

令和 5 年 4 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03226

研究課題名(和文) ミトコンドリア形成に関与するリン脂質の輸送と代謝、及びその損傷による病態の解明

研究課題名(英文) Intracellular transport and metabolism of phospholipids involved in mitochondrial formation, and elucidation of pathological conditions caused by their damage

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、その機能の損傷が様々な疾患の原因となる細胞内の構造物の一つであり、その形成と機能維持機構の解明は現代細胞生物学の最も重要な研究課題の一つである。本研究では、ミトコンドリアの構成成分の一つであるリン脂質、ホスファチジルエタノールアミン(PE)の代謝調節と機能の解明を試みた。その結果、ミトコンドリアと小胞体の両者に局在し、PEを合成するホスファチジルセリン脱炭酸酵素の局在と活性制御機構を明らかにした。さらに、この酵素によるPE合成がある種のタンパク質リン酸化酵素を負に制御しており、その制御が破綻するとミトコンドリアにおけるATP合成や細胞周期に異常が起こることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホスファチジルセリン脱炭酸酵素は、従来、ミトコンドリアにのみ存在するものと考えられていたが、最近その極一部が小胞体にも存在することが明らかにされた酵素である。従って、本研究によるこの少量の小胞体型酵素の重要性と局在制御機構の解明は、酵素の細胞内局在と分布の再検討の必要性という観点から、細胞生物学に大きな影響を与えるものである。また、ミトコンドリアPEが細胞周期制御において重要な役割を持つことが本研究により明らかにされたことから、癌など細胞周期が異常となった細胞におけるPE代謝の研究が、医療・医薬品開発に重要であることが再認識された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are one of the intracellular structures whose functional impairment causes various diseases, and elucidation of their formation and maintenance is one of the most important research topics in modern cell biology. In this study, we attempted to elucidate the metabolism and function of phosphatidylethanolamine (PE), a phospholipid that is one of the constituents of mitochondria. As a result, we clarified the molecular mechanisms underlying control of localization and activity of phosphatidylserine decarboxylase, which synthesizes PE and is localized in both mitochondria and endoplasmic reticulum. In addition, we clarified that PE synthesis by this enzyme negatively regulates certain protein kinases, and that disruption of this regulation causes abnormalities in mitochondrial ATP synthesis and the cell cycle.

研究分野：脂質生物化学

キーワード：リン脂質 細胞内輸送 代謝調節 ミトコンドリア 小胞体

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、アポトーシスや Ca^{2+} シグナルの制御、多様な生体内分子の生合成など様々な生理機能を持つオルガネラであり、その形成と機能維持機構の解明は現代細胞生物学の最も重要な研究課題の一つである。ミトコンドリアは、外膜と内膜の二重の生体膜で囲まれ、それら生体膜は、ホスファチジルエタノールアミン (PE) とミトコンドリア固有のリン脂質であるカルジオリピン (CL) に富む特徴的なリン脂質組成を示す。PE と CL は、平坦な脂質二重層膜構造をとりにくい円錐型のリン脂質であり、これらリン脂質が、ミトコンドリア外膜と内膜のコンタクトサイトや内膜のクリステ構造の形成に関与していると考えられている。従って、PE と CL は、ミトコンドリアの機能発現や構造維持に重要な役割を担うリン脂質であり、その代謝の破綻がミトコンドリアの機能障害や疾病の原因となると考えられる。実際に、CL とその関連リン脂質の代謝遺伝子の変異が、Barth syndrome、DCMA syndrome、MEGDEL syndrome、Sengers syndrome、遺伝性痙性対麻痺などのミトコンドリア機能障害による様々な疾患発症の原因となっている。しかしながら、PE と CL の生合成調節機構や細胞内輸送機構はよく理解されておらず、その生理機能にも不明な点が存在した。

2. 研究の目的

(1) ミトコンドリアの形成に関与するリン脂質の輸送・代謝機構の解明

小胞体とミトコンドリアは、リン脂質合成の主要な場であり、細胞内リン脂質の恒常性維持において重要な役割を有している。出芽酵母のホスファチジルセリン (PS) 脱炭酸酵素 Psd1 は、PS の脱炭酸により PE を合成する酵素であり、細胞内の PE 合成に大きく寄与している。Psd1 は主にミトコンドリア内膜に局在しているが、近年、その極一部が小胞体にも局在することが報告され、小胞体とミトコンドリアにおける PS 代謝の再検討が必要となっていた。そこで本研究では、Psd1 の細胞内局在と活性の制御機構の解明を目的の一つとした。

(2) ミトコンドリアリン脂質の環境変化時特異的機能の解明

我々は、生物種間で高度に保存された出芽酵母のミトコンドリア膜間腔タンパク質 Ups2 (ヒト: PRELID3b) 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 のミトコンドリア内膜への輸送を活性化し、PS 脱炭酸による PE の合成を促進することを明らかにしていた。そこで、このダイオキシシフト時特異的 PE 合成促進の生理的意義解明も研究目的の一つとした。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリアの形成に関与するリン脂質の輸送・代謝機構の解明

