

令和元年6月11日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19338

研究課題名(和文) 蛍光性非天然アミノリン脂質合成酵素の創出

研究課題名(英文) Creation of fluorescent unnatural aminophospholipid synthases

研究代表者

田村 康 (Yasushi, Tamura)

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大腸菌のホスファチジルセリン(PS)合成酵素PssAを改変し、本来の基質であるセリンの代わりに蛍光性基を導入したセリンを認識する酵素の創出を目指した。これまでに出芽酵母細胞のPS合成酵素Cho1の代わりに、様々なオルガネラ膜にPssAを発現する変異細胞を作製したところ、小胞体、脂肪滴、ペルオキシソーム、ミトコンドリア内膜局在型PssAがCho1の欠損を相補できることがわかった。本研究ではさらにPssAを大腸菌から大量発現、精製し、結晶化できる条件を決定すした。今後PssAのX線結晶構造から、PssAの基質認識領域を決定し、蛍光性基を導入したセリンを認識する酵素の創出を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌のPS合成酵素を真核生物に移植することで、本来不可能であった、真核生物内のPS合成の細胞内局在場所を変化させることが出来るようになった。これにより、PSが小胞体で合成される必然性が初めて検証できるようになった。また様々な細胞内区画で合成されたPSの運命(PS ホスファチジルエタノールアミンへのミトコンドリア内での変換)をモニターすることで、細胞内の脂質の流れをモニターする実験系の構築に成功した。この実験系により、細胞内の異なるおるがねら膜間をかなり効率的に脂質が移動する様子を様々なおるがねら間で調べることが出来るようになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to obtain phosphatidylserine (PS) synthase PssA mutants, which recognize NBD-serine (fluorescence-labeled serine) instead of serine. So far, we created experimental systems in which PssA is expressed in an IPTG-dependent manner in Escherichia coli cells and expressed on various organelle membranes in yeast cells. Interestingly, when PssA is expressed in the ER, lipid droplet, peroxisome or mitochondrial inner membrane, growth defects of cho1-deleted cells were rescued. These results are important for investigating intracellular phospholipid transport pathways. We are now using these yeast cells for genetic screening. In addition to the genetic method, we tool an advantage of structural analysis. If we were able to determine the recognition site of PssA for the substrate serine, we could obtain mutants that recognize NBD-serine by introducing mutations to the sites.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リン脂質 オルガネラ リン脂質輸送

