が存在する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの分子遺伝学的手法を駆使して、CPT1 経路を代替するミトコンドリアへの新たな脂肪酸輸送経路に関わる分子を同定し、生化学的解析を通して、その細胞内局在、基質特異性、脂肪酸輸送機構、及び脂質代謝における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

CPT1 を介する脂肪酸輸送経路を代替する未知の輸送経路を明らかにする目的で、まず CPT1 を欠損した変異体の生育と脂質代謝を指標に CPT1 と遺伝学的相互作用を示す遺伝子の探索を試みた。

しかし、このスクリーニングによっては有意な遺伝子を同定するには至らなかった。その理由として、全身における CPT1 の欠損は、個体内での脂質の生合成・輸送・貯蔵・分解・排泄など多岐にわたる代謝要因に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、脂肪酸のミトコンドリア

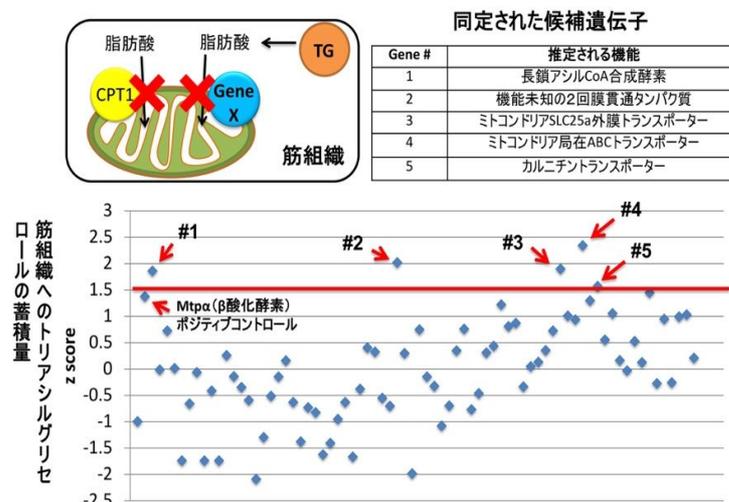


図 1. ミトコンドリアへの新規脂肪酸輸送経路を担う候補分

アへの輸送と引き続く代謝 (β 酸化) 経路を特異的に評価するために、GAL4-UAS システムを利用することにより筋組織特異的なスクリーニング系を確立した。本系は、CPT1 と評価対象遺伝子を同時に筋組織特異的に発現抑制した際の脂肪酸代謝不全とそれに伴う脂質蓄積を測定することにより、脂肪酸の代謝量を評価するものである。約 80 の候補遺伝子を評価した結果、5 つの有力な候補遺伝子を同定する事に成功した (図 1)。次に各遺伝子について解析を進めた結果、輸送基質が未知のミトコンドリア Solute Carrier (SLC) である SLC25A50 の発現抑制により最も顕著なトリアシルグリセロールの蓄積と脂肪酸組成の変化が観察されたことから、さらに詳細な生化学的解析を進めた。

4. 研究成果

1) 筋肉特異的な SLC25A50 の発現抑制により、胸部および全身における通常飼育時の TAG 含量が増加し、24 時間飢餓時の TAG の消費量が減少した。CPT1 の欠損により炭素数 16 以上の脂肪酸の代謝量が低下した一方で、ショウジョウバエに特徴的なミリスチン酸 (C14:0) などの鎖長の短い脂肪酸は CPT1 を欠損しても野生型と同様に代謝された。次に脂肪酸代謝への関与を明らかにするために、LC-MS/MS 解析によって TAG を構成する脂肪酸組成を調べた。筋肉特異的に SLC25A50 を発現抑制した個体では、TAG 含量の増加を反映して、数多くの TAG 分子種が増加しており、特に炭素数 14 の脂肪酸を含む分

子種が有意に増加していた (図 2)。これらの結果から、SLC25A50 は、CPT1 非依存的に比較的鎖長の短い脂肪酸をミトコンドリアへ輸送することが示された。

