

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05595

研究課題名(和文)リン脂質輸送から理解するオルガネラ恒常性維持機構

研究課題名(英文)Understanding Organelle homeostasis through phospholipid transport

研究代表者

田村 康(Tamura, Yasushi)

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) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物の構成単位である細胞の中には人間の社会とよく似た細胞の社会があります。本研究では、細胞の社会における脂質の物流システムがどのように整備されているのか調べました。その結果、細胞の中に張り巡らされた脂質の交通網を試験管の中に再現して解析する実験手法の開発に成功し、この独自の実験手法を利用して、リン脂質やスフィンゴ脂質合成に関与する因子の発見に至りました。また新しいリン脂質輸送タンパク質の発見や、これまで独立に存在すると考えられてきた細胞小器官同士が、互いに一部結合することで脂質を輸送する道を作ることを見出しました。この発見は、細胞構造の概念を書き換えるインパクトの大きい成果となりました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated Intracellular logistics systems for lipid transportation. First of all, we succeeded in developing an experimental system to analyze phospholipid transport between the ER and mitochondria in a test tube. Using this system, we identified novel factors involved in the phospholipid and sphingolipid metabolism. Second, we characterized molecular functions of phospholipid transfer proteins in mitochondria. Importantly, we found that organelles, which have been thought to exist separately, directly tether each other and form pathways for transporting phospholipids. These discoveries provide new aspects that could rewrite the concept of cellular structure.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リン脂質 ミトコンドリア オルガネラコンタクト スフィンゴ脂質

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞内に発達した膜構造であるオルガネラは、それぞれ特殊化した構造と機能を持ち、生命活動に必須の役割を果たしている。これまでミトコンドリアや小胞体などのオルガネラは、各々が独立して機能すると考えられてきたが、オルガネラ膜同士を物理的に近接させる分子装置が相次いで発見され、異なるオルガネラ同士が互いに相互作用することが明らかとなった。出芽酵母のミトコンドリア外膜と小胞体膜を結合させるタンパク質複合体として、ERMES 複合体が同定され、これらのオルガネラ間コンタクトサイトで、リン脂質輸送を仲介すると言うモデルが提唱されていた(ミトコンドリア・小胞体: Kornmann et al. *Science*, 2009)。しかしその一方で、ERMES のリン脂質輸送機能に関しては否定する論文も複数報告されており、ERMES が脂質輸送に関与するかは大きな議論となっていた。その他、ERMES に代表されるオルガネラ間テザリング因子の複合体形成メカニズムや、オルガネラ間コンタクトサイトの形成機構はほとんど何もわかっていない状態であった。また細胞内リン脂質輸送機構に関しても、リン脂質輸送タンパク質はほとんどわかっておらず、輸送の分子メカニズムはほとんど明らかにされていない状態であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ミトコンドリア・小胞体間のリン脂質輸送メカニズムを解明することである。これまでサイトゾルで合成されたタンパク質が、異なる細胞内区画に輸送されるメカニズムについては多くの解析がなされてきているが、リン脂質の輸送メカニズムはほとんど分かっていない。細胞内リン脂質輸送機構の詳細を明らかにするために、本研究では以下の5つのサブプロジェクトを行う。

- (1) 試験管内でミトコンドリア小胞体間のリン脂質輸送反応を評価できる実験系の構築。
- (2) 確立した試験管内アッセイ系を駆使し、議論となつている ERMES 複合体のリン脂質輸送における役割を明らかにする。
- (3) 同様の試験管内実験系をスクリーニング実験に用いることで、新規リン脂質代謝遺伝子を同定し、その機能解析を行う。
- (4) GFP 融合タンパク質として発現した際に一細胞あたり5-6個のドットとして検出される ERMES 複合体(以後 ERMES ドットと呼ぶ)の数を制御するメカニズム(クラスタリング機構)を明らかにする。
- (5) 私達が過去に同定したリン脂質代謝に関与するミトコンドリア膜間部タンパク質複合体 Ups2-Mdm35 複合体が、リン脂質代謝においてどのような役割を持つかを明らかにする。