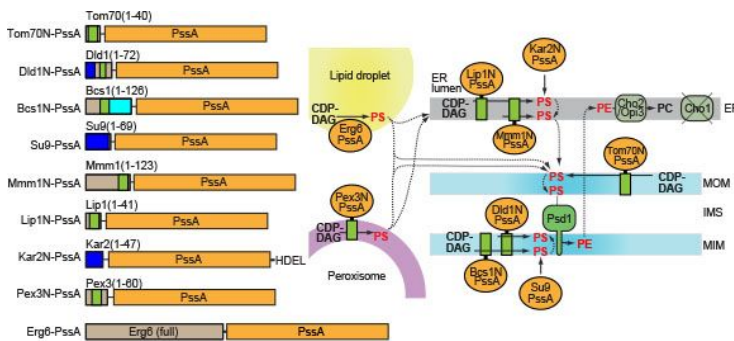
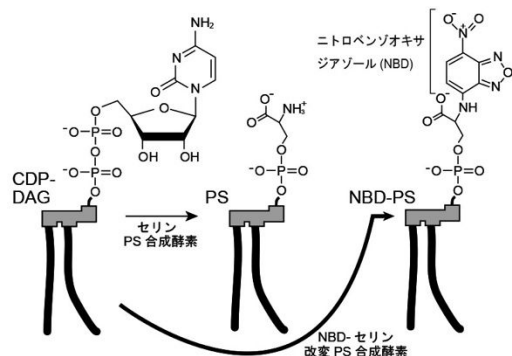
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞にとって脂質は欠かすことのできない重要な分子である。具体的には、脂質膜は生命活動する根源である細胞の階層構造(オルガネラ)を形成したり、全タンパク質の約 1/4 を占める膜タンパク質の機能化に必要な役割を果たしている。しかしながら脂質研究は、タンパク質研究に比べて未開拓の分野であり、その生合成機構について未だ不明な点が多い。例えば、細胞内での適切なリン脂質輸送は、各生体膜の脂質組成維持に必須であるが、その輸送メカニズムはほとんどわかっていない。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、これらのプローブは脂質結合ドメインを融合した蛍光タンパク質であるため、脂質分子に比べ非常に大きく、脂質の流動性を阻害してしまうため、細胞内脂質輸送をモニターする目的には使用不可能である。すなわち、リン脂質輸送を細胞内でモニターするためには、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必須である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞内リン脂質輸送メカニズムの新規解析手法として、蛍光性非天然アミノリン脂質合成酵素の創成を目指した。具体的には、ホスファチジルセリン(PS)合成酵素に着目した。PS合成酵素は、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)とセリンから PS を合成する酵素である。もしこの PS 酵素が、通常のセリンではなく、蛍光ラベルしたセリンを基質として特異的に認識するように改変できれば、細胞内の特定の区画で、蛍光リン脂質を合成することが可能となる(図1)。すなわち特定の細胞内区画で合成された蛍光リン脂質の運命を追跡することで、リン脂質の細胞内輸送をモニターできるようになるはずである。このような蛍光性非天然人工リン脂質を合成する酵素を創生することにより、細胞内のリン脂質輸送経路を解析する手法を確立することが本研究の目的である。



作成を行い、NBD-serine を基質として認識できる PssA 変異体を、脂質抽出画分の蛍光シグナルを指標にスクリーニングを試みた。(2) もう一つの方法として、PssA を出芽酵母細胞の様々な区画に発現させ、酵母の PS 合成酵素 Cho1 の欠損を最も効率よく相補できる PssA 変異体の構築を行った。この細胞ランダム変異を導入した PssA を発現させ、NBD-serine を細胞内に蓄積する酵母細胞を、FACS ソーティングにより濃縮することを試みた。

(3) 最後の方法として、PssA の結晶構造解明を目指した。ランダム変異によるスクリーニングでは変異体の単離が難しかったため、PssA の基質認識部位を構造の観点から明らかにすることで、変異箇所を絞り込みを目指した。

4. 研究成果

大腸菌を用いた方法では、脂質抽出のステップを介することでスクリーニングを行うことが難しかったため、出芽酵母を用いた実験に切り替えることとした。具体的にはまず、出芽酵母の様々なオルガネラ膜へ局在化する PssA のコンストラクトをおこなった(図2)。これらのオルガネラ局在型 PssA を、PS 合成酵素 Cho1 を欠損した酵母株(cho1Δ)に発現させ、Cho1 欠損による増殖阻害を回復させることが出来るか確認した(図3)。その結果、興味深いことに、小胞体膜、ペルオキシソーム膜、脂肪滴、ミトコンドリア内膜(マトリクス側)に PssA を発現したときに

3. 研究の方法

真核生物の PS 合成酵素は、小胞体に局在する複数回膜貫通型タンパク質であるため、機能改変できたとしても細胞内の異なる膜上に局在化させることが困難である。そこで本研究では、(1) 可溶性タンパク質である大腸菌の PS 合成酵素 PssA の機能改変を試みた。具体的には、大腸菌内でランダム変異を導入した PssA を IPTG で発現誘導する大腸菌株の

