

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870311

研究課題名(和文) Ups1をハブとするミトコンドリア小胞体間リン脂質輸送機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of phospholipid-transport mechanism between mitochondria and the endoplasmic reticulum

研究代表者

田村 康 (Tamura, Yasushi)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・准教授

研究者番号：50631876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生命活動には脂質膜で囲まれた細胞内小器官構造が、独自の役割を果たす必要がある。オルガネラの一つであるミトコンドリアの機能には、膜の主成分であるリン脂質の適切な組成維持が必須である。

本研究では、ミトコンドリア内リン脂質輸送因子として唯一知られているUps1と遺伝学的に相互作用する因子のスクリーニングと機能解析を行った。その結果、新規脂質輸送候補タンパク質の同定に成功した。また精製Ups1を利用した解析により、Ups1とそのパートナータンパク質であるMdm35とのダイナミックな相互作用がリン脂質輸送に重要であることが明らかとなった。これらの発見はリン脂質輸送機構解明の一助となるだろう。

研究成果の概要(英文)：Characteristic functions of membrane-bound structures (organelles) in cells are essential for vital activities. Proper phospholipid composition of mitochondrial membranes is required for optimal mitochondrial functions.

In this study, we identified a gene encoding a mitochondrial protein, which genetically interacts with UPS1 as a novel factor involving in phospholipid transport. In addition, by biochemical analyses using recombinant Ups1, we revealed that dynamic interactions between Ups1 and Mdm35 are important for phospholipid transport. These findings would help our understandings in mechanisms of phospholipid transport as well as mitochondrial biogenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア リン脂質輸送

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは動的なオルガネラであり、細胞内で融合と分裂を繰り返しながら適切な構造と機能を維持している。これまでミトコンドリアの融合分裂機構は精力的に研究されてきたが、環境に応じて増減するミトコンドリア量の調節を、ミトコンドリアの融合分裂機構のみで説明するのは難しい。またオルガネラの機能発現には、オルガネラ膜を構成するリン脂質が、適切な割合で維持される必要がある。しかしリン脂質合成の場所は、小胞体、ミトコンドリアと言った一部のオルガネラ膜上に限られているため、複数の修飾ステップを経て合成されるリン脂質は、異なるオルガネラ膜を、前駆体リン脂質として行き来しなければならない。このようにリン脂質の輸送は、オルガネラの形態変化や恒常性維持だけでなく、リン脂質合成にも必須であるが、その輸送メカニズムについてはほとんどわかっていなかった。

研究を開始した当初、ミトコンドリアと小胞体を物理的に結合させ、これらのオルガネラ間でのリン脂質輸送を促進するタンパク質装置として、ER-Mitochondria Encounter Structure が同定されていた。ERMES 複合体がもともとミトコンドリアの形態制御因子として同定されたことから、リン脂質輸送とミトコンドリアの構造維持機構が密接に関わることが強く示唆されていた。

また研究開始当初に私達が同定したミトコンドリアタンパク質 Ups1 が、最初に発見されたミトコンドリア内リン脂質輸送タンパク質であったことから、リン脂質に関する研究が急激に盛り上がりを見せている状況であった。

2. 研究の目的

本研究の大きな目的は、ミトコンドリア膜の主成分であるリン脂質の輸送機構の観点から、ミトコンドリアの構造と機能を維持する仕組みを理解することである。本研究では、まずその一步として、ミトコンドリア膜間部でリン脂質輸送を仲介する因子、Ups1 の機能メカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに Ups1 と遺伝学的に相互作用する因子を同定することで、新規リン脂質輸送因子を発見することが目的である。

3. 研究の方法

現在唯一同定されているミトコンドリア内リン脂質輸送因子である Ups1 の相互作用パートナーを、部位特異的光架橋反応により探索する。具体的には任意の部位に光架橋性非天然アミノ酸であるベンゾイルフェニルアラニン (BPA) を導入した Ups1 を酵母細胞内で発現させ、細胞に UV を照射することで Ups1 の近傍に存在するタンパク質と架橋させる。その後質量分析により、相互作用パートナータンパク質を同定する。また Synthetic genetic array (SGA) 解析により、Ups1

