

平成 22年 5月 12日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770091

研究課題名 (和文) リン脂質をミトコンドリアへ供給する新規輸送分子の機能解明

研究課題名 (英文) Study on a novel lipid transfer protein that mediates the intracellular trafficking of phospholipid to mitochondria

研究代表者

堀端 康博 (HORIBATA YASUHIRO)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80392116

研究成果の概要 (和文)：ホスファチジルコリン (PC) はミトコンドリア膜の主要な構成成分であるが、ミトコンドリア自身はPCを合成できない。そのため、小胞体やゴルジ体などで合成されたPCがミトコンドリアへ供給される細胞内輸送機構が存在すると考えられるが、分子レベルでの解明は行われていなかった。本研究では、ミトコンドリアへPCを輸送する活性を有する新規タンパク質 StarD7 を見いだし、リン脂質の細胞内輸送の新局面を展開した。

研究成果の概要 (英文)：Phosphatidylcholine (PC) is the major constituent of both mitochondrial inner and outer membranes. Because mitochondria do not contain the sequential enzymes needed for PC production, they must import it from the site of biosynthesis such as the endoplasmic reticulum and Golgi complex. Up to date, the specific molecules responsible for the transport of PC to mitochondria have not been well characterized. In the present study, a novel lipid transfer protein involved in the intracellular trafficking of PC to mitochondria is identified and characterized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：脂質生化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：リン脂質、ホスファチジルコリン、StarD、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

細胞膜やオルガネラ膜は、リン脂質を最小単位とする脂質二重膜で構成されている。ところが、多くのオルガネラは、その構成に必要であるリン脂質を生合成することができず、リン脂質合成器官である小胞体やゴルジ

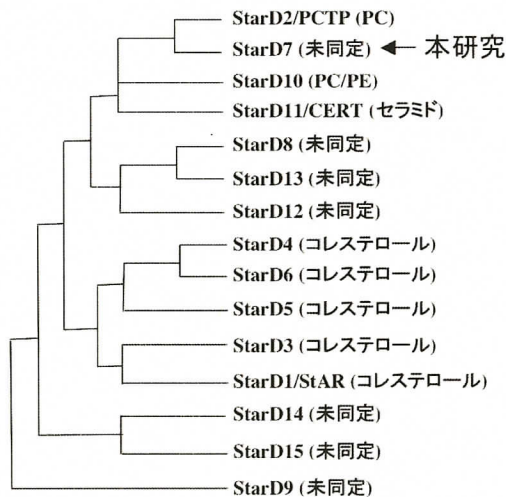
体からの供給に依存している。ミトコンドリアにおいても、自身の主要なリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) を合成することはできない。そのため、小胞体やゴルジ体などで合成されたPCがミトコンドリアへ運ばれる細胞内輸送機構が存在すると考えられ

ている。これまでの知見では、ミトコンドリアへのリン脂質の供給は、小胞体やゴルジ体とミトコンドリアとの直接的かつ局所的な膜同士の接触により行われると考えられてきたが、詳しい分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain (StarD)は、約 210 のアミノ酸で構成され、生体膜のコレステロール、リン脂質、セラミドなどを特異的に認識して結合し、これらの脂質を生体膜から引き抜いて輸送する活性を有するタンパク質モジュールである。ヒト・データベース上にはこの StarD ドメインを有するタンパク質が 15 種類 (StarD1-StarD15) 見いだされている (図 1)。その中の一つである StarD7 は機能不明のタンパク質であったが、申請者による遺伝子解析から StarD7 は N 末端に 75 アミノ酸で構成されるミトコンドリア移行配列を持つことが判明した。この結果から、StarD7 が何らかの脂質をミトコンドリアへ輸送する機能を有することが予想された。本研究ではさらに生化学的および細胞生物学的な手法で StarD7 の生物学的意義について解析した。

図 1 : StarD ファミリーの分子系統樹と輸送する脂質



3. 研究の方法

(1) V5 タグで標識した StarD7 の発現ベクターを構築し、マウス肝癌由来の細胞株 Hepa-1 に発現して細胞免疫染色を行い、細胞内局在を解析した。さらに、本タンパク質に対するポリクローナル抗体を調製し、ラット肝臓や Hepa-1 を細胞分画して本タンパク質が回収される画分を調べた。さらに、プロテアーゼ

