

平成22年 5月21日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590068

研究課題名（和文）リン脂質の代謝調節と細胞内輸送機構に関する研究

研究課題名（英文）Study on metabolic control and intracellular transport of phospholipids

研究代表者

久下 理（KUGE OSAMU）

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：30177977

研究成果の概要（和文）：リン脂質の代謝調節と細胞内輸送は、真核生物の生体膜の構築に必須の反応である。真核生物の主要リン脂質の一つであるホスファチジルセリン（PS）は、小胞体で合成され、その多くはミトコンドリアに輸送される。本研究では、PSの代謝調節機構を明らかにする目的でヒトPS合成酵素1と2の精製に成功した。また、PSのミトコンドリアへの輸送に関与する可能性が示唆されたタンパク質（Mitocoilと命名）がミトコンドリアの形態維持に機能していることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Metabolic control and intracellular transport of phospholipids are essential events for membrane biogenesis in eukaryotes. The synthesis of phosphatidylserine (PS), one of major phospholipids in mammalian cells, occurs in the endoplasmic reticulum, and many of nascent PS are transported into mitochondria. In this study, to elucidate regulatory mechanisms of PS biosynthesis we purified human PS synthase 1 and 2. Furthermore, we showed that a mitochondrial protein (designated as mitocoil), which is suggested to be involved in PS transport into mitochondria, regulates mitochondrial morphology

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生体膜、リン脂質、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

それぞれ独自の機能を有する形質膜や細胞内の各オルガネラ膜がどのような機構で形成・維持されているのかを明らかにすること

は、現代生命科学の最も重要な研究課題の一つと考えられる。リン脂質はそれら生体膜の主要構成成分の一つであり、各生体膜は、種々のリン脂質分子を固有の組成で有し、そ

の組成を維持している。また、大部分のリン脂質は、小胞体膜などごく限られたオルガネラ膜でしか合成されないため、生体膜の形成にはリン脂質分子の生体膜間での輸送が必要である。従って、各生体膜の形成機構の解明には、各リン脂質分子の代謝調節機構と細胞内輸送機構を明らかにすることが必須と思われる。しかし現在、リン脂質代謝反応経路は明らかにされているものの、リン脂質の「代謝調節」と「輸送」は全く不明と言っても過言ではなく、これら「代謝調節」と「輸送」の解明を本研究の目的とした。以下に具体的な研究目的を述べる。

## 2. 研究の目的

### (1) ホスファチジルセリンの代謝調節に関する研究

ホスファチジルセリン (PS) は、動物細胞の全リン脂質の約 5% を構成する量的には比較的少ないリン脂質であるが、様々なタンパク質の活性を制御し細胞増殖に必須な生理的に重要なリン脂質の一つである。我々は以前、動物細胞における PS 合成が PS によるフィードバック制御を受けることを見だし、動物培養細胞変異株を用いた研究により、同フィードバック制御が破綻すると細胞内 PS レベルが著しく増加することを明らかにした。従って、PS による PS 合成のフィードバック制御は、細胞内 PS レベルの恒常性維持 (ホメオスタシス) に鍵となる反応である。しかしながら現在、このフィードバック制御が PS による PS 合成酵素の活性阻害を基盤としていることが明らかにされているものの、その詳細な分子機構は不明である。そこで本研究では、ヒトの PS 合成酵素 1 と 2 をそれぞれ精製し、精製酵素を用いた解析により酵素活性制御機構を明らかにすることを目的とした。

### (2) PS のミトコンドリアへの輸送とミトコンドリアの形態維持に関する研究

哺乳動物細胞において、PS は小胞体で合成され、その多くがミトコンドリア内膜に輸送されミトコンドリア内膜酵素である PS 脱炭酸酵素によりホスファチジルエタノールアミン (PE) へと変換される。この PS 脱炭酸経路は動物細胞において、細胞膜や細胞内の各オルガネラ膜の PE レベルを正常に保つために必須の経路であり、それら生体膜の機能発現に密接にかかわっているものと考えられる。しかしながら現在、この経路に関わるリン脂質合成酵素に関しては多くのことが明らかにされているものの、PS の小胞体からミトコンドリアへの輸送機構、及びミトコンドリア外膜から内膜への輸送機構はほとんど理解されていない。これまでの国内外の研究により、PS の小胞体からミトコンドリア

