

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07354

研究課題名(和文) リン脂質のミトコンドリア内輸送に関する研究

研究課題名(英文) Intramitochondrial transport and metabolism of phospholipids

研究代表者

久下 理 (Kuge, Osamu)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：30177977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、細胞内のエネルギー(ATP)の大半を作る発電所であり、その機能障害は様々な疾患発症の原因となっている。ミトコンドリアの機能維持には、ミトコンドリアを囲む生体膜の主要構成成分であるリン脂質の種類と量の適切な維持、すなわち恒常性が必要である。本研究では、このリン脂質の恒常性に必要な、ミトコンドリア内リン脂質輸送に重要な役割を持つタンパク質として新たにUps2とポーリンを発見した。さらに、ミトコンドリアリン脂質の恒常性に関するが、その役割がこれまでよく理解されていなかったFmp30、Mdm31、及びMdm32タンパク質の具体的な機能の解明にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア内リン脂質輸送に関する因子としては、これまで唯一、Ups1-Mdm35複合体が知られているのみであった。従って、本研究でUps2及びポーリンが新たにミトコンドリア内リン脂質輸送に関する因子として同定されたことは基礎細胞生物学的に大変意義深い。また、ミトコンドリアリン脂質の恒常性の破綻は、様々な疾患発症の原因となっていることが知られており、この恒常性に関する因子(Ups2、ポーリン、Fmp30、Mdm31、及びMdm32)の本研究における機能解析は、医療・医薬の発展につながる研究としても意義深い。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are power plants that produces most of the intracellular energy (ATP), and their dysfunction is responsible for the onset of various diseases. Expression of mitochondrial functions requires proper maintenance i.e., homeostasis, of the type and amounts of mitochondrial phospholipids, which are the main components of mitochondrial membranes. In this study, we discovered Ups2 and porin as proteins that play an important role in mitochondrial phospholipid transport, which is necessary for the homeostasis of mitochondrial phospholipid. Furthermore, we succeeded in elucidating the specific roles of Fmp30, Mdm31, and Mdm32 proteins, which had been suggested to be involved in mitochondrial phospholipid homeostasis.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：リン脂質 代謝 輸送 ミトコンドリア ホスファチジルセリン ホスファチジルエタノールアミン
ホスファチジン酸 カルジオリピン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、酸化リン酸化による ATP 合成やアポトーシス、Ca²⁺シグナル、自然免疫応答の制御など様々な生理機能を持ち、その機能障害が五千人の出生者に 1 人の割合で起こるとされている。この障害による疾患発症の原因の一つは脂質代謝異常であり、ミトコンドリア特有のリン脂質であるカルジオリピン (CL) とその関連リン脂質の代謝遺伝子の変異が、バース症候群、DCMA 症候群、MEGDEL 症候群、Sengers 症候群、遺伝性痙性対麻痺など様々な疾患発症の原因となっている。しかし、ミトコンドリア内リン脂質の恒常性維持に必要な、リン脂質のミトコンドリア内輸送の機構は、研究開始当初よく理解されていなかった。

2. 研究の目的

哺乳動物と酵母のミトコンドリアには、ホスファチジン酸 (PA) からカルジオリピン (CL) を合成するために必要な一連の酵素群とホスファチジルセリン (PS) の脱炭酸によりホスファチジルエタノールアミン (PE) を合成する PS 脱炭酸酵素が存在する。しかし、ミトコンドリアは PA と PS を合成する能力が無く、またミトコンドリアのリン脂質代謝酵素の局在から、ミトコンドリアで CL と PE が合成されるためには、その合成原料となる PA あるいは PS がそれぞれ生合成された場所からミトコンドリア外膜に輸送され、さらにそれに引き続く外膜横断輸送と内膜への輸送や内膜横断輸送が必要である。本研究では、不明な点が多数のこされている、これらリン脂質輸送・代謝経路の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア PE 合成に関与する新規遺伝子の検索