以上の解析により、リン脂質輸送機構の観点から、ミトコンドリアと小胞体の形態や量

を維持するオルガネラ恒常性維持の分子機構の理解を目指すことが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 試験管内リン脂質輸送実験系の構築

出芽酵母から単離した膜画分を、放射性同位体ラベルしたセリンとインキュベートすることで、小胞体膜上で  $^{14}\text{C}$ -ホスファチジルセリン(PS)を合成する。このPSがミトコンドリアへ輸送されれば、ミトコンドリア内膜に存在するPS脱炭酸酵素によって、ホスファチジルエタノールアミン(PE)に変換される。このPEがもう一度小胞体に輸送され、PEメチル化酵素によってホスファチジルコリン(PC)に変換される。このPS→PE→PCの変換をモニターすることで小胞体・ミトコンドリア間のリン脂質輸送を評価する。申請時には試験管内でPS→PE→PCが高効率で合成されることを見出していた。しかし、このリン脂質の変換が、これらオルガネラ間でのリン脂質輸送を反映したものであるか、すなわちリン脂質輸送がリン脂質変換の律速段階となるかなど、実験系の有効性を検証した。

### (2) 試験管内リン脂質輸送実験を用いた ERMES 複合体の機能解析

ERMES 複合体構成因子欠損公募株から単離した膜画分を用いることで、ERMES 複合体が欠損した際にミトコンドリア・小胞体間のリン脂質輸送に阻害が生じるかを検討した。

### (3) 試験管内リン脂質輸送アッセイ系を用いた新規リン脂質代謝因子の探索と機能解析

上記(1)の実験を、機能未知の小胞体またはミトコンドリアタンパク質欠損株から単離した膜画分を用いて行うことで、新規リン脂質代謝関連因子を探索した。

### (4) ERMES 複合体の数を制御するメカニズムの解析

ERMES ドットの数が変化する条件を、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により明らかにした。特にミトコンドリアの動的性質や細胞ストレス条件が ERMES ドットの数に影響するかを検討する。

### (5) Ups2-Mdm35 複合体の機能解析

Ups2-Mdm35 が欠損した細胞では PE の量が減少することがわかっていった。また Ups2 のホモログタンパク質である Ups1 がホスファチジン酸の輸送タンパク質であることから、Ups2-Mdm35 もリン脂質輸送タンパク質であることが示唆された。そこで組換え Ups2-Mdm35 タンパク質を精製し、Ups2-Mdm35 がリン脂質輸送活性を持つかを検討する。具体的には Ups2-Mdm35 が PE の前駆体リン脂質である PS の輸送に関与するかを検討する。

## 4. 研究成果

- (1) 試験管内リン脂質輸送実験系の確立に成功した

出芽酵母から単離したミトコンドリアと小胞体を含む膜画分を用いて、<sup>14</sup>CラベルしたPSを合成し、このPSがPE、PCへと変換されていく様子を観察することで小胞体・ミトコンドリア間のリン脂質輸送を評価可能であることを確認した。具体的にはPS、PE、

