

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15004

研究課題名(和文) 脂肪滴を介したミトコンドリアの品質管理メカニズム

研究課題名(英文) The mechanism of cellular quality control mediated by lipid droplet

研究代表者

折井 みなみ (Orii, Minami)

昭和大学・医学部・ポスドクター

研究者番号：60792645

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)：脂肪滴は多くの真核生物に保存された必須の細胞内小器官の一つである。出芽酵母細胞では増殖停止期に脂肪滴の形成が増加し、それらは細胞内の分解工場である液胞の周囲に並んだ後、液胞膜が内側に陥入するようにして液胞内に取り込まれる。この現象をリポファジーという。我々は、この増殖停止期の脂肪滴に細胞中の特定のタンパク質が搭載され、脂肪滴ごと液胞に取り込まれ分解されることが細胞内恒常性の維持に重要であることを見出した。またその特定のタンパク質の搭載に必要な脂肪滴上の膜タンパク質X、Xと結合する液胞膜上のYを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖停止期にある出芽酵母細胞は中枢神経細胞など哺乳類の非分裂分化細胞のモデルと考えることができる。脂肪滴が細胞内に蓄積することは脂質代謝異常に密接に関連していることはよく知られているが、異常タンパク質の分解との関連を示す論文はほとんどない。リポファジーは酵母だけでなく哺乳類においても確認されており、関与する遺伝子も酵母から哺乳類まで保存されていると予想される。この研究により脂肪滴を介したタンパク質分解メカニズムが解明されれば、アミロイド や α -シヌクレインの蓄積が原因となるアルツハイマー病やパーキンソン病、心筋細胞のDanon病などの病態解明だけでなく、予防や治療にもつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lipid droplets (LDs) are independent organelle found in most eukaryotic cell types. When budding yeast cells enter stationary phase, LDs formation is increased and transition from the perinuclear ER to the membrane of the vacuole. After that, lipophagy occurs through the expansion of raft-like vacuolar membrane domains. We found that the degradation of some proteins mediated by stationary phase lipophagy is required for cellular quality control. LD protein X and vacuolar membrane protein Y are identified as a key factor of lipophagy.

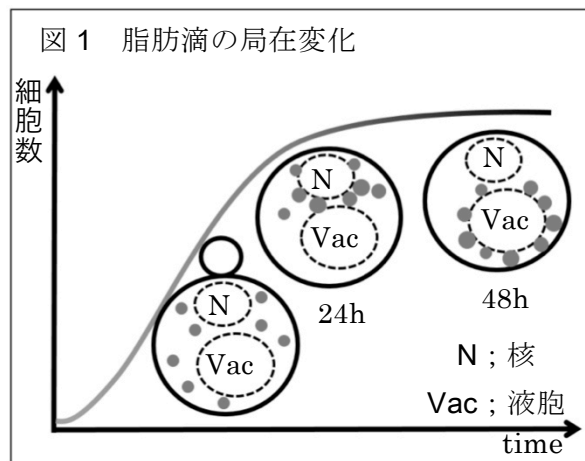
研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪滴

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は過剰な栄養を細胞内に蓄積し、飢餓状態にさらされた際にはそれを栄養源としてエネルギーを産生する。脂肪滴はそのエネルギー貯蓄場所であり、多くの真核生物に保存されたオルガネラの一つである。脂肪滴のコアはトリアシルグリセロールとステロールエステルからなり、その表層はリン脂質一重層で覆われている。近年では栄養源として分解されるだけでなく、その脂質一重層を足場とするタンパク質の分解にも関与していることが分かってきた。



出芽酵母細胞は対数増殖期には細胞膜付近の小胞体から脂肪滴を産生しており、脂肪滴は細胞全体に局在している。同じ培養液のまま培養し続けると、培地中のグルコースが枯渇し飢餓状態となり細胞は増殖停止期に突入する。次第に細胞内で多数の大きい脂肪滴が核周囲小胞体から産生されるようになり、培養開始24時間後には脂肪滴が核周囲に局在するようになる。48時間後には液胞周囲に並ぶように配列し、72時間後には液胞内に取り込まれ分解(=リポファジー)される(図1)。分解された脂質はリサイクルされ、脂肪酸としてエネルギー源になる。この際、脂肪滴表面のタンパク質も一緒に分解されるが、この脂肪滴表面に存在するタンパク質は脂肪滴の形成時期に合わせて特異的に変化する。たとえば、増殖停止期の脂肪滴表面にはDga1やTgl1、Faa1など脂質代謝に関連する因子が局在していることが報告されている(Currie E, et al, J. Lipid Res. 2014)。一方で、静止期出芽酵母ではプロテアソーム分解系が低下するという事実(Bajorek et al., Curr Biol, 2003)、さらには乳類細胞の脂肪滴がタンパク質分解の場として機能するという我々自身の結果(Ohsaki et al., Mol Biol Cell, 2006など)や、近年では細胞質封入体のクリアランスにも脂肪滴が必須であることが報告されている(Moldavski O, et al, Dev Cel. 2015)。以上より我々は『増殖停止期の出芽酵母細胞では不要タンパク質が脂肪滴に搭載され液胞内で分解される』と予想した。