が欠損した際に、酵母細胞の増殖に必須となる遺伝子を決定することで、新規リン脂質輸送因子の同定を目指す。

4. 研究成果

BPA を導入した Ups1 を発現する酵母株を UV 照射することで、Ups1 の近傍にいるタンパク質との架橋反応を行ったが、架橋されたバンドを検出することができず、この方法では Ups1 の相互作用相手を検索することは難しいことが判明した。そこで、本研究では SGA 解析による遺伝学的手法により新規リン脂質輸送タンパク質の同定に注力した。Ups1 欠損株の増殖に重要な遺伝子をゲノムワイドに検索したところ、Ups1 と遺伝学的に相互作用する因子として、ミトコンドリア内膜に局在するタンパク質 X が同定された。タンパク質 X と Ups1 もしくはそのホモログタンパク質の Ups2 が同時に欠損した酵母株は、強い増殖阻害を示した (図 1)。また、その欠損がミトコンドリアのリン脂質異常を引き起こすことが知られている Mdm31 とそのホモログタンパク質 Mdm32 が欠損した際にも、タンパク質 X の機能が重要であることが示された (図 1)。

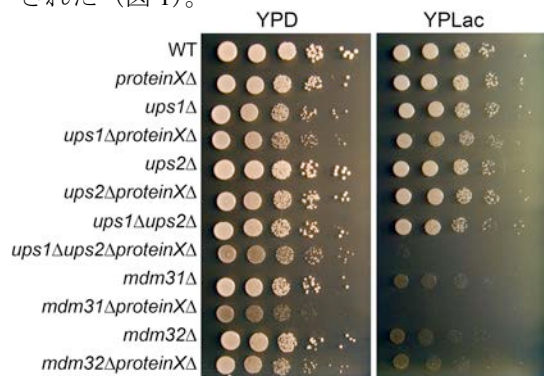


図 1 タンパク質 X は UPS タンパク質、Mdm31、Mdm32 欠損株の増殖に必要である。

タンパク質 X 欠損株がリン脂質生合成に関与するかを検討するために、タンパク質 X 欠損株からリン脂質を抽出し、その組成を調べた。その結果、タンパク質 X 欠損株では野生型に比べミトコンドリア特異的リン脂質カルジオリピンの量が減少することがわかった。また 14C-セリンを用いたパルスチェイス実験により、タンパク質 X がないと、小胞体からミトコンドリアへのリン脂質輸送速度が遅くなることが示された (図 2)。これらの結果はタンパク質 X がリン脂質輸送に関与する因子であることを示唆している。

Ups1 に光架橋性非天然アミノ酸である BPA を導入した架橋実験では、明瞭な架橋産物が得られなかったため、本研究では Ups1 と複合体を形成する Mdm35 に BPA を導入し、同様の実験を行った。その結果、興味深いことに、Mdm35 の 15, 25, 30, 56 番目のアミノ酸を BPA に置換した際に、架橋産物が得られる

ことがわかった(図3)。これらの架橋産物は、その分子量から既知の相互作用パートナーである Ups1 や Ups2 とは異なることがわかっている。今後はこの実験系を利用し、Ups-Mdm35 複合体と相互作用する因子の検索を引き続き行う予定である。

