

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870668

研究課題名(和文)細胞内リン脂質輸送の制御機構とミトコンドリア機能との関連性

研究課題名(英文)Relationship between intracellular phospholipid trafficking and mitochondrial function

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

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、ミトコンドリアはPCを生合成できない。これまでミトコンドリアへのPC輸送の分子機構は不明であったが、可溶性分子StarD7がこれに関わることを申請者は以前見出した。本研究ではStarD7がミトコンドリアの機能や形態形成において果たす役割を調べた。Hepa-1細胞のStarD7の発現を低下すると、ミトコンドリアのPC量の減少、酸素消費の低下、呼吸鎖複合体の活性の低下、細胞内ATPや細胞増殖の低減、複合体IVの不安定化、クリステ構造の消失が見られた。以上からStarD7はミトコンドリアの健全性に極めて重要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylcholine (PC) in mitochondria is a major phospholipid comprising in both the outer and the inner membrane. However, PC must be imported from its production organelles because mitochondria do not have the essential enzymes required for the PC biosynthesis. In the previous study, I found that StarD7 mediates the intracellular transfer of PC to mitochondria. In this study, I analyzed contribution of StarD7 for the maintenance of mitochondrial phospholipid contents and functions using HEPA-1 cells with knockdown (KD) by siRNA and knockout (KO) of StarD7. It was found that StarD7 is indispensable for the maintenance of proper composition of mitochondrial phospholipids, and plays important roles for activity, integrity, and stability of mitochondrial complexes and formation of cristae structure.

研究分野：phospholipid

キーワード：phospholipid mitochondria lipid

### 1. 研究開始当初の背景

リン脂質膜は細胞小器官の区画化に必要なだけでなく、それらの健全な機能にも不可欠な成分である。ミトコンドリアは内膜と外膜の2枚のリン脂質膜で構成されており、これらの膜はATP合成に必要なプロトン勾配や呼吸鎖複合体の内膜局在化に重要である。ミトコンドリアのリン脂質膜の主要な成分はホスファチジルコリン(PC)で、総リン脂質の40-50%を占める。ところが、ミトコンドリアは自身に必要なPCを合成する酵素を持たない。そのため、細胞内ではPC合成酵素を含む小胞体(ER)やゴルジ体等で合成されたPCがミトコンドリアへ輸送されていると考えられている。これまで、ERからミトコンドリアへのリン脂質の輸送は、ERとミトコンドリアとの膜の接触領域であるMAM(Mitochondria Associated Membrane)を経由して行われると考えられてきた。

これに対し、申請者はMAMによる輸送とは全く異なるリン脂質輸送経路を発見した。それは可溶性の輸送タンパク質 StarD7 を介した輸送経路である。StarD7 は、N末端にミトコンドリア移行シグナルを、C末端にPCと結合するSTARTドメインを有するタンパク質で、生細胞においてPCを非小胞的にミトコンドリアへ輸送する活性を有していた(Horibata, Y. and Sugimoto, H., J. Biol. Chem. 2010)。このように、ミトコンドリアへのリン脂質輸送は、複数の経路で行われることが明らかになりつつあるが、StarD7の生物学的機能等の詳細な解析は不明である。

### 2. 研究の目的

リン脂質はミトコンドリアの膜構造の形成と維持に不可欠であり、その供給が不全になるとミトコンドリアに様々な機能異常(ATP合成能の低下、膜電位喪失、カルシウム流出、活性酸素漏出など)が生じると考えられる。本研究ではマウス肝癌細胞株 Hepa-1 細胞の StarD7 の発現を抑制あるいは欠損することで StarD7 による PC 輸送を停止し、ミトコンドリアの形態形成や機能にどのような変化が現れるかを調べ、本タンパク質がミトコンドリアにおいて果たす役割を調べた。

### 3. 研究の方法

Hepa-1 細胞の StarD7 を siRNA でノックダウン(KD)したり、CRISPR/Cas9系を用いてノックアウト(KO)することで StarD7 の発現を抑制あるいは欠損した細胞を得た。これらの細胞からパーコール/ナイコデント密度勾配法で高純度のミトコンドリアを単離し、リン脂質を抽出後、LC-MS/MSを用いてリン脂質の組成や量を解析した。また上記細胞の細胞内ATP量、細胞増殖、複合体の発現量を生化的

的手法により解析した。また Seahorse フラックスアナライザーを用いたミトコンドリアの酸素消費や複合体活性のリアルタイム測定は、UCLA デヴィットゲフィン医科大学 院・人類遺伝学の Karen Reue 研究室との共同研究で行った。

### 4. 研究成果

パーコール/ナイコデントの密度勾配法により細胞からミトコンドリアを単離し、脂質を抽出後 LC-MS/MS で PC およびホスファチジルエタノールアミン(PE)量を比較した。その結果、KD および KO 細胞ではコントロールや野生型細胞(WT)と比べ主要な PC(脂肪酸組成 18:0-18:1, 16:0-18:1, および 18:1-18:1)の量が有意に低下していた。この結果は、StarD7 が PC をミトコンドリアへ輸送するというこれまでの我々の仮説を強く支持した。一方、理由はわからないが脂肪酸組成 18:0-20:4 の PE が増大していた。

次に、KD 細胞のミトコンドリアの酸素消費および複合体 I~IV の活性を Seahorse フラックスアナライザーを用いて無侵襲的に計測した。その結果、KD 細胞ではいずれも有意に低下していることがわかった。