内膜への輸送には、ATP が必要であり、ミトコンドリアと接触している小胞体のサブコンパートメント (MAM, Mitochondria Associated Membrane) とミトコンドリア外膜と内膜の接触領域が関与していることが推定されているが、この PS 輸送に必要な遺伝子あるいは遺伝子産物に関する知見は殆どない。我々はこれまでに、セミインタクト細胞を用い、輸送に依存した PS の脱炭酸を促進するタンパク質性因子が細胞質に複数存在することを見出した。さらにその因子の一つを牛脳より精製することに成功した。精製タンパク質は、既知のカルシウム結合タンパク質、S100B であることが判明し、また大腸菌で発現、精製した組み換え型 S100B タンパク質は、セミインタクト細胞において輸送に依存した PS 脱炭酸を著しく促進することを明らかにした。これらの結果と S100B タンパク質が PS 脱炭酸酵素活性を有さないことから、S100B タンパク質は PS 輸送を促進する分子と考えられた。また、我々は、S100B タンパク質に結合する機能未知のミトコンドリアタンパク質を見いだしていた。このタンパク質 (ATAD3A) は、そのアミノ酸配列から ATPase 活性を持つことが予測され、S100B との相互作用を介して PS のミトコンドリアへの輸送を制御する可能性が考えられた。本研究では、これらの知見を基盤とし、PS の小胞体からミトコンドリアへの輸送に関与する新規な因子を同定し、それら因子の解析から PS 輸送の分子機構と脂質輸送とミトコンドリアの形態・機能維持との関連を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ホスファチジルセリンの代謝調節に関する研究

#### ① PS 合成酵素 1 と 2 の精製

ヒト PS 合成酵素 1 と 2 の cDNA を HeLa cDNA ライブラリーを鋳型に用いた PCR 法により分離した。得られた cDNA を用い、HeLa 細胞において FLAG タグと HA タグを付加した PS 合成酵素 1 と 2 を過剰産生させた。これらタンパク質をタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

#### ② PS 合成酵素活性の測定

酵素を 0.1 ml の [<sup>14</sup>C]セリンを含む反応液中、37 ° C, 30 min インキュベーションし、脂質に取り込まれた放射活性を測定した。

### (2) PS のミトコンドリアへの輸送とミトコンドリアの形態維持に関する研究

① ATAD3A と相互作用するタンパク質の同定は、酵母ツーハイブリッド法により行った。

② ミトコンドリアの形態観察は、抗 Hsp60 抗体を用いた間接蛍光抗体法により行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ホスファチジルセリンの代謝調節に関する研究

酵素の精製は、酵素の触媒・調節機構を明らかにするうえで極めて重要なステップである。本研究では、酵素活性を有する哺乳動物細胞の PS 合成酵素 1 (ヒト PS 合成酵素 1) を世界で初めてほぼ純粋なタンパク質として分離・精製することに成功した。また、我々は以前、チャイニーズ・ハムスターの PS 合成酵素 2 の精製に成功していたが、今回ヒトの PS 合成酵素 2 の精製にも成功した。

精製タンパク質の基質特異性を調べたところ、PS 合成酵素 1 は、ホスファチジルコリン (PC) と PE を基質とし、これらリン脂質を PS に変換することが示された。一方、生細胞を用いた我々の過去の実験結果から、細胞内の PS 合成酵素 1 は PE を基質に用いることができずに PC のみを PS に変換することが示されている。従って、細胞内では PS 合成酵素 1 への基質 (PE) の供給が制御されていることが示唆された。精製した PS 合成酵素 2 は PC を基質とせずに PE を選択的に PS に変換することが示された。この PS 合成酵素 2 の基質特異性は生細胞で調べた結果と一致した。

PS 合成酵素 1 と 2 に対する PS の阻害効果を調べた。その結果、外因性の PS (0.1 mM) は精製前の膜画分に存在する PS 合成酵素 1 の活性を著しく阻害するのに対し、精製した PS 合成酵素 1 の活性を全く阻害しないことが判明した。一方、PS 合成酵素 2 は、未精製酵素、精製酵素ともに 0.1 mM の PS でその活性が著しく阻害された。これらの結果から、PS による PS 合成酵素 1 と 2 の活性制御機構が互いに異なる可能性が示唆された。また、PS による PS 合成酵素 1 の活性制御には未知の仲介因子が存在する可能性も示唆され、今後、この可能性の検討が重要な研究課題となった。

##### (2) PS のミトコンドリアへの輸送とミトコンドリアの形態維持に関する研究

ATAD3A が PS のミトコンドリア内膜への輸送に関与する可能性を調べる目的で、siRNA の導入による ATAD3A の発現抑制を行った。その結果、ATAD3A 特異的 siRNA を導入した HeLa 細胞では、PS の脱炭酸による PE 合成が低下していることが判明し、同タンパク質が PS 輸送に関与することが示唆された。