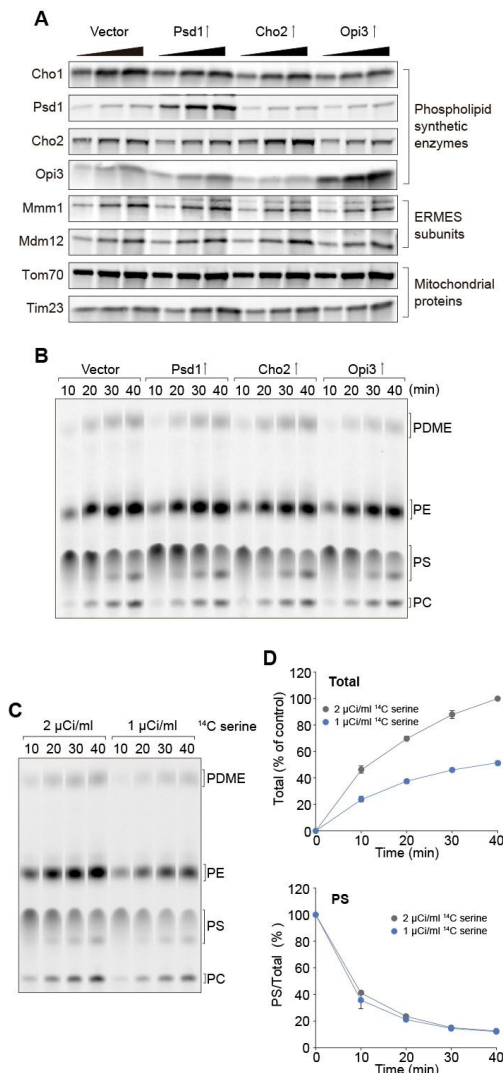


図1 リン脂質合成酵素の過剰発現や、PS合成量はリン脂質輸送に影響しない。

PCを合成する酵素を過剰発現した膜画分を用いた場合や、逆に加える<sup>14</sup>C-セリンの量を少なくして合成するPSの量を少なくした場合でも、PS→PE→PCの変換速度に差がないことを確認した(図1)。この結果は、小胞体ミトコンドリア間のリン脂質輸送が、リン脂質合成(変換)の律速段階となる事を示している。さらに低濃度の界面活性剤(Triton X-100)存在下では、PSの合成はされるが、PE、PCがほとんど合成されないことを確認した。この結果は、インタクトな膜を介したリン脂質輸送に依存してPS、PE、PCが合成されることを示している。以上の結果から、PS→PE→PCの変換をモニターすることにより、ミトコンドリア・小胞体間でのリン脂質

輸送速度を評価できる実験系が確立されていることを示した。

(2)- 試験管内リン脂質輸送実験を用いてERMES複合体のリン脂質輸送における役割を明らかにした。

試験管内リン脂質輸送実験系を確立することができたので、ERMES構成因子欠損株から調製した膜画分において、リン脂質輸送に障害が生じるかを検討した。ERMES構成因子欠損株は非常に強い増殖阻害を示すことから、単純にERMES欠損株を使用すると、リン脂質組成異常やミトコンドリアの呼吸能の低下など様々な二次的影響が危惧された。そこでERMES欠損株の強い増殖阻害を回復させることができるサプレッサー変異体を用いて実験を行った。具体的にはミトコンドリア・液胞間のコンタクトを増加させることでERMESの欠損を相補すると考えられているVps13-D716H変異体を発現させることで増殖を回復させたERMES構成因子(Mmm1, Mdm12)欠損株を用いた。その結果、Mmm1やMdm12が欠損した際には小胞体で合成されたPSのミトコンドリアへの輸送が顕著に遅れることがわかった。その一方で、ミトコンドリアで合成されたPEの小胞体への輸送には障害が見られなかった。これらの結果から、ERMES複合体が小胞体からミトコンドリアへのPS輸送に関与することが示された。(1)(2)の成果は2016年にScientific Reportsに掲載された。

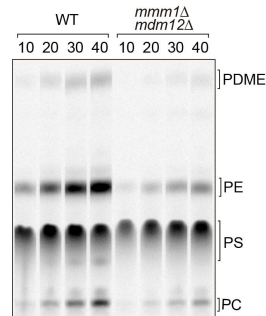


図2 ERMES構成因子欠損はミトコンドリアから小胞体へのPS輸送に障害を生じる

(3) 試験管内リン脂質輸送実験系を用いてリン脂質代謝に関与する新規遺伝子を単離した。

小胞体もしくはミトコンドリア外膜に存在することが報告されている機能未知タンパク質や、PSD2遺伝子と負に遺伝学的相互作用することが報告されている因子を欠損した酵母株から膜画分を調製し、(1)の試験管内リン脂質輸送実験系を行った。PSD2はゴルジ体で機能するPE合成酵素であるため、PSD2が欠損した際に増殖に重要になる因子は、ミトコンドリアでのPE合成、すなわちミトコンドリアへのPS輸送に重要な因子であることが期待される。スクリーニングの結

果, その欠損によりリン脂質合成がほとんど合成されなくなる因子として Pah1 と, リン脂質輸送が促進する因子 Ilm1 を同定した。Pah1 はホスファチジン酸 (PA) の脱リン酸化酵素でジアシルグリセロールの合成を仲介する酵素である。

