

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08642

研究課題名(和文)新規リン脂質輸送タンパク質の分子機構の解明とその破綻と疾患

研究課題名(英文)Molecular mechanism of novel phospholipid transport proteins and its relationship with mitochondrial diseases

研究代表者

堀端 康博 (HORIBATA, YASUHIRO)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80392116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア膜を構成するリン脂質の主成分はホスファチジルコリン(PC)である。しかし、ミトコンドリアはPCを合成できないため、脂質合成器官である小胞体(ER)からPCを輸入している。本研究では、これまでの研究で研究代表者が見出した新規タンパク質StarD7がPCをERからミトコンドリアへ輸送する分子基盤について明らかにした。さらに、筋芽細胞において本タンパク質を欠失すると、ミトコンドリアの機能が低下し、筋管繊維への分化が顕著に抑制されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ERなどのオルガネラからミトコンドリアへのPC輸送機構は細胞生物学や脂質生化学において重要な研究課題の一つであるが、長い間解明されていなかった。今回、研究代表者が先行研究で見出したタンパク質StarD7が上記輸送機構の一端にかかわることを分子のレベルで明らかにした。ところで、ミトコンドリア病を引き起こす原因遺伝子の変異は未だ多くが不明である。本研究ではStarD7によるPC輸送機構が破綻すると、ミトコンドリアの機能低下が生じ、筋細胞の分化能が著しく阻害されミオパチーの原因になり得ることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial membranes are composed of two phospholipid bilayers. More than half of the phospholipids in mitochondrial membranes are phosphatidylcholine (PC). Mitochondria lack the enzymes required for PC synthesis. The lipid is therefore likely supplied from organelles such as the endoplasmic reticulum which contains the biosynthesis systems for PC. This study clarified the molecular basis for transporting PC to mitochondria by StarD7. This study also found that deficiency of StarD7 in myoblast caused not only impairment of mitochondrial functions but also inhibition of myogenic differentiation.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リン脂質 ミトコンドリア 筋分化

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの膜構造は、外部細胞質との区画化にだけでなく、呼吸鎖複合体の内膜への固定やATP合成のためのプロトン勾配の保持、熱産生、アポトーシスの制御など、ミトコンドリアが果たす多彩な機能においても重要な役割を果たしている。ミトコンドリアは内膜も外膜もリン脂質二重層で構成されており、総リン脂質の40-50%をホスファチジルコリン(PC)が占めている。ところが、ミトコンドリア自身はPCを合成する酵素を持たないため、小胞体(ER)等で合成されたPCがミトコンドリアに供給されていると考えられている。これまで、ER-ミトコンドリア間の脂質の輸送/移動は、両オルガネラが近接することによって形成される膜接触部位を経て行われると考えられているが、関与する因子や分子機構の全容は未だ多くが不明である。

Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) ドメインは、約210のアミノ酸で構成され、生体膜を構成するリン脂質、コレステロール、セラミドなどの脂質分子と結合し、引き抜き、輸送する活性を有する機能ドメインである。2010年、研究代表者はPCをミトコンドリアへ輸送する新規なPCキャリアタンパク質としてSTARTドメインを有するファミリーの中からStarD7を初めて見出した^[1]。本タンパク質は、N末端にミトコンドリア移行シグナル(MTS)を、C末端にPCと結合し輸送するSTARTドメインを持つタンパク質である。これまでの研究で、研究代表者は本タンパク質をマウス肝癌由来のHEPA-1細胞に過剰発現すると、外来性の蛍光標識PCをミトコンドリアへ輸送する活性が上昇することを見出した。さらに本タンパク質をノックアウト(KO)したHEPA-1細胞では、ミトコンドリアのPCが減少するだけでなく、ミトコンドリアの形態異常(クリステ形成の消失)や機能不全(呼吸鎖の活性低下やATP合成能の低下など)が生じることを見出した^[2]。以上からStarD7はミトコンドリアのPC保持だけでなく、機能の健全性に重要な分子の一つであると考えられた。

2. 研究の目的

(課題A)