K に対する耐久性から、StarD7 のミトコンドリア内での局在を調べた。

(2) 大腸菌で StarD7 を発現し、アフィニティーカラムで高純度に精製した。これを用い、StarD7 が輸送する脂質の特異性を解析した。脂質輸送の活性は、蛍光標識リン脂質をリポソームに組み込み、輸送活性があると蛍光が上昇する FRET 法を用いた。

(3) 本タンパク質を高発現した Hepa-1 細胞に蛍光標識 PC を取り込ませ、これがミトコンドリアへ輸送される活性を測定した。

(4) Hepa-1 細胞に発現している内在性 StarD7 を特異的 siRNA を用いてノックダウン後、ミトコンドリア形態を電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) V5 タグで標識した StarD7 を Hepa-1 細胞に発現して細胞内局在を解析したところ、細胞が低密度な状態ではミトコンドリアに、高密度では細胞質に局在した (図 2)。また、ラット肝臓においても、StarD7 はミトコンドリアと細胞質の両画分に局在することが明らかになった (図 3)。ミトコンドリアに存在する StarD7 は、Protease K によって分解されたことからミトコンドリアの外膜に存在していることがわかった。(Porin は外膜、CVα および Core1 は内膜タンパク質のコントロール。) (図 4)

図 2 : StarD7 の細胞内局在 (Hepa-1 細胞)

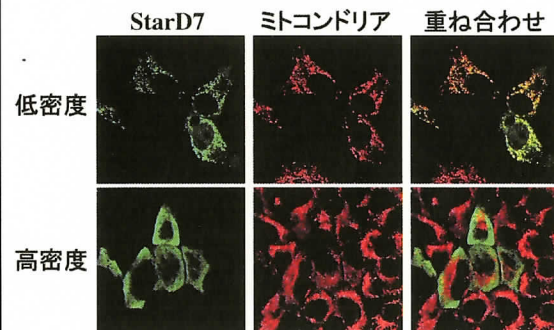


図3：ラット肝臓の細胞分画

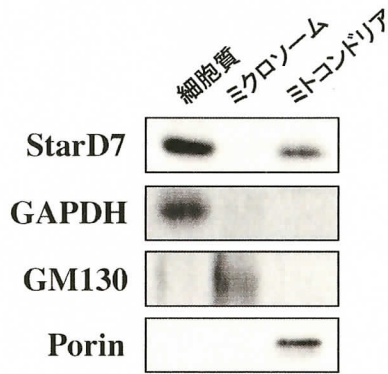
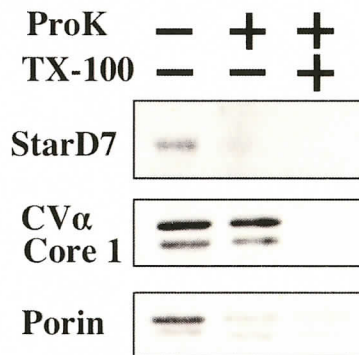
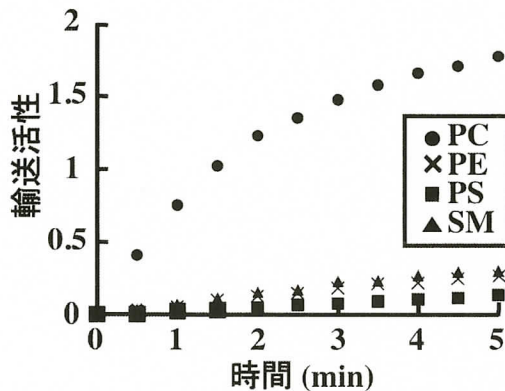