### (3)- Pah1 の機能解析

まず Pah1 欠損株におけるリン脂質合成酵素の発現量を検討した結果, PS, PC 合成に關与する酵素のすべての発現量が著しく低下していた (図 3)。これらのリン脂質合成酵素をコードする遺伝子は, 転写活性化因子 Ino2/Ino4 と, Ino2/Ino4 のリプレッサー因子 Opi1, さらに細胞内イノシトール濃度によってその転写が制御される。細胞内イノシトール濃度が低く, PA→ホスファチジルイノシトール (PI) の変換が行われにくい場合や, PAH1 が欠損した場合, PA が消費されずに PA 量が増加する。Opi1 は PA に結合する性質があるので, PA が増加すると小胞体膜にトラップされて, 核に移行できなくなり, リン脂質合成酵素をコードする遺伝子群の転写は活性化されるはずである。しかし今回得られた結果は真逆であった。Pah1 欠損株をイノシトール

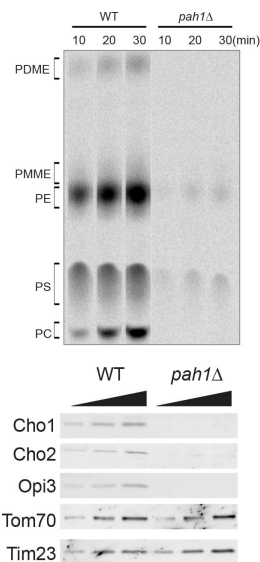


図 3 Pah1 の欠損はリン脂質合成酵素の発現量低下を引き起こす

非存在下で培養し, リン脂質合成酵素の発現量が増加するかを確認したが, イノシトールがない条件で Pah1 欠損株は致死であった。そこで Pah1 欠損によってリン脂質合成酵素の発現量が激減する原因を調べるために, 酵母ゲノムライブラリーを Pah1 欠損株に導入し, イノシトール無しの培地で生育できるクローンを単離した。増殖が回復した原因遺伝子を調べた結果, *INO4* が単離された。実際に Pah1 欠損株のゲノム上の *INO4* 遺伝子を調

べたところ, *INO4* 遺伝子内にトランスポゾンが挿入されたことによって *INO4* 遺伝子が機能できなくなっていたことがわかった。異なる親株を作製した Pah1 欠損株においても全く同じ場所にトランスポゾンの挿入があったことから, たまたま生じた現象ではなく, Pah1 欠損によって引き起こされる現象であると考えられる。今後 Pah1 の欠損がなぜ *INO4* ローカスへのトランスポゾン挿入を誘発するのか検討する必要がある。これらの結果は, 現在投稿準備中である。

### (3)- Ilm1 の機能解析

Ilm1 は 3 つの膜貫通領域を持つことが予想される小胞体膜タンパク質である。これまでオレイン酸を含無培地上で増殖に必須であることが報告されていたが, その機能は不明であった。本研究によって, Ilm1 が欠損するとミトコンドリア・小胞体間のリン脂質輸送が促進することが示唆された。しかし様々な実験で確認実験を行ったところ, 最終的に Ilm1 がリン脂質輸送には関与しないことがわかった。ただし解析を進めると Ilm1 が脂質代謝に關与することがわかってきた。例えば, Ilm1 が欠損するとカルジオリピン (CL) や