ミトコンドリアで CL を合成する酵素の遺伝子 (*CRDI*)、あるいは PE を合成する *Psd1* の遺伝子 (*PSDI*) は、酵母において、それぞれ単独で欠損しても生育に大きな影響は及ぼさないが、その両者が欠損すると酵母は致死となる。そこで、ミトコンドリアの PE 合成に関与する遺伝子の候補を、その欠損が *CRDI* の欠損と合成致死あるいは合成増殖損傷となる遺伝子として検索した。その結果、その様な遺伝子として *UPS2* が同定された。

(2) 酵母リン脂質の分析

酵母を各種培養条件で [¹⁴C]セリン、あるいは [³²P]無機リン酸を用いて代謝標識した。酵母よりリン脂質を抽出後、その放射性リン脂質の組成を薄層クロマトグラフィーとイメージアナライザーにより分析した。

(3) リポソーム間のリン脂質 (PS) 転移 (トランスファー) 活性の測定

タンパク質の PS トランスファー活性は、蛍光リン脂質を用いた、蛍光デクエンチング法により測定した。ドナーリポソーム (12.5 μM: phosphatidylcholine (PC)/PE/Rhod-PE/NBD-PS = 50:40:2:8) とアクセプターリポソーム (50 μM: PC/PE/CL = 50:40:10) を 2 ml の緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) 中、活性測定タンパク質の有無で、保温 (25°C) し、NBD の蛍光を測定した。

4. 研究成果

(1) ホスファチジルセリン (PS) のミトコンドリア内輸送に関する研究 (発表雑誌論文④)

我々は、酵母のミトコンドリア内 PS 代謝に関与する新規因子の同定を遺伝学的手法で試みた。その結果、*UPS2* 遺伝子の欠損によりミトコンドリア内膜に局在する PS 脱炭酸酵素 (*Psd1*) による PS の PE への変換が低下することを見出した (図 1A)。この時、*in vitro* で測定した PS 脱炭酸酵素の活性自身は、*UPS2* 欠損変異株と親株の間で変化はなかった。さらに、*UPS2* 遺伝子の過剰発現により、PS の PE への変換速度が上昇した (図 1B)。*UPS2* 遺伝子がコードする U_{ps}2 タンパク質は、ミトコンドリアの外膜と内膜の膜間スペースで Mdm35 タンパク質と複合体を形成して存在することが知られていた。従って、この複合体が PS の外膜から内膜への輸送を行うことにより、*Psd1* による PE 合成を促進している可能性が考えられた。そこで、U_{ps}2-Mdm35 融合タンパク質を大腸菌で産生・精製し、そのリン脂質輸送活性を試験管内で測定した。その結果、同融合タンパク質が、リポソーム間の PS 輸送を促進することが判明した (図 2)。