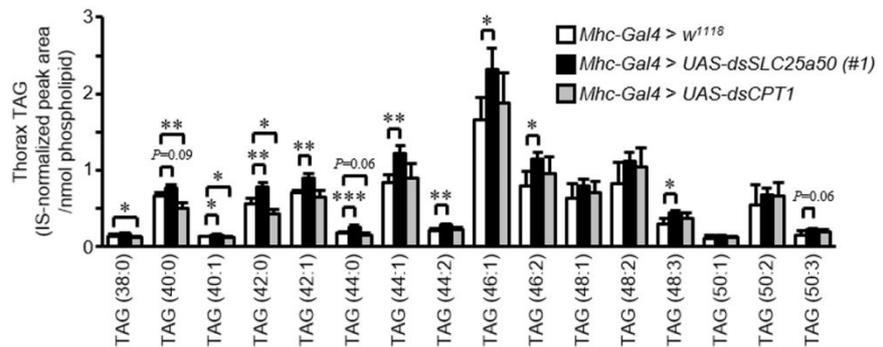


図 2. SLC25A50 発現抑制時の TAG 分子種組成

2) SLC25A50 と CPT1 をそれぞれ発現抑制したショウジョウバエ個体では飢餓耐性と寿命が延長されたが、両者の発現を同時に抑制することにより飢餓耐性と寿命は短縮した (図 3)。このことから、ショウジョウバエ個体において、SLC25A50 と CPT1 は互いに独立した脂肪酸輸送機構に関わると考えられた。

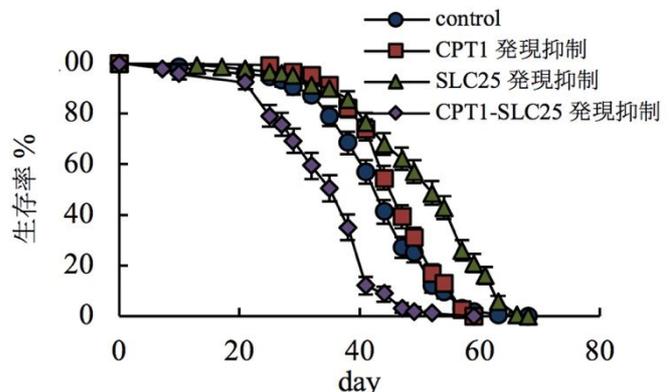


図 3. SLC25A50 及び CPT1 発現抑制時の寿命

3) 哺乳動物の SLC25A50 は、ミトコンドリア外膜に局在することが報告されているが、SLC25A50 の脂肪酸輸送における役割を明らかにするために、同分子の細胞内局在を

詳細に解析した。その結果、共焦点顕微鏡観察およびスクロース密度勾配遠心を用いたミトコンドリア外膜と内膜の分離実験により、SLC25A50 がミトコンドリア内膜に局在することが明らかになった (図4)。

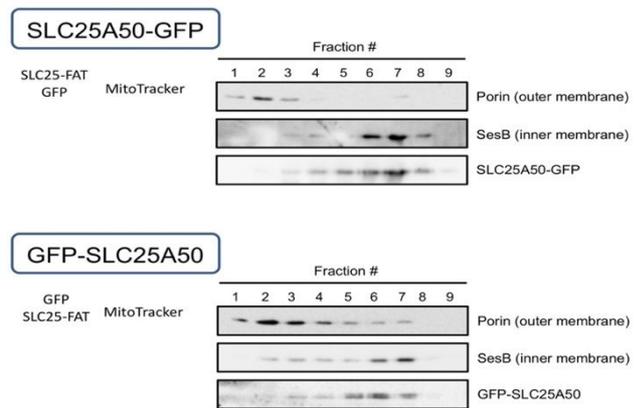


図 4. SLC25A50 のミトコンドリア内膜への局

4) 単離ミトコンドリアへの蛍光標識脂肪酸 BODIPY-C12 の取り込み量を測定することにより、脂肪酸輸送活性を評価した。その結果、SLC25A50 はアシル CoA ではなく遊離脂肪酸のミトコンドリアへの輸送に CPT1 非依存的に関わること、そしてその輸送にはミトコンドリアの膜電位が必要であることが示された (図5)。