続いて細胞内 ATP 量について調べた。KO 細胞はグルコースを含む DMEM 培地では、WT と同様の細胞内 ATP 量および細胞増殖能を示した。ところが、グルコースをガラクトースに替えた DMEM 培地で培養し、解糖系よりもミトコンドリア依存的な ATP 合成に代謝を変化させたところ、KO 細胞の細胞内 ATP 量は WT と比べ5分の1程度にまで低下した。さらに、細胞増殖能についてもガラクトース培地では KO 細胞は40%低ほど低下していた。

次に呼吸鎖複合体のタンパク質量について調べた。KD および KO 細胞では呼吸鎖複合体 I~IV のサブユニットのうち、複合体 IV のサブユニットである MTCO1 のタンパク質量が減少していた。MTCO1 の mRNA 量は WT と KO 細胞とで変化がないことから MTCO1 がタンパク質として不安定になっていることが考えられた。続いて、KO 細胞にミトコンドリア移行配列を有するヒト StarD7-I を発現すると MTCO1 のタンパク質量は回復したが、上記配列がない StarD7-II では回復しなかった。

最後にミトコンドリアの形態を電子顕微鏡で調べたところ、KO 細胞では内部クリステ構造が消失したミトコンドリアが多数見られた。一方、クリステの構造形成に関与すると考えられている Opa1 の発現量やプロセシングには WT と KO 細胞で差異がなかった。つまり、StarD7 欠損によるクリステ構造の消失は Opa1 に非依存적であると考えられた。

以上の結果から、StarD7 はミトコンドリアのホスファチジルコリン組成の維持を行う

重要な脂質輸送分子であり、ミトコンドリアの機能や形態形成において極めて重要な役割を果たすことが示唆された (J. Biol. Chem. 論文投稿中)。

ミトコンドリアはエネルギーの産生やアポトーシスの制御において中心的な役割を果たしている。特にエネルギーを多く消費する脳、心臓、筋肉では、ミトコンドリアの機能低下は難病であるミトコンドリア病の発症の原因となる。さらに最近、ミトコンドリアの機能障害が、糖尿病、肥満、神経変性疾患(パーキンソン病など)、躁鬱病などの発症と密接に関連していることが明らかにされてきている。StarD7はミトコンドリアの健全な機能や形態形成に重要であり、本タンパク質の障害によってミトコンドリア病や上記の疾患が引き起こされる可能性もあり、本研究はこれらの病態解明や原因究明にも基礎的な情報を提供すると考えられる。

#### 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 3 件)

Ando H., Aoyama, C., Horibata, Y., Satou, M., Mitsunashi, S., Itoh, M., Hosaka, K., and Sugimoto, H. : Transcriptional suppression of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase by 25-hydroxycholesterol is mediated by nuclear factor-Y and Yin Yang1.

*Biochem. J.* **471**, 369-379 (2015) 査読有  
DOI: 10.1042/BJ20150318

Itoh, M., Nakadate, K., Horibata, Y., Matsusaka, T., Xu, J., Hunziker, W., and Sugimoto, H. : The Structural and Functional Organization of the Podocyte Filtration Slits Is Regulated by Tjp1/ZO-1.

*PLoS One* **9**, e106621 (2014) 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0106621

Horibata, Y., Ando, H., Itoh, M., and Sugimoto, H. : Enzymatic and transcriptional regulation of the cytoplasmic acetyl-CoA hydrolase ACOT12.

*J. Lipid Res.* **54**, 2049-2059 (2013) 査読有  
DOI: 10.1194/jlr.M030163

[学会発表](計 5 件)

堀端康博、伊藤雅彦、Peixiang Zhang、Laurent Vergnes、安戸博美、青山智恵子、Karen, Reue、杉本博之「StarD7によるミトコンドリアのホスファチジルコリン組成および機能と形態形成の維持」

第58回日本脂質生化学会(2016年6月9-10日、にぎわい交流館 AU、秋田)

堀端康博、Peixiang Zhang、Karen Reue「膵臓細胞株 TC3 を用いたスタチンによる糖尿病発症機序の解明」

第38回分子生物学会年会/第88回日本生化学会合同大会(2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド、神戸)

Horibata, Y., Ando, H., Itoh, M., and Sugimoto, H.: Regulatory systems of Acyl-CoA thioesterase 12 (ACOT12) that control cytosolic acetyl-CoA degradation and lipid biosynthesis. The 2015 Deuel Conference on Lipids (Mar 3-6, 2015) Monterey CA, USA

堀端康博「ミトコンドリア恒常性維持における新規リン脂質輸送分子の役割」

第41回獨協医学会(2013年12月7日、獨協医科大学、栃木)

堀端康博、安戸博美、伊藤雅彦、杉本博之「脂質生合成を制御する細胞質アセチル CoA 分解酵素 Acyl-CoA チオエステラーゼ 12 (ACOT12) の活性調節機構の解析」第86回日本生化学会(2013年9月11-13日、パシフィコ横浜、神奈川)

[産業財産権]  
出願状況(計 件)

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

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 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  
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：

(4)研究協力者

Karen Reue

Peixiang Zhang

Laurent Vergnes

(Dept. of Human Genetics, David Geffen  
School of Medicine, UCLA, USA)