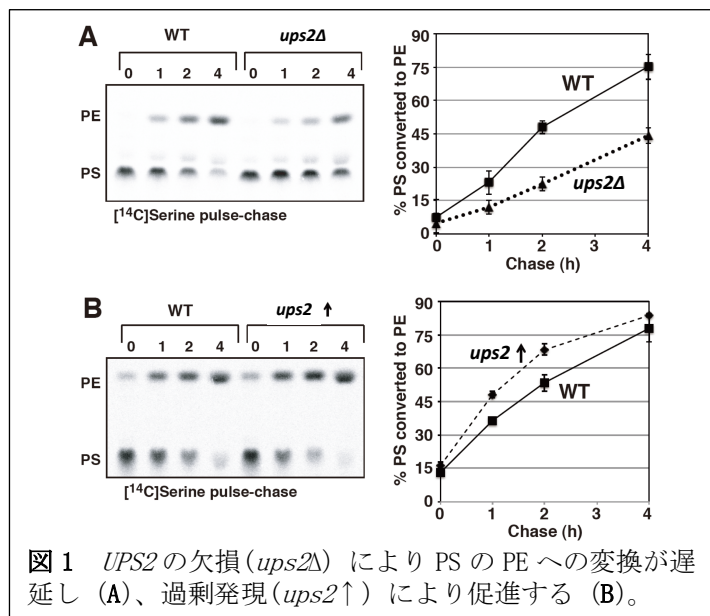


図 1 *UPS2* の欠損 (*ups2Δ*) により PS の PE への変換が遅延し (A)、過剰発現 (*ups2↑*) により促進する (B)。

また興味深いことに、Ups2-Mdm35 複合体が、ダイオキシシフトと呼ばれる環境変化時特異的に発現誘導され、PS 脱炭酸による PE の合成を促進することを見出した(図 3)。ダイオキシシフトとは、エネルギー代謝を解糖系主体からミトコンドリアでの酸化的リン酸化主体へと切り替える代謝状態の遷移である。出芽酵母は、グルコースを炭素源として生育する際、まず解糖系のみによって ATP を産生し速やかに増殖する(対数増殖期)。その後、グルコースが枯渇するとダイオキシシフトを経て、グルコース由来のエタノール及びミトコンドリア呼吸による酸化的リン酸化に依存した ATP 産生を行ない、ゆっくりと増殖し(ポスト対数増殖期、あるいはポストダイオキシシフト期)、最終的に増殖を停止する(静止期)。これらのことから Ups2-Mdm35 複合体による PS 輸送は、酵母の培養条件により、呼吸活性が上昇したミトコンドリア内で活発となり、呼吸活性の低いミトコンドリア内ではあまり機能していないことも示唆された。

