

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：83206

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15798

研究課題名（和文）オルガネラコンタクトの破綻およびストレス応答にともなうリピドームの変動解析

研究課題名（英文）Lipid analysis associated with disruption of membrane contact site and stress response

研究代表者

小島 理恵子 (Kojima, Rieko)

富山県薬事総合研究開発センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：60769652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の中には、小胞体やミトコンドリアなど、生体膜で囲まれた様々な機能をもつオルガネラが存在します。生体膜の主成分である脂質の組成はオルガネラによって異なり、厳密に恒常性が維持されていますが、脂質がどのように合成され、適切な場所に分配、輸送されるのかについては未解明な部分が多く残されています。本研究では、ヒトの神経変性疾患原因遺伝子の酵母オルソログ（相同な機能をもった遺伝子）が、ミトコンドリア内で合成されるリン脂質の合成や輸送、量の調節に関与している可能性を示しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒトの神経変性疾患原因遺伝子の酵母オルソログに疾患関連変異を導入すると、ミトコンドリア内リン脂質の異常に加えて、ミトコンドリア形態の異常、呼吸活性低下などが引き起こされ、ミトコンドリア機能不全に陥ることが明らかとなりました。神経変性疾患は、いまだに明確な発症メカニズムは分かっておらず根本的な治療薬も存在しませんが、本研究結果より、分子病態メカニズムの解明や創薬につながる可能性があり、学術的意義、社会的意義は大きいと考えます。

研究成果の概要（英文）：The cell contains different functional organelles, such as endoplasmic reticulum and mitochondria, which are surrounded by biological membranes. The composition of lipids, which are the main components of biological membranes, varies among organelles, and their lipid compositions are tightly regulated. However, the mechanisms underlying lipid synthesis, distribution, and transport to appropriate organelles remain largely unexplored. In this study, we demonstrated that a yeast orthologue of neurodegenerative disease-related gene may be involved in the synthesis and transport of intramitochondrial phospholipids. The results of this study may lead to the elucidation of the molecular mechanism and drug discovery for neurodegenerative diseases.

研究分野：細胞生物学，生化学

キーワード：脂質解析 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

生体膜は、細胞質と外界および細胞質とオルガネラを隔てる役割を持ち、生命の最小単位である細胞が生きるために不可欠な存在である。生体膜は主に脂質とタンパク質から構成されるが、オルガネラの種類によって構成される脂質やタンパク質の種類、組成比は異なり、厳密に恒常性が維持されている。オルガネラは長い間独立に存在し、機能していると考えられてきたが、2009年に酵母細胞でミトコンドリアと小胞体の一部を物理的に結合させてメンブレンコンタクトサイト(MCS)形成を仲介するタンパク質複合体として、ERMES (ER-mitochondria encounter structure) が同定されたことにより(Kornmann et al., *Science*, 2009), 異なるオルガネラ同士がMCSを形成し機能的に連携していることが明らかとなった。ERMES構成因子はリン脂質を結合するドメインを有していることから、リン脂質輸送に関与することが示唆されていた。その一方で、ERMESのリン脂質輸送への関与を否定する論文も複数報告されており、ERMESのリン脂質輸送能については議論となっていた。申請者は、ミトコンドリア-小胞体間のリン脂質輸送を直接評価できる *in vitro* リン脂質輸送実験を開発し、ERMESがミトコンドリア-小胞体間でのリン脂質輸送を仲介していることを明らかにした(Kojima et al., *Sci Rep.*, 2016)。しかし、ERMESによる脂質認識がどれくらい厳密であるかや、脂質輸送の分子メカニズムなどは明らかになっておらず、多くの課題が残されている。また、ERMESが欠損した細胞でもリン脂質輸送が完全には失われないことから、リン脂質輸送を仲介する他の経路の存在が示唆される。実際にERMESの同定以降、次々と新規MCS因子が同定され、その多くはオルガネラ間での脂質輸送に関与すると報告されているが、認識する脂質の特異性や結合の強さ、輸送の分子メカニズム等についてほとんど明らかとなっていない。MCSを介した脂質合成・輸送のメカニズムをはじめ、異なるMCS間での機能的連携の詳細や、どのようにコンタクト形成の場(=輸送の場)を制御するのか等はほとんど明らかとなっておらず、多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、質量分析を用いてMCSの構成因子が欠損または機能低下した酵母細胞の詳細な脂質解析を行うことにより、MCSを介した脂質の合成、輸送、代謝に関する新たな知見を得ることを目的とした。またMCSだけでなく、膜ダイナミクスに関与する因子や細胞ストレスにも着目して解析を応用し、膜ダイナミクス変化にともないどのような脂質の種類や量が変化するかも調べる。