上記のように、StarD7はミトコンドリアへPCを輸送する活性を有することが示唆されたが、どのようにPCをミトコンドリアへ輸送するかの分子基盤は解析されていない。これを明確にするためには、本タンパク質のミトコンドリアにおける分布、つまり外膜、内膜、膜間腔のどこに局在するのかを明らかにする必要がある。そこで課題Aでは、本タンパク質のミトコンドリアにおける膜トポロジーについて変異タンパク質を用いたプロテアーゼプロテクションアッセイ、ならびに免疫染色および金コロイド免疫電顕などの手法により明らかにし、PC輸送の分子機構を解明することを目的とした。

(課題B)

脳、骨格筋、心筋などの組織は他と比べてエネルギー需要が大きく、その多くをミトコンドリアで合成されるATPに依存している。つまり、これらの組織でミトコンドリアの機能が低下すると、強い障害を受けてミトコンドリア関連疾患のような病態が現れると考えられる。これまでの研究でStarD7はミトコンドリアにおける機能の健全性に重要であることが示唆されたが、本タンパク質の変異と疾患との関連性についてはこれまで全く解析されていない。そこで課題Bでは、本タンパク質の欠失がミトコンドリア関連疾患の原因になるか否かを細胞や個体レベルで検証することを目的とした。本研究では骨格筋におけるStarD7の重要性について培養細胞を用いて検証した。

3. 研究の方法

(課題A)

StarD7のMTSのすぐ下流には膜貫通領域(TM)と思われる疎水性の高い領域がヒトから線虫まで種を超えて保存されていることを研究代表者は見出しており、これがミトコンドリア外膜への固定に重要であると予想した。そこでTM領域を欠損した変異StarD7を細胞に発現後、ミトコンドリアを回収し、プロテアーゼによる感受性を調べ、ミトコンドリアにおける膜トポロジーを生化学的に解析した。さらにタグを付加したStarD7を細胞に発現し、タグに対する抗体を用いた免疫染色や金コロイド免疫電顕を行い、ミトコンドリアのどの画分にStarD7が局在するのかを構造学的に解析した。

(課題B)

CRISPR/Cas9の変異酵素であるDOUBLE NICKASEを用いたゲノム編集により、StarD7をKOしたマウス筋芽細胞C2C12を樹立した。細胞外フラックスアナライザーXFpとミトコンドリアストレスキットを用い、野生型細胞とKO細胞におけるミトコンドリア酸素消費を測定し、比較した。C2C12細胞あるいは初代ヒト筋芽細胞を、2%ウマ血清を含むDMEM培地で2

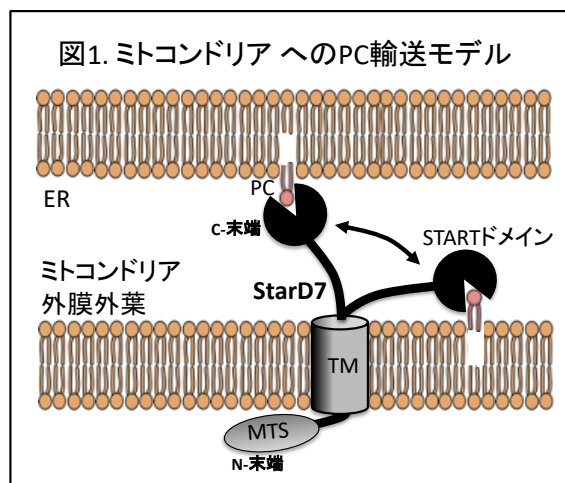
～10日間培養し、筋分化を誘導した。筋分化の評価は、分化マーカーである Myogenin やミオシン重鎖 MHC6 (Myosin Heavy Chain6) の発現量をウェスタンブロット、定量的PCR、および免疫細胞染色法で解析することで行った。さらに細胞融合の活性化因子である Myomaker や Myomerger、ミトコンドリアの合成を促進する PGC-1 α の mRNA の発現量を定量的PCRによって解析した。

4. 研究成果

(課題 A)