Psd1 の細胞内局在と活性の制御機構の解明を目的に、Psd1 を介した PE 合成経路に関与する酵母の新規遺伝子の探索・同定とその機能解析を行った。

(2) ミトコンドリアリン脂質の環境変化時特異的機能の解明

ダイオキシシフト時特異的 PE 合成促進の生理的意義の解明を目的に、この PE 合成促進に損傷を持つ酵母と野生型酵母のダイオキシシフト時における遺伝子発現プロファイルを比較し、その発現に顕著な違いを示す遺伝子を同定した。さらに、これら遺伝子及びその関連遺伝子の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアの形成に関与するリン脂質の輸送・代謝機構の解明

酵母の PE 合成経路には 3 つの経路、すなわち Psd1 介した経路、Psd1 とは異なるもう一つの PS 脱炭酸酵素である Psd2 を介した経路、及びエタノールアミンを用いるケネディ経路があり、これら経路のいずれかが正常に機能すれば酵母は増殖可能である。そこで、Psd1 を介した PE 合成経路に関与する酵母新規遺伝子を、エタノールアミン (Etn) を含まない培地においてその欠損が Psd2 遺伝子との二重欠損により増殖損傷となり、その損傷が Etn でレスキューされる遺伝子として探索した。その結果、小胞体膜タンパク質 Ice2 の遺伝子がそのような目的遺伝子として同定された。さらに放射性セリンを用いた代謝標識実験により、Ice2 が実際に Psd1 による PE 合成に関与し、Psd2 欠損株に Ice2 欠損変異を導入すると PS 脱炭酸による PE 合成が低下することを見出した。加えて、抗 Psd1 抗体を用いたイムノブロッティングにより Ice2 が欠損すると、野生株や Psd2 欠損株においてミトコンドリアと小胞体の両者の Psd1 タンパク質の量が減少することも見出した。

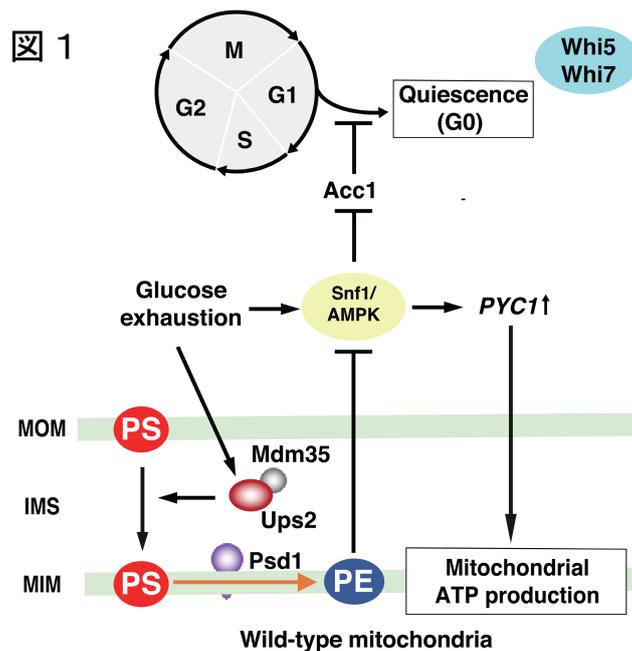
Ice2 は、ごく最近、ホスファチジン酸 (PA) ホスファターゼ Pah1 の活性化因子 Nem1/Spo7 を抑制することで、Pah1 活性を負に制御することが報告されていた。すなわち、Ice2 が欠損すると Pah1 が活性化され、小胞体の PA レベルが低下するものと考えられていた。そこで、この PA レベルの低下と Psd1 の量と活性の低下が関連するかを検討した。この目的で、Ice2/Psd2 二重欠損株において、Nem1 欠損変異を導入し Pah1 活性化の抑制により小胞体 PA レベルを回復させたところ、増殖損傷の緩和、Psd1 による PE 合成の回復、及び、小胞体局在型 Psd1 とミトコンドリア局在型 Psd1 の両者の量の回復が観察された。

次に、小胞体局在型とミトコンドリア局在型 Psd1 の減少のどちらが酵母の表現型に重要かを検討するため、ミトコンドリアあるいは ER に特異的に局在する組み換え型 Psd1 (rPsd1M と rPsd1ER) を Ice2/Psd2 二重欠損酵母で発現させ、その増殖と PE 合成の損傷に対する影響

を調べた。その結果、rPsd1M と異なり、rPsd1ER が効率良く Ice2/Psd2 二重欠損酵母の増殖と PE 合成の損傷を回復させた。また、PA レベルの減少は *PSD1* 遺伝子の転写活性や Psd1 の安定性に影響しないことが判明したが、その一方で大変興味深いことに、Psd1 タンパク質が PA に結合することが、リン脂質固定膜とリポソームを用いた 2 種類の脂質結合実験により示された。これらの結果より、小胞体型 Psd1 は、その量がミトコンドリア型 Psd1 に比べ極僅かであるが、PE 合成に大きく寄与し、その存在量は、Ice2、Nem1/Spo7、及び Pah1 によって量が調節される小胞体 PA と Psd1 との結合によって制御されていることが示唆された。さらに我々は、小胞体とミトコンドリアの Psd1 の正常量維持に、E3 リガーゼ Hrd1 を介した小胞体関連分解、シャペロン Djp1 のミトコンドリアへのタンパク質輸送促進、及び Opi1 転写抑制因子も関与することを明らかにした。