リポファジーは、隔離膜によって包み込まれるマクロオートファジーではなく、脂肪滴が直接液胞膜の陥入によって取り込まれるマイクロオートファジーによって起こる。我々は凍結切断レプリカ電顕法による観察から、増殖停止期の液胞膜には蜂の巣状のラフトドメインが形成されること、このラフトドメインが脂肪滴と密接して陥入し、風船が膨らむようにして液胞内部に脂肪滴を取り込むことを見出した(Tsuji, Orii, et al., eLife, 2017)(図2)。このときの脂肪滴と液胞膜は密着していることから、何らかのタンパク質間相互作用があることが予想された。しかしこのマイクロリポファジーにおける詳細なメカニズムは未だ不明である。

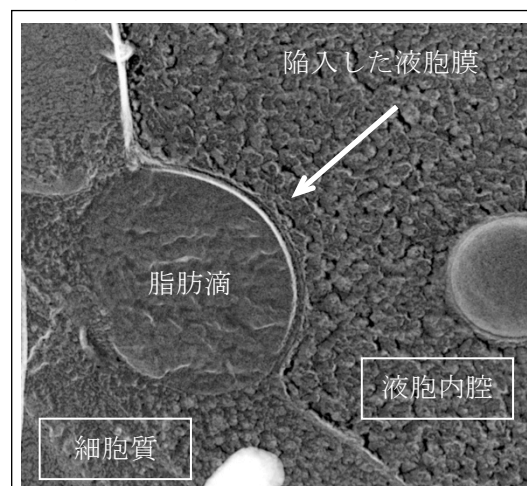


図2 リポファジー

2. 研究の目的

本研究の目的は『増殖停止期の出芽酵母細胞では不要タンパク質が脂肪滴に搭載され液胞内で分解される』との仮定のもと、増殖停止期に脂肪滴に搭載され液胞内で分解されるタンパク質を探索し、脂肪滴への搭載機構と脂肪滴-液胞膜の接着の分子機構、そして増殖停止期リポファジーの生理的意義を解明することである。

3. 研究の方法

増殖停止期の出芽酵母細胞を用いて、この時期の脂肪滴をターゲットとし脂肪滴画分からの脂肪滴膜タンパク質の可溶化、それを用いたMS解析とウェスタンブロット法を用いたタンパク質発現解析を行う。ここから得られた候補となる脂肪滴タンパク質と液胞膜タンパク質の結合を免疫沈降法により検討する。

4. 研究成果

既知の脂肪滴タンパク質欠損株の解析から、増殖停止期に特異的に脂肪滴局在が増加するタンパク質 X を見出した。X はユビキチン鎖結合ドメインをもち、実際に増殖停止期の脂肪滴にはユビキチン化タンパク質が搭載されていることを明らかにした。さらにこの時期の脂肪滴上タンパク質を網羅的に解析したところ、増殖停止期特異的に特定のタンパク質群が搭載されていることが分かった。このタンパク質群は X のノックアウト細胞では脂肪滴上に搭載されずリポファジーも起こらなくなることから、X がリポファジーに必須の因子であった。

かつ液胞膜上で X と結合する液胞膜タンパク質 Y の同定に成功した (図 3)。Y のノックアウト細胞においてもリポファジーは起こらなくなることから、X-Y のタンパク質間相互作用が時期特異的リポファジーの中枢を担うことが分かった。増殖停止期の出芽酵母細胞ではプロテアソーム活性が減弱することから、この時期に見られるリポファジーはプロテアソーム代償性に脂肪滴に結合するこのタンパク質群を分解することが目的ではないかと推測される。とくに増殖停止期特異的に搭載される特定のタンパク質群は細胞内毒性が強いと考えられるため、これらを分解することにより細胞内恒常性を保っていると考えられる。

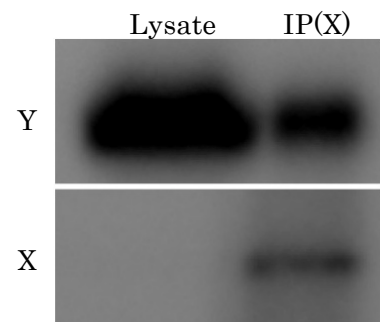


図 3 X と Y の結合

増殖停止期にある出芽酵母細胞は中枢神経細胞など哺乳類の非分裂分化細胞のモデルと考えることができる。脂肪滴が細胞内に蓄積することは、肥満や脂肪肝など脂質代謝異常に密接に関与していることはよく知られているが、異常タンパク質の分解との関連を示す論文はほとんどない。リポファジーは酵母だけでなく哺乳類においても確認されており、関与する遺伝子も酵母から哺乳類まで保存されていると予想される。この研究により脂肪滴を介したタンパク質分解メカニズムが解明されれば、アミロイド B やタウタンパク質の蓄積が原因となるアルツハイマー病や、 α -シヌクレインの蓄積が原因となるパーキンソン病、心筋細胞の Danon 病などの病態解明への新たな道筋が開けるだけでなく、予防や治療にもつながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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