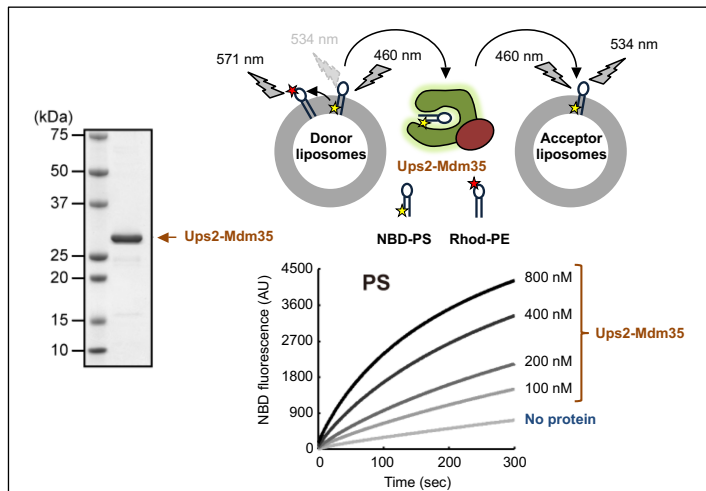


図 2 Ups2-Mdm35 融合タンパク質は、PS のリポソーム間輸送を促進する

呼吸活性の低いミトコンドリア内ではあまり機能していないことも示唆された。

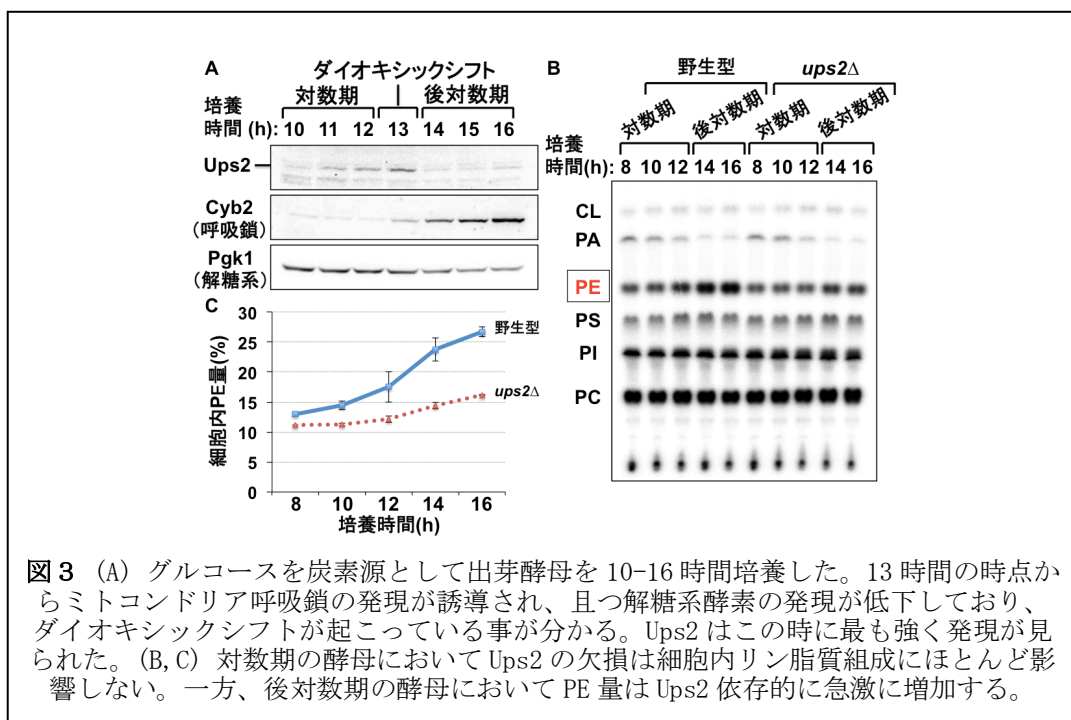


図 3 (A) グルコースを炭素源として出芽酵母を 10-16 時間培養した。13 時間の時点からミトコンドリア呼吸鎖の発現が誘導され、且つ解糖系酵素の発現が低下しており、ダイオキシシフトが起こっている事が分かる。Ups2 はこの時に最も強く発現が見られた。(B, C) 対数期の酵母において Ups2 の欠損は細胞内リン脂質組成にほとんど影響しない。一方、後対数期の酵母において PE 量は Ups2 依存的に急激に増加する。

(2) Ups1 に依存しないカルジオリピンの新規合成経路に関する研究 (発表雑誌論文②)

酵母のミトコンドリア外膜から内膜への PA 輸送には、哺乳動物にも保存された Ups1-Mdm35 複合体が関与することが知られていた。また上で述べたように、我々は、Ups2-Mdm31 複合体が PS をミトコンドリア外膜から内膜へ輸送できることを明らかにした。しかしながら、酵母ではこれら複合体が欠損してもミトコンドリア内膜で CL と PE が合成されるため、これら複合体に依存しない PA と PS の輸送経路が存在すると考えられていた。また不思議なことに、Ups1 に依存しない CL 合成が Ups2 の欠損により亢進することも知られていた。我々は、Ups1 非依存の CL 合成が、Ups2 の欠損のみでなく、ミトコンドリアにおける PE 合成に関与する PS 脱炭酸酵素 (Psd1) の欠損や PS 合成酵素の欠損でも亢進することを見出した。さらに、Ups2 の欠損による Ups1 非依存 CL 合成の亢進が、PS 合成酵素と PS 脱炭酸酵素の過剰発現による PE レベルの増加でキャンセルされることも見出した。これらのことから、Ups1 非依存 CL 合成がミトコンドリアの PE レベルにより制御されていることを明らかにした。さらに、この Ups1 非依存 CL 合成に、ミトコンドリア内膜タンパク質である Fmp30、Mdm31、及び Mdm32 が必要であることも明らかにした。

(3) ミトコンドリアのリン脂質代謝におけるポーリンの機能に関する研究 (発表雑誌論文①)

Ups1 非依存 CL 合成経路における Mdm31 と Mdm32 の役割を明らかにする目的で、これらタンパク質と相互作用するタンパク質を共免疫沈降法で検索した。その結果、ミトコンドリア外膜タン