図4：StarD7のミトコンドリア内での局在



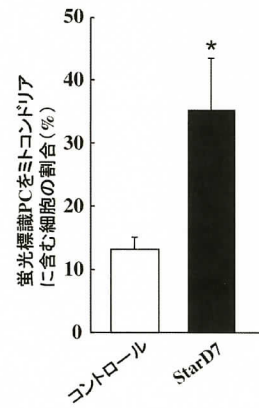
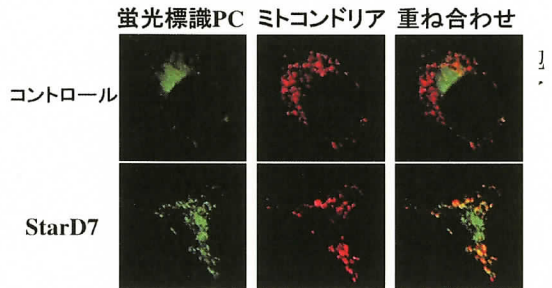
(2)大腸菌で発現・精製した StarD7 を用い、リポソーム間におけるリン脂質輸送活性を調べた。その結果、本タンパク質は PC をよく輸送したが、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、スフィンゴミエリン (SM) などのリン脂質に対してはほとんど輸送活性を示さなかった (図5)。これにより、StarD7 は PC を特異的に輸送する活性を有することが明らかになった。

図5：StarD7の脂質輸送の特異性



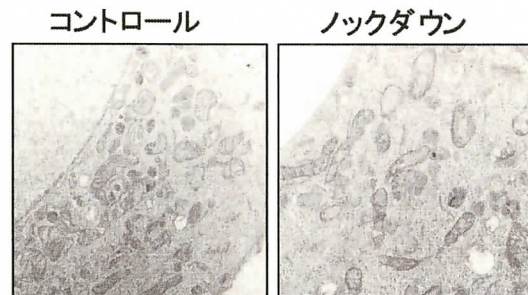
(3)Hepa-1 細胞に蛍光標識 PC を取り込ませ、ミトコンドリアへの輸送を調べた結果、StarD7 を高発現した細胞では NBD-PC のミトコンドリアへの輸送が向上していた (図6)。

図6：StarD7 によるミトコンドリアへの PC 輸送活性



(4)内在性の StarD7 をノックダウンした細胞では、クリステの減少などのミトコンドリアの形態異常が観察された (図7)。

図7：内在性 StarD7 をノックダウンした Hepa-1 細胞の電子顕微鏡観察



以上の実験結果から、本タンパク質は、ミトコンドリアへ PC を輸送する活性を有することが示された。これまで、ミトコンドリアへのリン脂質の供給は、ミトコンドリアと小胞体/ゴルジ体との膜同士の接触によって行われると考えられて来た。それに対し、今回の研究は、StarD7 という可溶性タンパク質がミトコンドリアへ PC を選別輸送するという新規経路を見いだした (図 6)。また、本研究は StarD7 が正常なミトコンドリアの形成に重要であることを示した。本タンパク質がミトコンドリアの形態形成にどのような役割を演じているかの今後の展開が期待される。

研究者番号：80392116

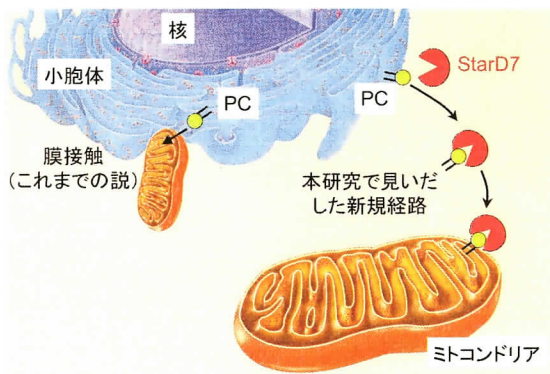
(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

図 6：本研究のまとめ



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Horibata, Y. and Sugimoto, H. : StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria. (査読有) *J. Biol. Chem.* **285**, 7358-7365 (2010) doi:10.1074/jbc.M109.056960

[学会発表] (計 2 件)

- ① 堀端康博、リン脂質をミトコンドリアへ輸送する新規タンパク質の機能解明、第 37 回獨協医学会、栃木、2009 年 12 月
- ② 堀端康博、杉本博之、リン脂質輸送タンパク質 StarD7 の生化学的解析と細胞内局在、第 50 回日本脂質生化学会、徳島、2008 年 6 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀端 康博 (HORIBATA YASUHIRO)
獨協医科大学・医学部・助教