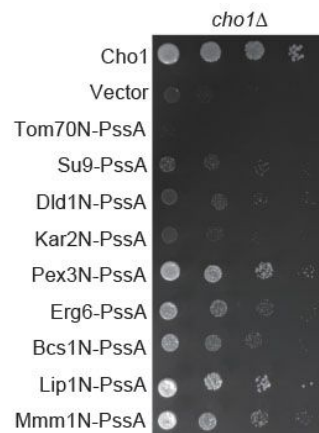


図3 PssA 発現 cho1Δ株の増殖

Cho1 の欠損を部分的に相補できることがわかった (図 3)。一方、ミトコンドリア外膜やミトコンドリア内膜の膜間部側に PssA を発現した場合や、小胞体内腔やミトコンドリアマトリクスに膜貫通ドメインを持たない PssA を発現した場合は、Cho1 の欠損を相補できなかった (図 3)。この結果により、PssA の発現量の違いによって増殖の回復が異なる可能性が考えられたため、オルガネラ局在型 PssA の発現量を、PssA に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、すべてのオルガネラ局在型 PssA が同程度発現していることを確認した (図 4A)。

さらに、*cho1Δ* 細胞の増殖を回復させる Lip1N-PssA, Pex3N-PssA の PssA の活性中心に変異を導入し、酵素活性をなくすと酵素の発現量は変わらないが、*cho1Δ* 株の増殖を回復できなくなることを確認した (図 4B, C)。これらの結果から、PssA が効率的に機能するためには膜への結合が重要であることが示唆された。次に *cho1Δ* 株の増殖阻害が、PssA 実際に PS 合成に寄与しているかを検討した。具体的にはオルガネラ局在型 PssA を発現した *cho1Δ* 欠損株を 32P-リン酸存在下で培養し、リン脂質をラベルした細胞からトータルリン脂質を抽出、TLC で展開後、オートラジオグラフィを行った。その結果、*cho1Δ* 株や、増殖が回復しない PssA 変異体発現細胞ではほとんど PS が検出されない一方で、増殖が回復した PssA 変異体発現株では、確かに野生型同程度の PS が蓄積していた (図 5A)。次に細胞内の様々な区画で PssA によって合成された PS がミトコンドリアへと移動するか、すなわち PS がミトコンドリア内膜に存在する PS 脱炭酸酵素 Psd1 (図 2) により PE へと変換されるかを検討した。具体的には、Cho1 に加えて、出芽酵母に存在する PS 脱炭酸酵素の内ゴルジ体に局在する Psd2 と、Kennedy pathway (CDP エタノールアミンとジアシルグリセロールから PE を合成する経路) で PE 合成に関与する Dp11 を欠損させた酵母株 (*cho1Δpsd2Δdp11Δ*) に PssA 変異体を発現させ、PssA を介して新規に合成される PS を 14C-セリンを含む培地で培養することでラベルした。細胞からトータルリン脂質を抽出し、TLC で展開後、オートラジオグラフィにより、PS → PE の変換が行われているかを確認した。その結果、増殖が回復した、小胞体、ペルオキシソーム、脂肪滴、ミトコンドリア内膜に PssA を発現させた場合、PS が PE さらに PE がメチル化して合成される PC が検出された (図 5B)。これらの結果は、小胞体、ペルオキシソーム、脂肪滴の脂質がミトコンドリアへと輸送されることを示している。またミトコンドリアマトリクス側で合成された脂質も、効率的にミトコンドリア膜間部側へとフロップすることがわかった。

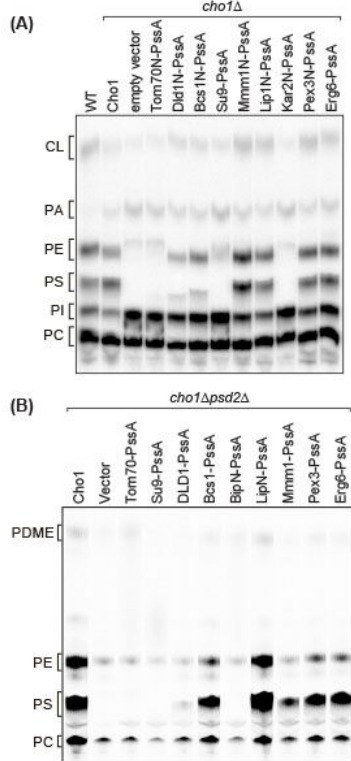


図 5 オルガネラ局在型 PssA の PS 合成

酵素の設計に威力を発揮すると考えられる。現在、PssA の微結晶得るところまで進んでいるので (図 6)、今後結晶化条件の最適化を行い、構造の解明も行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