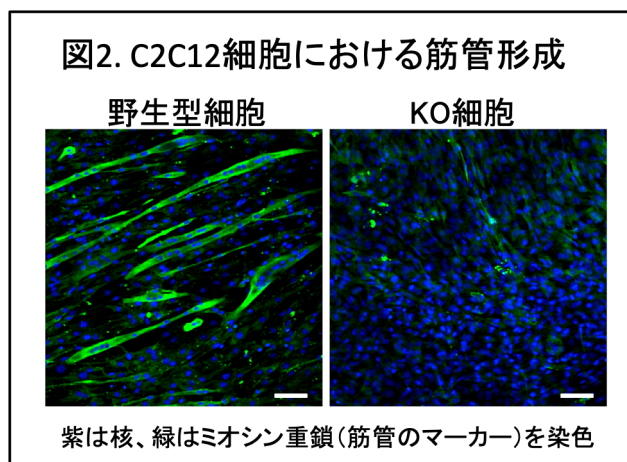
プロテアーゼプロテクションアッセイの結果、C末端の START ドメインはミトコンドリアの外膜外葉の細胞質側に局在することが生化学的な実験により明らかになった。C末端に付加したタグ抗体に対する免疫染色や金コロイド免疫電顕の結果、一部の StarD7 はミトコンドリア外膜外葉に局在していることが構造学的にも確認された。N末端側の TM 領域を欠失した変異 StarD7 はミトコンドリア内部に移行してしまうことを生化学的および構造学的実験で見出し、StarD7 は TM 領域を介してミトコンドリア外膜外葉に留まっていることが示唆された。

これらの結果から想定される StarD7 の PC 輸送機構のモデルを図1に示す。StarD7 は TM 領域でミトコンドリア外膜外葉に固定された状態になり、C末端側の PC 脂質に関わる START ドメインは細胞質側に配向している。おそらく START ドメインはミトコンドリアと ER とが接触した際、ER 膜から PC を引き抜き、ミトコンドリア外膜へ輸送していると考えられた³⁾。



(課題 B)

ゲノム編集によって StarD7 が KO された C2C12 細胞を樹立した。ミトコンドリアの酸素消費速度をフラックスアナライザーで解析した結果、KO 細胞では野生型細胞よりも OCR が顕著に低下しており、ミトコンドリアの呼吸機能が減少していることが示唆された。分化誘導培地で培養すると、野生型細胞では細胞融合が促進して多核になり、かつミオシン重鎖を発現する筋管繊維が観察される。一方、KO 細胞では細胞融合および筋管形成が著しく阻害されることが免疫蛍光染色で明らかになった(図2)。一方、KO 細胞に StarD7 を再発現すると、筋管繊維の形成が野生型細胞と同程度にまで回復した。また KO 細胞では Myogenin、MHC4、MHC6 がほとんど発現せず、Myomaker や Myomerger および PGC-1 α などのマーカーの発現も野生型細胞と比べて顕著に低下していた。



続いてヒト初代筋芽細胞の StarD7 を siRNA によって発現抑制後、筋管分化を誘導した。すると C2C12 の結果と同様に、筋管形成がコントロールと比べ顕著に阻害された。また Myogenin、MHC4、MHC6、Myomaker、Myomerger および PGC-1 α などのマーカーもコントロールと比べ顕著に抑えられた。以上から StarD7 は筋分化過程において必須の役割を有することが示唆された。

現在、StarD7 の欠失による筋分化抑制について以下のように考察している。筋分化が誘導されると、増加する ATP の需要を満たすために、解糖系からミトコンドリアへエネルギーの代謝シフトが起きることが知られている。StarD7 の欠失によってミトコンドリアの機能が低下すると、上記の代謝シフトが阻害され、その結果筋分化が阻害されると推定される⁴⁾。

ミトコンドリアミオパシーはミトコンドリア関連疾患の一つで、筋力低下や心機能の喪失などの症状を特徴とし、ミトコンドリア恒常性に必須な遺伝子の変異によって引き起こされる。近年、ミトコンドリアミオパシーの原因となる遺伝子変異についての報告数は増加しているものの、未だ多くは不明のままである。また現在、ミトコンドリアミオパシーに対する治療法はなく、対症療法で緩和するしかない。これまでのところ、StarD7 の遺伝子変異によって発症するミトコンドリアミオパシーの症例報告はまだないが、本研究は StarD7 の変異が筋分化を阻害し、ミ

オパシーの病因になりうることを培養細胞のレベルで初めて実証したものになる。現在、骨格筋特異的に本タンパク質が欠失するコンディショナル KO マウスを作製し、ミオパシー様の病態が見られるかの研究を継続中である。今後本研究を発展させることで骨格筋形成のさらなる理解やミトコンドリアミオパシーの診断と治療の開発に貢献出来ると考えられる。