パク質の Por1 が Mdm31 に結合する主要タンパク質として同定された。さらに驚いたことに、Por1 が Mdm35 と結合することも判明した。Por1 は、ミトコンドリア外膜で最も豊富で機能が良く解析され、進化的にも良く保存されたチャネルタンパク質のポーリンの一つであり、酵母にはそのホモログの Por2 も存在する。Por1 と Por2 の枯渇は、Ups1 と Ups2 のタンパク質レベルの著しい低下、CL レベルの約 90% の低下、及び Ups2 に依存したミトコンドリアでの PE 合成の欠損を導いた。一方、Ups2 に非依存的なミトコンドリアにおける PE 合成は、Por1/2 欠損により影響を受けなかった。さらに、Por1 の点変異で、Por1 の Mdm31 および Mdm35 との相互作用を低下させるが、非発酵性培地中での細胞増殖に関する Por1 の機能には影響しない点変異が、CL レベルを低下させることも明らかにした。また、ヒトの培養細胞である HeLa 細胞を用い、哺乳動物のポーリン (VDACs) もミトコンドリアの CL 代謝に関与することも明らかにした。これらのことより、酵母のポーリンは、ミトコンドリアのリン脂質代謝に関して特異的で重要な機能を持ち、ポーリンが関与する CL 代謝の制御は進化的に保存されていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Miyata N, Fujii S, Kuge O.
Porin proteins have critical functions in mitochondrial phospholipid metabolism in yeast.
J Biol Chem. 2018 Nov 9;293(45):17593-17605. (査読有) doi: 10.1074/jbc.RA118.005410.
- ② Miyata N, Kuge O.
Fmp30, Mdm31, and Mdm32 function in Ups1-independent cardiolipin accumulation under low phosphatidylethanolamine conditions.
Contact 2018 Vol. 1: 1-3. (査読有) doi: 1177/2515256418764043
- ③ Miyata N, Goda N, Matsuo K, Hoketsu T, Kuge O.
Cooperative function of Fmp30, Mdm31, and Mdm32 in Ups1-independent cardiolipin accumulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Sci Rep. 2017 Nov 27;7(1):16447. (査読有) doi: 10.1038/s41598-017-16661-2.
- ④ Miyata N, Watanabe Y, Tamura Y, Endo T, Kuge O.
Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria.
J Cell Biol. 2016 Jul 4;214(1):77-88. (査読有) doi: 10.1083/jcb.201601082.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 藤井悟、宮田暖、久下理
ホスファチジルセリンのミトコンドリア外膜・内膜への輸送に関与する新規酵母遺伝子の同定 (招待講演) 第 91 回日本生化学会大会 (2018)
- ② Miyata N, Kuge O.
Novel functions of porin proteins in mitochondrial phospholipid metabolism.
International conference on the bioscience of lipids (2018)
- ③ 藤井悟、宮田暖、久下理
小胞体からミトコンドリア内膜へのリン脂質輸送に関与する新規因子の探索
第 60 回日本脂質生化学会 (2018)
- ④ 久下理、宮田暖
ミトコンドリア内リン脂質輸送と生合成 (招待講演)
生命科学系学会合同年次大会 (第 91 回日本生化学会大会) (2017)
- ⑤ 宮田暖、久下理
新規ミトコンドリア内リン脂質輸送因子の同定
生命科学系学会合同年次大会 (第 91 回日本生化学会大会) (2017)
- ⑥ 合田尚人、宮田暖、法華津雄士、松尾慶次、久下理
Ups1 非依存経路によるカルジオリピンの合成と蓄積
生命科学系学会合同年次大会 (第 91 回日本生化学会大会) (2017)
- ⑦ Kuge O. Miyata N
Intramitochondrial transport of phosphatidylserine by Ups2-Mdm31 (招待講演)
第 89 回日本生化学会大会 (2016)

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 宮田 暖

ローマ字氏名: (MIYATA, non)