(2) ミトコンドリアリン脂質の環境変化時特異的機能の解明

Ups2 欠損によってミトコンドリアにおける PE 合成が低下した出芽酵母では、グルコース枯渇時に細胞エネルギーセンサーである Snf1 (哺乳動物 AMPK) の過剰活性化が引き起こされ、これに起因して異常なミトコンドリア ATP 産生の増加と静止期 (G0) 細胞への分化促進が導かれることを見出した。また、脂質-タンパク質オーバーレイアッセイにより、Snf1 と PE が結合することも見出した。これらのことより、ミトコンドリア PE は、Snf1 との物理的相互作用を介して Snf1 の活性を制御していると考えられた。さらに、Snf1 によって制御される下流因子のうち、グルコース枯渇時の酵母におけるミトコンドリア ATP 産生や G0 細胞分化に直接影響する因子を探索した。その結果、野生型酵母において、ピルビン酸カルボキシラーゼ Pyc1 を発現上昇させるとグルコース枯渇時のミトコンドリア ATP 産生の増加が見られた。また、アシル-CoA カルボキシラーゼ Acc1 の発現抑制は G0 細胞分化を促進させた。これらのことより、Snf1 はグルコース枯渇時において活性化され、Pyc1 の発現上昇させることでミトコンドリア ATP 産生を、Acc1 の抑制によって G0 細胞分化を促進することが示唆された (図 1)。



ミトコンドリア PE 合成と細胞周期制御の関連性をさらに解析することを目的に、G1-S 期進行の中心的制御因子である Whi5、Whi7 と Ups2 の三重欠損酵母を樹立した。その結果、Ups2 欠損酵母、Whi5Whi7 二重欠損酵母は正常に生育するのに対し、Ups2Whi5Whi7 三重欠損酵母は強い生育損傷を示すことを発見した。また、この出芽酵母において見られた合成生育損傷と一致して、Whi5、Whi7 のヒトオルソログであるがん抑制遺伝子 RB1 を欠損した乳がん細胞において Ups2 のヒトホモログ PRELID3b を発現抑制すると増殖の抑制が観察された。さらに、RB1 を発現する乳がん細胞において RB1 と PRELID3b を同時発現抑制すると、合成生育損傷を示した。このことより、ミトコンドリア PE 合成経路は、RB1 を欠損したがん細胞に対する新規抗がん剤開発の標的となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyata Non, Ito Takanori, Nakashima Miyu, Fujii Satoru, Kuge Osamu	4. 巻 36
2. 論文標題 Mitochondrial phosphatidylethanolamine synthesis affects mitochondrial energy metabolism and quiescence entry through attenuation of Snf1/AMPK signaling in yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202101600RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Non Miyata and OsamuKuge	4. 巻 30
2. 論文標題 Topology of phosphatidylserine synthase 1 in the endoplasmic reticulum membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 2346-2353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.4182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中稔也、三浦宗太郎、藤井悟、宮田暖、久下理
2. 発表標題 ERMESを介した小胞体ーミトコンドリア間PS輸送のin vivo評価系の確立
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井悟、宮田暖、久下理
2. 発表標題 出芽酵母ホスファチジルセリン脱炭酸酵素Psd1の小胞体とミトコンドリアへの局在制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田暖、伊藤貴紀、久下理
2. 発表標題 ミトコンドリア由来ホスファチジルエタノールアミンによる静止期細胞分化制御
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田暖、伊藤貴紀、中島未由、久下理
2. 発表標題 ミトコンドリアPEによる細胞機能制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中柊也、三浦宗太郎、宮田暖、久下理
2. 発表標題 出芽酵母における小胞体-ミトコンドリア間リン脂質輸送経路の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田暖、伊藤貴紀、久下理
2. 発表標題 出芽酵母においてポストダイオキシシフト期に増加するホスファチジルエタノールアミンの機能解析
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮田暖、伊藤貴紀、久下理
2. 発表標題 ミトコンドリア由来ホスファチジルエタノールアミンを介した細胞周期と分化の制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井悟、宮田暖、久下理
2. 発表標題 出芽酵母のホスファチジルエタノールアミン生成における小胞体膜タンパク質Ice2の機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoru Fujii, Non Miyata, Osamu Kuge
2. 発表標題 Multiple functions of an ER membrane protein, Ice2, in phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine biosynthesis in yeast
3. 学会等名 60th International conference on the bioscience of lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田暖, 藤井悟, 久下理
2. 発表標題 Porinを介したミトコンドリアリン脂質合成制御
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 悟, 宮田 暖, 久下 理
2. 発表標題 出芽酵母の細胞内リン脂質代謝における小胞体膜タンパク質Ice2の機能解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田暖, 藤井悟, 久下理
2. 発表標題 Porinを介したミトコンドリアリン脂質合成制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	宮田 暖 (Miyata Non) (10529093)	九州大学・理学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------