原著論文 (Original articles)

1. Sakaue H., Shiota T., Ishizaka N., Kawano S., Tamura Y., Tan KS., Imai K., Motono C., Hirokawa T., Taki K., Miyata N., Kuge O., Lithgow T., and Endo T.* (2019) Porin Associates with Tom22 to Regulate the Mitochondrial Protein Gate Assembly Mol. Cell, 73, 1044–1055
2. Sawasato K., Sato R., Nishikawa H., Iimura N., Kamemoto Y., Fujikawa K., Yamaguchi T., Kuruma Y., Tamura Y., Endo T., Ueda T., Shimamoto K. and Nishiyama K.* (2019) CdsA is involved in biosynthesis of glycolipozyme MPIase essential for membrane protein integration in vivo. Sci. Rep., 9, Article number: 1372
3. Ueda E., Tamura Y., Sakaue H., Kawano S., Kakuta C., Matsumoto S., and Endo T.* (2019) Myristoyl group-aided protein import into the mitochondrial intermembrane space. Sci. Rep., 9, Article number: 1185.
4. Kojima R., Kakimoto Y., Furuta S., Itoh K., Sesaki H., Endo T., and Tamura Y.* (2019) Maintenance

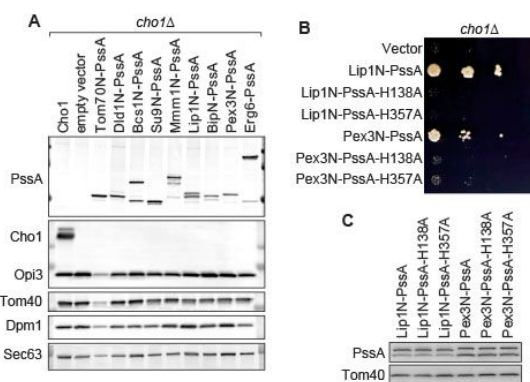


図 4 オルガネラ局在型 PssA の発現量と PssA 活性変異体発現株の増殖

さらに本研究では、PssA の結晶構造解明を目指し、PssA の結晶化にも取り組んだ。PssA の結晶構造から基質結合様式が理解できれば、人工

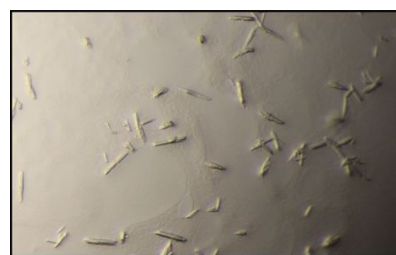


図 6 PssA の微結晶画像

of Cardiolipin and Crista Structure Requires Cooperative Functions of Mitochondrial Dynamics and Phospholipid Transport. *Cell Rep.*, 26, 518–528.

5. Tashiro, S. Caaveiro, J. Nakakido, M. Tanabe, A. Nagatoishi, S. Tamura, Y. Matsuda, N. Liu, D. Hoang, Q. and Tsumoto, K. (2018). Discovery and Optimization of Inhibitors of the Parkinson's Disease Associated Protein DJ-1. *ACS. Chem. Biol.*, 13(9):2783-2793. doi: 10.1021/acscchembio.8b00701.
6. Kakimoto, Y. Tashiro, S. Kojima, R. Morozumi, Y. Endo, T. & Tamura, Y. * (2018) Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Sci. Rep.*, 8, Article number: 6175. doi:10.1038/s41598-018-24466-0

[雑誌論文](計5件)