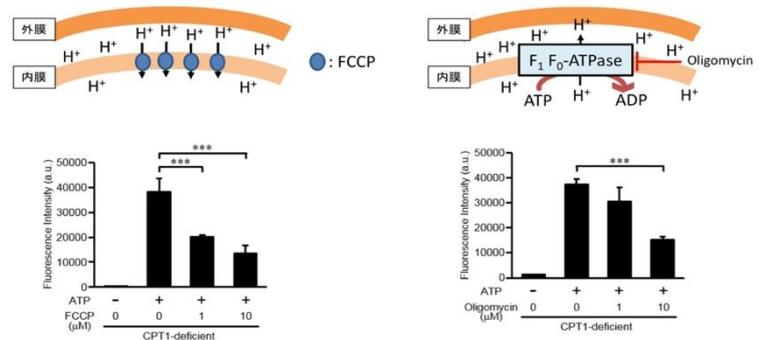


図5. SLC25A50 の膜電位依存性の脂肪酸輸

以上の知見をまとめると、ショウジョウバエには脂肪酸をミトコンドリアへ輸送する二つの経路が存在していることが示された(図6)。そして、新規の経路には SLC25A50 というタンパク質が関与していることが明らかとなった。従来から知られていた CPT1 を介する経路は炭素数 16 や 18 といった長い脂肪鎖を選択的に輸送するのに対し、SLC25A50 が関わる経路では炭素数 12-18 の幅広い分子が輸送されていることが示された。炭素数の短い分子はショウジョウバエの TAG の 40% 近くを占める分子であるため、この SLC25A50 が関与する脂肪酸輸送経路がショウジョウバエにおけるエネルギー産生における役割は大きいと考えられる。