3. 研究の方法と成果

酵母リポドームの解析に関する報告(Ejsing et al., *PNAS*, 2009)を参考に、質量分析計を用いた酵母野生型細胞の脂質解析法を検討した。リン脂質については、液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計(LC-TOF/MS)を用いた解析法を決定した。その過程で、細胞の増殖状態が脂質組成に影響を及ぼすため、増殖状態を厳密に揃える必要があること、リン脂質の中でも含有量の少ないカルジオリピン(CL)を測定するためには、他のリン脂質を解析するときよりも細胞数を増やす必要があること等が分かった。次に、野生型細胞と、小胞体-ミトコンドリア間のMCSを形成するERMESを欠損した細胞との間でリン脂質組成を比較したところ、ホスファチジルセリン(PS)について、PS全体量には野生型細胞と有意な差がないが、ERMES欠損細胞ではPS32:2がやや増加し、PS34:1がやや減少していることが分かった。ERMES欠損による小胞体-ミトコンドリア間のPS輸送効率低下を補うために、不飽和度が高いPSを増やし、脂質の流動性を高めていること等が考えられる。EMC(ミトコンドリア-小胞体間のMCS形成因子)やvCLAMP(ミトコンドリア-液胞間のMCS形成因子)の構成因子を欠損した細胞においては、野生型細胞とリン脂質の組成に違いはみられなかった。一方、小胞体ストレスを与えた細胞においては、CL量が増加傾向にあることが分かった。また、CL合成酵素であるCrd1を欠損した酵母細胞を呼吸培地で培養すると、一定量のCLが存在していることが分かった。このことは、Crd1に依存しない新規CL合成ルートが存在を示唆している。これらのCLに関する新たな知見は重要であるため、今後さらに詳細に解析を進めていく予定である。

また、新たに疾患と関連している遺伝子に着目して研究を進めた。近年新たなパーキンソン病(PD)の原因遺伝子として同定されたCHCHD2(Funayama et al., *Lancet Neurology*, 2015)は、ミトコンドリアの膜間部に局在するタンパク質をコードし、ミトコンドリアの正常な機能に重要であることから、新たな創薬標的分子として着目されている。一方でCHCHD2の分子機能については明確なコンセンサスが存在せず、不明な点が多く残されたままである。そこで、CHCHD2の酵母オルソログMix17の機能を明らかにすることにより、神経変性疾患の複雑な分子病態メカニズム解明に向けた糸口を見つけたいと考えた。酵母細胞においてMix17遺伝子を欠損させても目立った表現型を示さず解析が困難であったため、Mix17の機能を掘り下げていくためには強い表現型を示す変異体が必要である。そこでCHCHD2のPD疾患関連変異を

Mix17 遺伝子に導入し、細胞増殖に影響を与えるものをスクリーニングしたところ、強い増殖阻害を示す変異体 (以下 Mix17 PD 変異体とする) を得ることに成功した。Mix17 PD 変異体は、呼吸培地 (ミトコンドリアの呼吸活性が必須となる培地) における強い増殖阻害、ミトコンドリアの形態異常、ミトコンドリア内リン脂質 (CL, ホスファチジルエタノールアミン (PE)) の減少、呼吸活性の著しい低下、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の欠失等の強い表現型を示したことから、Mix17 はミトコンドリア形態や mtDNA の維持、リン脂質の合成や輸送、呼吸活性に重要な役割を果たしていることが示唆される。中でもミトコンドリア内リン脂質に関する機能と mtDNA 維持に関する機能はこれまで報告されておらず新しい知見であるため、今後この 2 つの機能に着目して詳細な分子メカニズムを解析していく予定である。

研究期間中の発表論文リスト

Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted Escherichia coli phosphatidylserine synthase PssA.

Shiino, H., Furuta, S., Kojima, R., Kimura, K., Endo, T., and Tamura, Y.

FEBS J., 2021 May;288(10):3285-3299. doi: 10.1111/febs.15657.

概要: 新規脂質輸送経路を明らかにするために、大腸菌の PS 合成酵素を酵母細胞内の様々なオルガネラ膜に局在させる実験系を確立した。またその実験系を用いて新規の PS 輸送経路が存在することを示した。

Kimura, K., Kawai, F., Kubota-Kawai, H., Watanabe, Y., Tomii, K., Kojima, R., Hirata, K., Yamamori, Y., Endo, T., and Tamura, Y.

Crystal structure of Tam41 cytidine diphosphate diacylglycerol synthase from a Firmicutes bacterium.

J Biochem., 2022 Mar 31;171(4):429-441. doi: 10.1093/jb/mvab154.

CL の合成に必要な CDP-ジアシルグリセロール合成酵素 Tam41 (Firmicutes bacterium 由来) の X 結晶構造解析を行い、その分子基盤を解明した。

Dissociation of ERMES clusters plays a key role in attenuating the endoplasmic reticulum stress.

Kakimoto-Takeda, Y.*, Kojima, R.*, Shiino, H., Shinmyo, M., Kurokawa, K., Nakano, A., Endo, T., and Tamura, Y. (*contributed equally to this work)

iScience., 2022 Oct 14;25(11):105362. doi: 10.1016/j.isci.2022.105362.

ミトコンドリアのダイナミクス (融合と分裂) および小胞体ストレスの少なくとも 2 つの異なる経路が、ERMES が形成する MCS の数の調節に関与していることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Keisuke, Kawai Fumihito, Kubota-Kawai Hisako, Watanabe Yasunori, Tomii Kentaro, Kojima Rieko, Hirata Kuniyo, Yamamori Yu, Endo Toshiya, Tamura Yasushi	4. 巻 171
2. 論文標題 Crystal structure of Tam41 cytidine diphosphate diacylglycerol synthase from a Firmicutes bacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 429 ~ 441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab154	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 Shiino Hiroya, Furuta Shiina, Kojima Rieko, Kimura Keisuke, Endo Toshiya, Tamura Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle targeted Escherichia. coli phosphatidylserine synthase PssA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	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） 10.1111/febs.15657	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 Kakimoto-Takeda Yuriko, Kojima Rieko, Shiino Hiroya, Shinmyo Manatsu, Kurokawa Kazuo, Nakano Akihiko, Endo Toshiya, Tamura Yasushi	4. 巻 25
2. 論文標題 Dissociation of ERMES clusters plays a key role in attenuating the endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105362 ~ 105362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105362	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------