<引用文献>

- [1] Horibata, Y. and Sugimoto, H. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 7358-7365
- [2] Horibata, Y. et al.(2016) *J. Biol. Chem.* 291, 24880-24891
- [3] Horibata, Y. et al.(2017) *Sci. Rep.* 7, 8793
- [4] Horibata, Y. et al.(2020) *Sci. Rep.* 10, 2845

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Horibata Yasuhiro, Ando Hiromi, Sugimoto Hiroyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Locations and contributions of the phosphotransferases EPT1 and CEPT1 to the biosynthesis of ethanolamine phospholipids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.RA120000898	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 Horibata Y, Mitsuhashi S, Shimizu H, Maejima S, Sakamoto H, Aoyama C, Ando H, Sugimoto H	4. 巻 10
2. 論文標題 The phosphatidylcholine transfer protein StarD7 is important for myogenic differentiation in mouse myoblast C2C12 cells and human primary skeletal myoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59444-y	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 Horibata Yasuhiro, Elpeleg Orly, Eran Ayelet, Hirabayashi Yoshio, Savitzki David, Tal Galit, Mandel Hanna, Sugimoto Hiroyuki	4. 巻 59
2. 論文標題 EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.P081620	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 該当する
1. 著者名 Horibata Yasuhiro, Ando Hiromi, Satou Motoyasu, Shimizu Hiroaki, Mitsuhashi Satomi, Shimizu Yasuo, Itoh Masahiko, Sugimoto Hiroyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification of the N-terminal transmembrane domain of StarD7 and its importance for mitochondrial outer membrane localization and phosphatidylcholine transfer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09205-1	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 Nakamura Yusuke, Shimizu Yasuo, Horibata Yasuhiro, Tei Rinna, Koike Ryosuke, Masawa Meitetsu, Watanabe Taiji, Shiobara Taichi, Arai Ryo, Chibana Kazuyuki, Takemasa Akihiro, Sugimoto Hiroyuki, Ishii Yoshiki	4. 巻 7
2. 論文標題 Changes of plasmalogen phospholipid levels during differentiation of induced pluripotent stem cells 409B2 to endothelial phenotype cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09980-x	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 堀端康博, 杉本博之
2. 発表標題 Kennedy経路における最終酵素EPT1とCEPT1の細胞内局在およびこれらの酵素が合成するエタノールアミンリン脂質分子種の相違
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀端康博, 杉本博之
2. 発表標題 リン脂質輸送タンパク質StarD7がミトコンドリアにおいて果たす役割
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会プレシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀端 康博、三橋 里美、清水 裕晶、青山 智英子、杉本 博之
2. 発表標題 ミトコンドリアのリン脂質恒常性に関わる輸送タンパク質STARD7は骨格筋分化に必須である
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀端 康博、三橋 里美、青山 智英子、清水 裕晶、杉本 博之
2. 発表標題 筋分化におけるホスファチジルコリン輸送タンパク質STARD7の役割の解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horibata Yasuhiro and Sugimoto Hiroyuki
2. 発表標題 Identification, characterization, and functional analysis of a novel phospholipid carrier protein to mitochondria in mammalian cells
3. 学会等名 27th FAOBMB & 44th MSBMB Conference IUBMB Special Symposia, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀端康博, Orly Elpeleg, 平林義雄, Hanna Mandel, 杉本博之
2. 発表標題 EPT1はエタノールアミンプラズマローゲンの産生と維持に主要な役割を担い、脳神経系の正常な発達を司る
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀端康博, Orly Elpeleg, 平林義雄, Hanna Mandel, 杉本博之
2. 発表標題 プラズマローゲンの保持におけるEPT1の役割とその変異による脳変性疾患
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀端康博, 安戸博美, 青山智英子, 佐藤元康, 清水泰生, 伊藤雅彦, 杉本博之
2. 発表標題 StarD7が有する膜貫通領域の同定とミトコンドリア局在およびPC輸送における役割
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀端康博, 安戸博美, 佐藤元康, 清水裕晶, 三橋里美, 清水泰生, 伊藤雅彦, 杉本博之
2. 発表標題 ホスファチジルコリン輸送タンパク質StarD7は、ミトコンドリア外膜の外葉に局在する
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会
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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
イスラエル	Rappaport School of Medicine	Hadassah-Hebrew University	Galilee Medical Center