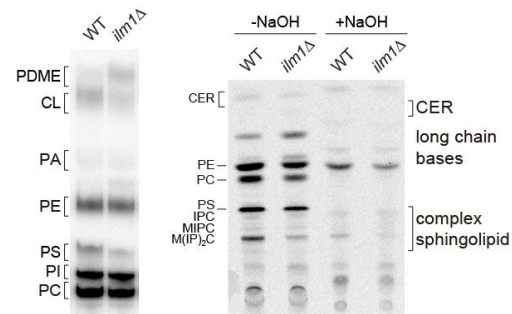


図 4 Ilm1 の欠損はリン脂質とスフィンゴ脂質の組成異常を引き起こす

PS と言ったリン脂質の量が減少する。さらにスフィンゴ脂質のうち M(IP)<sub>2</sub>C が減少することがわかった (図 4)。

Ilm1 が第一にリン脂質に影響するのか, それともスフィンゴ脂質代謝に關与するのかを検討するために, 既知のリン脂質合成酵素欠損株がスフィンゴ脂質異常を引き起こすか, もしくはその逆はあるかを検討した。その結果, リン脂質組成異常によってスフィンゴ脂質代謝に変化はでない一方で (図 5B), スフィンゴ脂質組成異常がリン脂質組成異常, 特に PS の減少を引き起こすことがわかった (図 5A)。これらの結果から, Ilm1 がスフィンゴ脂質代謝に關与する新規因子であることが明らかとなった。この成果に關しても現在投稿準備中である。

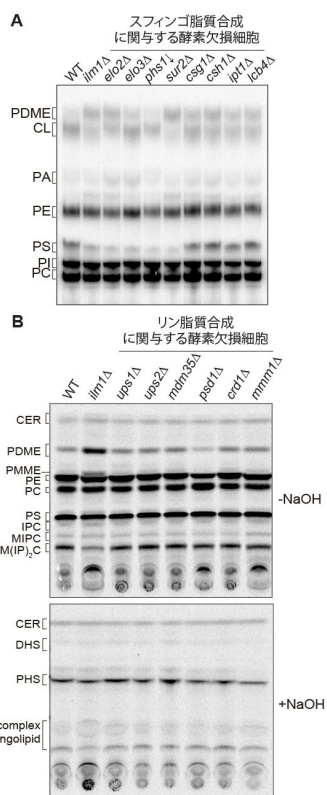


図 5 スフィンゴ脂質組成異常はリン脂質組成異常を引き起こす

(4)ERMES ドットの数を制御する 2 つの独立なメカニズムを発見した。

(4)- ミトコンドリアの融合と分裂によって ERMES ドットの数が増えることを発見。一細胞あたりの ERMES ドットが平均 6 個程度に維持されている。興味深いことにミトコンドリア分裂因子である Dnm1 が欠損した細胞では、ERMES ドットの数が増え、サイズが大きくなることを確認していた(図 6)。この結果はミトコンドリアの分裂が ERMES

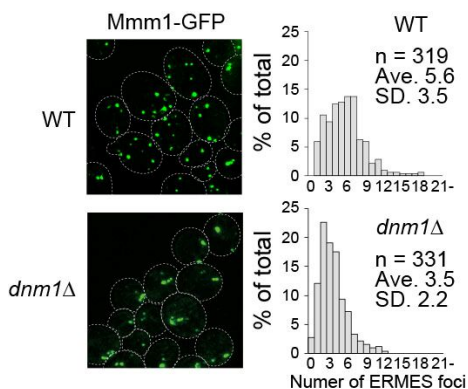


図 6 ERMES ドットの数の変化

の数の制御に参与することを示唆する。そこでミトコンドリア上で Dnm1 のレセプターとして機能する因子 Fis1 の欠損株を用いて同

様の実験を行ったところ、確かに ERMES ドットの数が増えることを確認した。さらにミトコンドリア分裂阻害剤である Mdivi-1 で細胞を処理した際にも ERMES ドットの数が増えられた。

次にミトコンドリア融合因子 Fzo1 を欠損させ、ミトコンドリア融合をできなくした際に、ERMES ドットの数が増えるか検討したところ、ミトコンドリア分裂を阻害した時とは逆に ERMES ドットの数が増えた。更に興味深いことにミトコンドリア融合因子と分裂因子を同時に欠損させると、ミトコンドリア分裂因子単独欠損株と同様に ERMES ドットの数が増えた(図 7)。これらの結果はミトコンドリアの融合と分裂がアンタゴニスティックにミトコンドリア・小胞体間コンタクトサイトの数の調節を行っている事を示している。この成果についても現在投稿準備中である。

