

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15120

研究課題名(和文)リン脂質輸送因子を介したミトコンドリア機能制御

研究課題名(英文)Regulation of mitochondrial function by phospholipid transfer proteins

研究代表者

宮田 暖 (Miyata, Non)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：10529093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究を通じ、我々は、細胞内リン脂質合成とその制御機構について、(1)新規CL合成経路を発見し、これがミトコンドリアPEによって制御されていること。(2)PS脱炭酸酵素Psd1依存的なPE合成に関与する因子として、ER膜タンパク質Ice2を見出し、これがER局在型Psd1の量に影響すること。(3)ミトコンドリア外膜タンパク質Porinがミトコンドリア内PE、CL合成に重要な役割を担っており、さらにミトコンドリア内PE合成制御に関与すること。などを見出した。これらの知見は、細胞内リン脂質恒常性維持機構の全容解明に大きく貢献するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン脂質の合成とその制御は、細胞恒常性の維持に必須の過程である。リン脂質の合成には、原料となる脂質が合成された場から、目的のリン脂質が合成される場まで輸送される必要がある。これまでに、各リン脂質の合成酵素群は大方同定されてきた一方、リン脂質の細胞内輸送機構およびその制御機構については、未解明の点が多く残されており、現在細胞生物学におけるホットトピックとなっている。本研究では、ミトコンドリアにおけるリン脂質の輸送と合成、およびその制御の分子機構について、複数の新規因子を発見するなど、非常に重要な知見を数多く見出しており、当該分野の推進に大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：In the present project, we investigated the mechanisms underlying synthesis and regulation of cellular phospholipids and elucidated several new insights into them as follows: (i) A novel CL synthetic pathway was identified. The pathway was activated under low mitochondrial PE conditions. (ii) Ice2 was identified as the factor affecting the PE synthesis via a PS-decarboxylase, Psd1. Loss of Ice2 decreased the level of ER-resident form of Psd1, but not mitochondria-resident one. (iii) The novel role of mitochondrial outer membrane protein, Porin in mitochondrial phospholipid metabolism was revealed. It was further suggested that Porin was involved in the regulation of mitochondrial PE synthesis.

These findings would contribute to the understanding of homeostatic mechanism in cellular phospholipids.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 小胞体 ホスファチジルエタノールアミン カルジオリピン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは外膜、内膜二つの生体膜から形成されており、外膜、内膜、膜間腔(外膜と内膜の間の空間)、マトリクス(内膜の内側の空間)の4つの区画に分けられる。ミトコンドリア内膜で合成されるホスファチジルエタノールアミン(PE)およびカルジオリピン(CL)は、ミトコンドリア融合、クリステ構造形成、呼吸鎖複合体形成など、ミトコンドリア機能に必須のリン脂質である。PE、CLはミトコンドリア内膜においてそれぞれホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジン酸(PA)を原料として合成される。一方、PS、PAは小胞体において合成されるので、PE、CL合成のためには小胞体からミトコンドリア内膜まで輸送されなくてはならない。しかしながら、このようなリン脂質の小胞体-ミトコンドリア間およびミトコンドリア内(外膜-内膜間)輸送の分子機構には未解明な点が多い。また、ミトコンドリアにおけるリン脂質の輸送と合成が細胞内環境に応じてどのように制御されているのかは、ほとんど解析されていない。

2. 研究の目的

研究代表者は、出芽酵母において、ミトコンドリア膜間部に局在する Ups2-Mdm35 複合体が、PEの前駆体、PSのミトコンドリア内輸送因子であることを見出している。また、Ups2以外の未知のミトコンドリア内PS輸送因子の存在も示唆されていた。さらに、CLの前駆体、PAのミトコンドリア内輸送体 Ups1-Mdm35 複合体は、CL合成に大きく寄与しているが、Ups1-Mdm35非依存的な未知の経路の存在も示唆されていた。これを踏まえ、本研究では、新規ミトコンドリア内リン脂質輸送因子を同定し、その機能解析を通じてミトコンドリアリン脂質輸送・合成機構の全容解明を試みた。

3. 研究の方法

(1)小胞体膜タンパク質 Ice2 の機能解析

Ups2非依存的なPS輸送・PE合成経路を明らかにするため、Ups2およびエンドーム局在型PS脱炭酸酵素 Psd2 二重欠損酵母においてさらに欠損すると酵母がエタノールアミン要求性となる遺伝子を Synthetic genetic array (SGA) 解析によって網羅的に探索した。

(2)Ups1-Mdm35 非依存的 CL 合成経路の解析

Ups1欠損酵母では、CL合成が著減するが完全には消失しない。また、Ups1欠損酵母において、Ups2を欠損するとCL量の回復が見られることが知られている。そこで、このUps2欠損によって活性化されるUps1非依存的なCL合成経路は、ミトコンドリアPEによって抑制されているのではないかと仮説を立て、これを検証した。