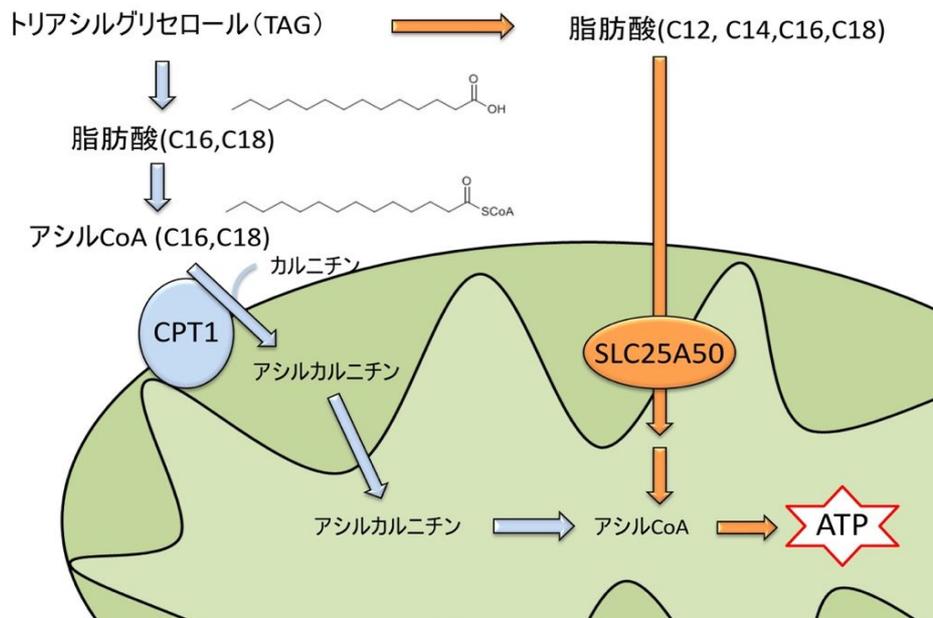


図 6. SLC25A50 を介するミトコンドリア内への脂肪酸輸送

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shiomi Akifumi, Nagao Kohjiro, Kasai Hisae, Hara Yuji, Umeda Masato	4. 巻 84
2. 論文標題 Changes in the physicochemical properties of fish cell membranes during cellular senescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 583 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1695576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsuo Naoya, Nagao Kohjiro, Suito Takuto, Juni Naoto, Kato Utako, Hara Yuji, Umeda Masato	4. 巻 60
2. 論文標題 Different mechanisms for selective transport of fatty acids using a single class of lipoprotein in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1199 ~ 1211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.M090779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagao Kohjiro, Murakami Akira, Umeda Masato	4. 巻 67
2. 論文標題 Structure and Function of 9-Fatty Acid Desaturase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 327 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-01001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchiya Masaki, Hara Yuji, Okuda Masaki, Itoh Karin, Nishioka Ryotaro, Shiomi Akifumi, Nagao Kohjiro, Mori Masayuki, Mori Yasuo, Ikenouchi Junichi, Suzuki Ryo, Tanaka Motomu, Ohwada Tomohiko, Aoki Junken, Kanagawa Motoi, Toda Tatsushi, Nagata Yosuke, Matsuda Ryoichi, Takayama Yasunori, Tominaga Makoto, Umeda Masato	4. 巻 9
2. 論文標題 Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04436-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suito Takuto, Nagao Kohjiro, Umeda Masato	4. 巻 22
2. 論文標題 ransport and Metabolism of Carotenoids in <i>Drosophila melanogaster</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Carotenoid Science	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suito Takuto, Nagao Kohjiro, Hatano Masataka, Kohashi Kenichi, Tanabe Aiko, Ozaki Hiromichi, Kawamoto Jun, Kurihara Tatsuo, Mioka Tetsuo, Tanaka Kazuma, Hara Yuji, Umeda Masato	4. 巻 164
2. 論文標題 Synthesis of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich triacylglycerols in an endemic goby, <i>Gymnogobius isaza</i> , from Lake Biwa, Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 127~140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimasaki Kentaro, Watanabe-Takahashi Miho, Umeda Masato, Funamoto Satoru, Saito Yoshiro, Noguchi Noriko, Kumagai Keigo, Hanada Kentaro, Tsukahara Fujiko, Maru Yoshiro, Shibata Norihito, Naito Mikihiko, Nishikawa Kiyotaka	4. 巻 23
2. 論文標題 Pleckstrin homology domain of p210 BCR-ABL interacts with cardiolipin to regulate its mitochondrial translocation and subsequent mitophagy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 22~34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Akira, Nagao Kohjiro, Juni Naoto, Hara Yuji, Umeda Masato	4. 巻 292
2. 論文標題 An N-terminal di-proline motif is essential for fatty acid-dependent degradation of 9-desaturase in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19976~19986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.801936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 6. 水藤拓人・長尾耕治郎・梅田真郷	4. 巻 55
2. 論文標題 ショウジョウバエを用いた体温調節行動の解析:温度受容体と共生細菌を介した制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 803 ~ 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 脂質ダイナミズムから生命現象を理解する
3. 学会等名 リポクオリティ領域会議 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 生物と温度
3. 学会等名 和敬論談会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 生体膜の分子機構
3. 学会等名 兵庫医科大学特別講演 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 昆虫から学ぶ骨格筋細胞の膜と代謝
3. 学会等名 第7回若手骨格筋研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷、村上光、長尾耕治郎
2. 発表標題 膜脂質を介する細胞内温度の制御機構
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 脂質の分子運動から生命現象を探る
3. 学会等名 生化学若い研究者の会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷、村上光、長尾耕治郎
2. 発表標題 膜脂質を介する細胞内温度制御の分子機構
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田真郷、原雄二、長尾耕治郎
2. 発表標題 脂質改変による冬眠の誘導
3. 学会等名 理化学研究所BDR人工冬眠に向けての勉強会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Umeda
2. 発表標題 Organization and deformability of insect cell membrane.
3. 学会等名 The 16th International Membrane Research Forum（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 脂質ダイナミクスの生物機能
3. 学会等名 第13回スフィンゴセラピー研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Umeda
2. 発表標題 Phospholipid flippase acts as a molecular switch for ion channel activation.
3. 学会等名 Membrane Lipid Transporter Symposium 2018-Flippases, Floppases and Scramblases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Umeda
2. 発表標題 Phospholipid flip-flop as a molecular switch for ion channel activation.
3. 学会等名 2nd Japan-Korea Lipid Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Umeda
2. 発表標題 Phospholipid flip-flop as a molecular switch for ion channel activation.
3. 学会等名 The 23rd International Symposium on Plant Lipids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 膜リン脂質のフリップフロップ・スイッチによるイオンチャネルの制御
3. 学会等名 老化過程における細胞膜のリン脂質非対称性の生理機能と病態に関するセミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 昆虫から学ぶ
3. 学会等名 新潟薬科大学薬学総合セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 昆虫から学ぶ脂質の機能と代謝
3. 学会等名 第31回カロテノイド研究談話会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masato Umeda, Akifumi Shiomi, Kohjiro Nagao
2. 発表標題 Remarkable deformability of insect cell is supported by constitutively active phospholipid scramblase.
3. 学会等名 Molecular & Cellular Biology of Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	原 雄二 (HARA Yuji) (60362456)	京都大学・工学研究科・准教授 (14301)	
連携研究者	長尾 耕治郎 (NAGAO Kohjiro) (40587325)	京都大学・工学研究科・助教 (14301)	
連携研究者	従二 直人 (JUNI Naoto) (90572199)	京都大学・工学研究科・研究員 (14301)	