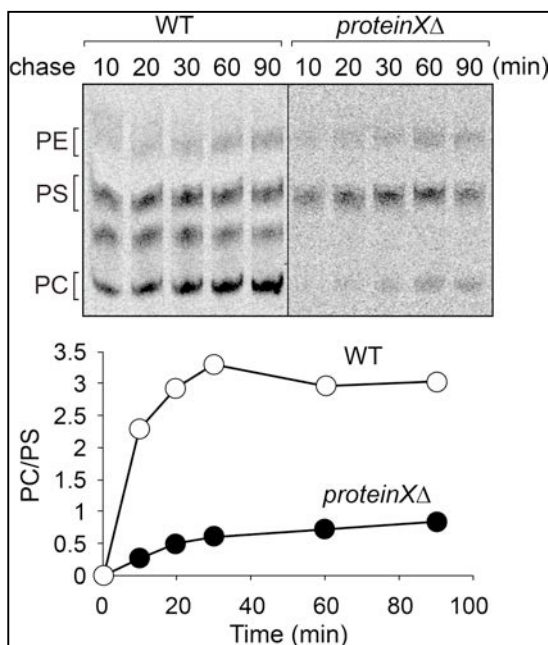


図2 14C-セリンを用いたパルスチェイス実験 14C-セリンはまず小胞体で合成されるホスファチジルセリン(PS)に取り込まれる。その後PSはミトコンドリアへと輸送され、ミトコンドリア内の酵素によってホスファチジルエタノールアミン(PE)に変換される。再びこのPEが小胞体に輸送され、メチル化されることによりホスファチジルコリン(PC)となる。すなわちPS→PE→PCの変換をモニターすることで小胞体、ミトコンドリア間のリン脂質輸送速度を計測することができる。

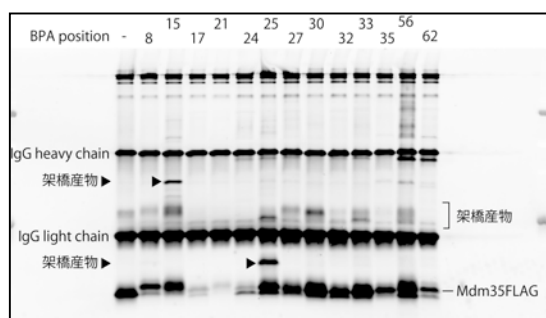


図3 BPAを部位特異的に導入したMdm35の光架橋実験

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4件)

1. Koyano F., Okatsu K., Kosako H., Tamura Y., Go E., Kimura M., Kimura Y., Tsuchiya H., Yoshihara H., Hirokawa T., Endo T., Fon EA., Trempe J., Saeki Y., Tanaka K. and Matsuda N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate Parkin. *Nature*, 510,162-166. doi: 10.1038/nature13392.
2. Song, J., Tamura Y., Yoshihisa T. and Endo T. (2014) A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex (2014) *EMBO Rep.*,15, 670-677. doi: 10.1002/embr.201338142.
3. Tamura Y. Sesaki H. and Endo T. (2014) Phospholipid transport via mitochondria. *Traffic*. 15, 933-945. doi: 10.1111/tra.12188.
4. Zhang Q., Tamura Y., Roy M., Adachi Y., Iijima M., Sesaki H.* (2014) Biosynthesis and Roles of Phospholipids in Mitochondrial Fusion, Division and Mitophagy. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3767-78. doi: 10.1007/s00018-014-1648-6.

[学会発表] (計3件)

1. 田村康, 試験管内リン脂質輸送反応アッセイ系の開発, 第66回日本細胞生物学会大会, 2014年6月12日, 奈良県新公会堂(奈良市)
2. Tamura Y. Phospholipid trafficking between mitochondria and the endoplasmic reticulum, 第87回日本生化学会, 2014年10月16日, 国立京都国際会館(京都市)
3. Tamura Y. Structural and Mechanistic Insights into phospholipid transfer via mitochondria, Progress 100: Kyushu-U and Stanford-U Joint Research and Education Program, First Symposium: From Genes to Human Diseases, 2015年3月17日, Centennial Hall, Kyushu University School of Medicine(福岡市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0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0件)

名称:

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

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 康 (TAMURA, Yasushi)
名古屋大学・物質科学国際研究センター・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