酵母ツーハイブリッド法により、ATAD3A と相互作用するタンパク質の候補を 12 種類見いだした。本研究ではそのうちの一つであり、Mitocoil と名付けたタンパク質の解析を行った。Mitocoil は、NCBI データベースにおいて 106 アミノ酸残基からなるミトコンドリア膜タンパク質として登録されていた。そこ

でミトコンドリアに局在することを確認する目的で C 末端に HA タグを付加した mitocoil (mitocoil-HA) を HeLa 細胞において発現させその局在を免疫蛍光顕微鏡による観察と細胞分画により調べた。その結果、いずれの方法においても mitocoil がミトコンドリアタンパク質であることを確認できた。また、種々の条件で処理したミトコンドリア膜を用い、mitocoil が膜内存在性タンパク質であることも確認した。

大変興味深いことに、mitocoil を過剰発現するとミトコンドリアの形態が異常になることが判明した。HeLa 細胞に mitocoil を一過性に過剰発現させた場合、ミトコンドリアが通常の互いにつながったチューブ状の構造から断片化した構造に変化することが判明した。この形態変化を定量的に解析したところ、mitocoil を過剰発現している細胞の約 80% が異常な断片化したミトコンドリアの形態を示した。この形態異常はミトコンドリア特異的であり、mitocoil の過剰発現は小胞体の構造には大きな影響を及ぼさなかった。

次に mitocoil を標的とした siRNA の導入による mitocoil 発現抑制のミトコンドリアの形態に対する効果を調べた。その結果、mitocoil 特異的 siRNA を導入した HeLa 細胞では、ミトコンドリアが異常に長く枝分かれの少ない形態を示すことが判明した。この形態変化も定量的に解析したところ、mitocoil 特異的 siRNA を導入した細胞の約 70% が異常に長いミトコンドリアの形態を示した。この形態異常もミトコンドリア特異的であり、mitocoil 発現抑制は小胞体の構造には大きな影響を及ぼさなかった。

このように、mitocoil を過剰に産生するとミトコンドリアが断片化し、逆に mitocoil の発現を抑制するとミトコンドリアが長いチューブ状になることが判明した。従って、mitocoil は、ミトコンドリアの分裂を促進するか、あるいはミトコンドリアの融合を阻害することによりミトコンドリアの形態を調節していることが明らかにされた。また、mitocoil が PS 輸送に関与する ATAD3A と相互作用することが酵母ツーハイブリッド法により示されたことから、ミトコンドリアの形態維持と PS 輸送が密接に関与する可能性も示唆された。

#### 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 5 件)

(1) Gilquin, B., Taillebourg, E., Cherradi, N., Hubstenberger, A., Gay, O., Merle, N., Assard, N., Fauvarque, M.-O., Tomohiro, S., Kuge, O., and Baudier, J. The AAA+ ATPase

ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. *Mol. Cell Biol.* 30, 1984-1996 (2010) 査読有り

(2) Kuroda, T., Tani, M., Moriguchi, A., Tokunaga, S., Higuchi, T., Kitada, S., and Kuge, O. Identification of a novel gene involved in cardiolipin metabolism and mitochondrial morphology in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemistry and Physics of Lipids* 160, Supplement, pp.29 (2009) 査読無し

(3) Tani, M. and Kuge, O. Sphingomyelin synthase 2 is palmitoylated at the COOH-terminal tail, which is involved in its localization in plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 328-332 (2009) 査読有り

(4) Tomohiro, S., Kawaguti, A., Kawabe, Y., Kitada, S., and Kuge, O. Purification and characterization of human phosphatidylserine synthases 1 and 2 *Biochem. J.* 418, 421-429 (2009) 査読有り

(5) 久下 理 ホスファチジルセリンの代謝調節とオルガネラ間輸送 オレオサイエンス 第9巻 455-464 (2009) 査読有り

[学会発表] (計 21 件)

(1) 久下 理 カルジオリピン代謝に関する新しい酵母遺伝子の同定と機能解析 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日 神戸 招待講演

(2) KUGE, O. Identification of novel genes involved in the phospholipid transport or metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators. 2009 May 27 Tokyo Invited

(3) 久下 理 リン脂質代謝・細胞内輸送に関する新しい酵母遺伝子の検索と性状解析 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 10 日 神戸 招待講演

(4) 久下 理 リン脂質代謝・輸送に関する酵母新規遺伝子の検索と性状解析 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 2007 年 12 月 横浜 招待講演

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久下 理 (KUGE OSAMU)

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：30177977

### (2) 研究分担者 (2007 年度)

北田 栄 (KITADA SAKAE)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：20284482

### (3) 連携研究者 (2008-2009 年度)

北田 栄 (KITADA SAKAE)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：20284482