1. Tamura Y.,* Kojima R., Endo T. (2019) Advanced In Vitro Assay System to Measure Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Transport at ER/Mitochondria Interface. In: Drin G. (eds) *Intracellular Lipid Transport. Methods in Molecular Biology*, vol 1949. Humana Press, New York, NY
2. Tamura Y.* Kawano S. and Endo T. (2018) Organelle contact zones as sites for lipid transfer, *Journal of Biochemistry*, 165(2), 115–123 (DOI: 10.1093/jb/mvy088).
3. Endo T. and Tamura Y. Kawano S. (2018) Phospholipid transfer by ERMES components. *Aging*. 10, 139-201 (DOI: 10.18632/aging.101434).
4. Endo T. and Tamura Y. (2018) News and Views; Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J.* e98993 (DOI 10.15252/embj.201898993).
5. 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

[学会発表](計31件)

口頭発表(招待講演)

1. 田村康 脂質輸送におけるオルガネラ間コンタクトサイトの役割 第21回植物オルガネラワークショップ 2019.3.12 名古屋大学
2. 田村康 ミトコンドリア・小胞体間コンタクトサイトの数を制御するメカニズム 第18回日本ミトコンドリア学会年会 2018.12.8 久留米大学
3. 田村康 Maintenance of Cardiolipin and Crista Structure Requires Cooperative Functions of Mitochondrial Dynamics and Phospholipid Transport Osakamito2018 2018.12.4 大阪大学
4. 田村康 ミトコンドリア・小胞体コンタクトサイトの数を制御するメカニズム 2018年 第91回日本生化学会大会 2018.9.29 国立京都国際会館
5. 田村康 Split-GFPを用いたオルガネラコンタクトサイトの可視化と解析 第27回日本バイオイメーキング学会学術集会 2018.9.4 産業技術総合研究所
6. 田村康 ミトコンドリア・小胞体コンタクトサイトの数を制御するメカニズム 2018年 生理学研究所研究会 オルガネラ膜ナドドメインの機能と動態 2018.7.5 生理学研究所
7. Yasushi Tamura Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP probes, 1st International Mitochondrial Meeting for Young Scientists. 2018.4.21 COOP INN Kyoto
8. 田村康 オルガネラ間リン脂質輸送反応の再構成実験系 大阪大学蛋白質研究所セミナー・再構成アプローチが開拓する生体膜・膜タンパク質研究の最前線 2018.3.27 大阪大学蛋白質研究所1階講堂
9. 田村康 出芽酵母におけるミトコンドリア・小胞体連携ゾーンの役割 ConBio2017 1AW18 細胞機能を司るオルガネラ・ゾーンの解読 2017.12.6 神戸国際会議場 5階 502会議室
10. 田村康 Structural and Mechanistic Insights into Phospholipid Transfer via Mitochondria Smasys 2017 (5th International Conference on Smart Systems Engineering 2017) 2017.10.5, 山形大学米沢キャンパス 11号館 未来ホール

ポスター発表

11. 田代晋也・名黒功・遠藤斗志也・田村康 哺乳類ミトコンドリア-ER膜間コンタクト形成に関与する因子の探索 2019.1.24~25 新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」平成30年度若手の会
12. 柿元百合子, 小島理恵子, 新名真夏, 遠藤斗志也, 田村康 ミトコンドリア・小胞体間コンタクトサイトの数を制御する分子メカニズムの解明 2019.1.24~25 新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」平成30年度若手の会
13. 新名真夏, 柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康 核膜・液胞間連携ゾーン(NVJ)の機能の解析 2019.1.24~25 新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」平成30年度若手の会
14. Shunsuke Matsumoto, Chika Kakuta, Kunio Nakatsukasa, Yasushi Tamura, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo Two AAA-ATPases-mediated degradation pathways of mislocalized tail-anchored proteins on