(5) Ups2-Mdm35 複合体が PS 輸送因子であることを見出した。

Ups2-Mdm35 を大腸菌で安定に発現、精製することは難しかったが、これらのタンパク質をタンデムにつなげて発現することで大量精製が可能になることを見出した。調製した組換え Ups2-Mdm35 がリポソーム間でリン脂質を輸送する活性を持つかを検討したところ、Ups2-Mdm35 が PS 輸送タンパク質であることを直接的に示すことができた。この成果は九州大学の久下教授のグループと共同で JCB 誌に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

1. 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. (査読あり)  
DOI:10.1038/s41598-018-24466-0
2. Endo, T., Tamura, Y. and Kawano S. Phospholipid transfer by ERMES components (Editorial) *Aging* in press (2018) doi.org/10.18632/aging.101434(査読なし)
3. Endo T. and Tamura Y. (2018) News and Views; Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J.* e98993 DOI: 10.15252/embj.201898993. (査読なし)
4. Kawano, S., Tamura, Y., Kojima, R., Bala, S., Asai, Michel, EA, Kornmann, B., Riezman, I., Riezman, H., Sakae, Y., Okamoto, Y. and Endo T. (2017). Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1-Mdm12 of ERMES. *J. Cell Biol.* 217, 959-974. (査読あり)  
DOI: 10.1083/jcb.201704119.

5. Miwa, K., Kojima, R., Obita, T., Ohkuma, Y., Tamura, Y., and Mizuguchi, M. (2016). Crystal Structure of Human General Transcription Factor TFIIIE at Atomic Resolution. *J. Mol. Biol.* 428, 4258-4266. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.09.008. (査読あり)
6. Kojima R. Kajiura S. Sesaki H. Endo T. Tamura Y. (2016) Identification of multi-copy suppressors for endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 590, 3061-70. DOI: 10.1002/1873-3468.12358 (査読あり)
7. Arakawa S. Yunoki K. Izawa T. Tamura Y. Nishikawa S and Endo T. (2016) Quality control of nonstop membrane proteins at the ER membrane and in the cytosol. *Sci. Rep.* 6, Article number: 30795. DOI: 10.1038/srep30795 (査読あり)
8. Kojima. R. Endo T. and Tamura Y. (2016) A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro. *Sci. Rep.* 6, Article number: 30777. DOI:10.1038/srep30777 (査読あり)
9. Miyata N. Watanabe Y. Tamura Y. Endo T. and Kuge O. (2016) Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 for phosphatidylethanolamine synthesis in respiration-active mitochondria. *J. Cell Biol.* 214, 77-88. DOI: 10.1083/jcb.201601082 (査読あり)
10. Watanabe, Y., Tamura, Y., Kawano, S., and Endo T. (2015) Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria. *Nat. Commun.* 6, Article number: 7922 DOI:10.1038/ncomms8922 (査読あり)

〔学会発表〕(計 42 件)

招待講演

1. 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
2. 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
3. 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
4. 田村 康, 小島 理恵子, 遠藤 斗志也「リン脂質輸送における ERMES 複合体の役割」第 39 回分子生物学会年会シンポジウム「ミトコンドリアとオルガネラのコ

ミュニケーション」2016.12.1

5. 田村康 試験管内再構成実験系を利用したミトコンドリア・小胞体間リン脂質輸送機構の解析, 第 89 回日本生化学会 2016.9.27
6. Yasushi Tamura 「Nonvesicular Phospholipid transport via mitochondria」 The 21st International Symposium on Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets 2016.6.3
7. 田村康 ミトコンドリア・小胞体間リン脂質輸送機構の解明 2015 年度 遺伝研研究会「単細胞の細胞構築・運動・増殖機構の研究」2016.3.25
8. 田村康 ミトコンドリアの機能に必須のリン脂質輸送タンパク質 第 57 回脂質生化学会 2015.5.28

口頭発表 8 件

ポスター発表 25 件

〔図書〕(計 1 件)

1. Tamura Y. and Endo T. (2017) Role of intra- and inter-mitochondrial membrane contact sites in yeast phospholipid biogenesis, Organellar 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

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<https://www.tamuralab.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 康 (TAMURA, Yasushi)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号: 50631876

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

遠藤 斗志也 (ENDO, Toshiya)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号: 70152014