(3)Mdm31、Mdm32 結合因子の探索

ミトコンドリアリン脂質代謝との関連が示唆されているミトコンドリア内膜タンパク質である Mdm31、Mdm32 の結合因子を同定することで、これら因子の機能解明を行う。

4. 研究成果

(1)小胞体膜タンパク質 Ice2 の機能解析

SGA解析の結果、Psd2との二重欠損によって酵母の生育がエタノールアミン要求性となる遺伝子として、小胞体膜タンパク質をコードする *ICE2* を同定した。Ice2欠損酵母では、Psd1によるPE合成が低下していた。また、近年、ミトコンドリア内膜にのみ局在すると考えられてきた Psd1が、小胞体膜にも局在し、PE合成を行なっていることが報告された。解析の結果、Ice2の欠損は、ミトコンドリア局在型 Psd1には影響せず、小胞体局在型 Psd1の量を低下させていた。また、小胞体局在型 Psd1は、小胞体ストレスや培地へのエタノールアミン添加によっても減少した。これらのことより、Ice2の欠損は小胞体ストレスの誘発もしくはリン脂質代謝経路の攪乱を引き起こし、小胞体局在型 Psd1の量を低下させるのではないかと考えられる。

(2)Ups1-Mdm35 非依存的 CL 合成経路の解析

Ups1欠損酵母ではCL量が減少するが、Ups1Ups2二重欠損酵母ではCL量が回復することが知られている。研究代表者は、Ups1欠損酵母において、Ups2だけでなく、Psd1およびPS合成酵素 Cho1の欠損によってもCL量が回復することを見出した。これらのことより、Ups1非依存的なCL合成経路は、PE合成の低下によって活性化されることが示唆された。また、Psd1との二重欠損が致死もしくは生育損傷となるミトコンドリア内膜タンパク質、Mdm31、Mdm32、Fmp30が、このPE合成低下時におけるUps1非依存的なCL合成経路に必須の因子であることを見出した。

(3)Mdm31、Mdm32 結合因子の探索

Ups1非依存的なCL合成経路に必須の因子であることが明らかになった Mdm31、Mdm32 の結合因子を探索した。結果、Mdm31の結合因子としてミトコンドリア外膜タンパク質 Porin を同定した。また、Porinは、Ups1、Ups2共通のコファクターである Mdm35とも結合することを見出した。さらに、出芽酵母において Porin を発現抑制すると、Ups1依存的、非依存的 CL 合成、Ups2 依存的 PE 合成が著しく抑制された。これらのことより、Porin は、Mdm31、Mdm35 との結合を介して、ミトコンドリアリン脂質合成に重要な役割を持っていることが示唆された。また、Porin の膜間

部に露出した領域への点変異により、Ups2 依存的 PE 合成が促進することを見出した。このことより、Porin は、ミトコンドリア内リン脂質合成制御においても重要な役割を担っていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakaue Haruka, Shiota Takuya, Ishizaka Naoya, Kawano Shin, Tamura Yasushi, Tan Kher Shing, Imai Kenichiro, Motono Chie, Hirokawa Takatsugu, Taki Kentaro, Miyata Non, Kuge Osamu, Lithgow Trevor, Endo Toshiya	4. 巻 73
2. 論文標題 Porin Associates with Tom22 to Regulate the Mitochondrial Protein Gate Assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1044 ~ 1055.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.01.003	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 Miyata Non, Fujii Satoru, Kuge Osamu	4. 巻 293
2. 論文標題 Porin proteins have critical functions in mitochondrial phospholipid metabolism in yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17593 ~ 17605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005410	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 Miyata Non, Goda Naoto, Matsuo Keiji, Hoketsu Takeshi, Kuge Osamu	4. 巻 7
2. 論文標題 Cooperative function of Fmp30, Mdm31, and Mdm32 in Ups1-independent cardiolipin accumulation in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16661-2	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 Miyata Non, Kuge Osamu	4. 巻 1
2. 論文標題 Fmp30, Mdm31, and Mdm32 Function in Ups1-Independent Cardiolipin Accumulation Under Low Phosphatidylethanolamine Conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Contact	6. 最初と最後の頁 1 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2515256418764043	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7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 Porinを介したミトコンドリアリン脂質合成制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 Porin proteins have critical functions in mitochondrial phospholipid homeostasis.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 Novel functions of porin proteins in mitochondrial phospholipid metabolism
3. 学会等名 1st International Mitochondria Meeting for Young Scientists（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 ミトコンドリア形成過程におけるタンパク質とリン脂質輸送機構の解明
3. 学会等名 平成30年度 日本生化学会九州支部例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 ミトコンドリアにおけるリン脂質の合成・輸送制御機構の解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 新規ミトコンドリア内リン脂質輸送因子の同定
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 ミトコンドリアタンパク質輸送阻害剤の開発
3. 学会等名 平成29年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮田 暖、久下 理	4. 発行年 2017年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 5
3. 書名 ミトコンドリア内リン脂質輸送と代謝	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----