- the outer mitochondrial membrane 2018.11.28 分子生物学会
15. 柿元 百合子, 小島 理恵子, 新名 真夏, 遠藤 斗志也, 田村 康 新規オルガネラ間結合因子の同定と生理機能の解析 2018. 11.16-17 第13回小胞体ストレス研究会
 16. 田代 晋也, 遠藤 斗志也, 田村 康 遺伝学的スクリーニングに向けた哺乳類細胞内ミトコンドリア-ER 膜間コンタクト検出系の構築 2018. 9.24-26 第91回日本生化学会大会
 17. 木村 啓介, 小島 理恵子, 遠藤 斗志也, 田村 康 ミトコンドリア型 CDP-DAG 合成酵素 Tam41 の結晶化 2018. 9.24-26 第91回日本生化学会大会
 18. 柿元 百合子, 田代 晋也, 小島 理恵子, 遠藤 斗志也, 田村 康 Split-GFP を用いた新規オルガネラ間近接評価実験系の確立 2018. 9.24-26 第91回日本生化学会大会
 19. 阪上 春花, 塩田 拓也, 石坂 直也, 田村 康, 遠藤 斗志也 ミトコンドリアポリンタンパク質 Por1 による外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリー制御 2018. 9.24-26 第91回日本生化学会大会
 20. 工藤 真之祐, 古田 詩唯奈, 遠藤 斗志也, 田村 康 リン脂質代謝における Pah1 の機能解析 2018. 9.24-26 第91回日本生化学会大会
 21. 新名 真夏, 柿元 百合子, 遠藤 斗志也, 田村 康 Split-GFP を用いた NVJ 連携ゾーンの機能の解析 2018. 9.24-26 第91回日本生化学会大会
 22. 木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康ミトコンドリア型 CDP-DAG 合成酵素 Tam41 の結晶化 2018年6月28日 第18回日本蛋白質科学会年会
 23. 柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康 Split GFP を用いたオルガネラ膜間近接評価実験系の確立 第69回日本細胞生物学会 2017.6.14, 仙台国際センター
 24. Yuriko Kakimoto, Shinya Tashiro, Rieko Kojima, Toshiya Endo, Yasushi Tamura Visualizing multiple inter-organelle contact sites using split-GFP system 2018.6.5~8 Tokyo 2018 Cell and Developmental Biology Meeting (細胞生物学会)
 25. 松本俊介, 中務邦雄, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜へのミスターゲットした膜タンパク質の分解機構の解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド
 26. 小島理恵子, 伊藤喜重, 瀬崎博美, 遠藤斗志也, 田村康 1P-0332: カルジオリピン量の維持には正常なクリステ構造が必要である 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド
 27. 古田詩唯奈, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康 1P-0335: 小胞体膜タンパク質 Ilm1 の欠損はリン脂質輸送とスフィンゴ脂質異常を引き起こす 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド
 28. 帯田孝之, 三輪康平, 小島理恵子, 大熊芳明, 田村康, 水口峰之 2P-0076: 基本転写因子 TFIIIE の構造生物学的研究 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド
 29. 阪上春香, 石坂直也, 塩田拓也, 田村康, 遠藤斗志也 2P-0271: ミトコンドリアポリンタンパク質 Por1 は外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリー調節因子として機能する 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド
 30. 柿本百合子, 遠藤斗志也, 田村康 3P-0287 (4P2T19-02): Split-GFP を用いたオルガネラ膜間テザリング因子の探索 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド
 31. 沢里 克宏, 佐藤 諒, 西川 華子, 飯村 直樹, 藤川 鉦樹, 山口 敏幸, 車 ゆうてつ, 田村 康, 遠藤 斗志也, 上田 卓也, 島本 啓子, 西山 賢一 3P-1421 (4AT26-09): タンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質酵素 MPase は生育に必須である 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド

〔図書〕(計2件)

1. 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也 (2018) ミトコンドリアと小胞体間のオルガネラコンタクト, 生体の科学 第69巻 第6号 2018年 特集: 細胞高次機能をつかさどるオルガネラコミュニケーション
2. 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也 (2018) ミトコンドリアと小胞体のクロストーク, 月刊「細胞」 2018年7月号 オルガネラのバイオロジー 最前線 The leading edge of organelle biology

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年:
 国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.tamuralab.com/>

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。