

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06643

研究課題名(和文)リン脂質を介した細胞機能制御

研究課題名(英文)Regulation of cellular functions by phospholipids

研究代表者

宮田 暖 (Miyata, Non)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：10529093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳動物培養細胞、出芽酵母を用い、細胞内リン脂質恒常性維持機構とその生理的意義について解析を試み、(1)ミトコンドリア由来ホスファチジルエタノールアミンPEが細胞内エネルギーセンサーAMPK/Sfn1の活性を介し、グルコース枯渇時の酵母のG0細胞への分化を制御していること、ミトコンドリア由来PE合成経路がRb1欠損性ヒト乳がん細胞に対する抗がん剤開発の標的となる可能性を見出した。(2)出芽酵母におけるPE合成酵素Psd1の細胞内局在の発現量制御機構を明らかにした。(3)哺乳動物細胞ホスファチジルセリン(PS)合成酵素PSS1の小胞体膜上における膜配向性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じ、代表者はリン脂質合成制御機構およびその生理的意義について独創性の高い成果を挙げた。これらの成果は、細胞の環境変化に応じた細胞機能、細胞運命の制御機構の理解に大きく貢献するものと考えられる。さらに本研究で明らかとなった、ミトコンドリア由来PEを介したG0細胞分化制御機構や、Rb1欠損性乳がん細胞の増殖におけるミトコンドリア由来PE依存性は、今後再生医療やがん治療など医療面の発展に貢献するものと考えられる。また、PSS1の膜配向性解析から示唆されたPSS1活性制御機構は、Lenz-Majewski症候群やがんなど、諸疾患の病態、治療法解明に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present research, we attempted to elucidate the regulatory mechanism of cellular phospholipid biosynthesis and its physiological significance by using mammalian culture cell and yeast systems and revealed the following: (1) Mitochondria-derived phosphatidylethanolamine (PE) has a role in regulation of the cellular energy sensor, AMPK/Sfn1 and affects quiescence (G0) entry in yeast. Furthermore, synthetic pathway of mitochondrial PE could be a potential target for therapy against Rb1-deficient cancer cells. (2) the regulatory mechanisms for subcellular localization and abundance of PE-synthesizing enzyme, Psd1 in yeast. (3) Topology of mammalian phosphatidylserine (PS)-synthesizing enzyme, PSS1 in the endoplasmic reticulum membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア リン脂質

1. 研究開始当初の背景

リン脂質は生体膜の主要構成成分であり、生体膜の健全性維持や形態制御に重要な役割を有している。また、細胞内外のシグナル伝達においても種々の重要な機能を担っている。代表者は、主に出芽酵母を用いてミトコンドリアにおけるリン脂質の合成機構の研究を行ってきた。その中で、培地中のグルコースが枯渇し、エネルギー産生系が解糖系から、発酵によって産生されたエタノールを用いたミトコンドリア呼吸系へと移行する代謝の転換期(ダイオキシックシフト)に、ミトコンドリアにおけるホスファチジルエタノールアミン(PE)の合成が増加すること、この増加は PE の原料となるホスファチジルセリン(PS)のミトコンドリア内輸送を媒介する Ups2 の欠損によって抑えられることを見出していた。また出芽酵母は、グルコース枯渇時において一部の細胞が細胞周期を脱し、静止期(G₀)細胞へと可逆的に分化することが知られている。代表者は、Ups2 欠損酵母において、グルコース枯渇時における G₀ 細胞への分化が、野生型に比べて著しく増加していることを見出した。また、ミトコンドリアに局在する PE 合成酵素である Psd1 の欠損においても G₀ 細胞の分化が増加していた。これらのことより、ダイオキシックシフト時に Ups2 依存的に増加するミトコンドリア PE は、酵母の G₀ 細胞への分化を負に制御することが示唆された。また、研究開始当初、出芽酵母において Psd1 が、ミトコンドリアに加えて一部が小胞体上にも局在することが他研究グループから報告され、これまでの出芽酵母における PE 合成、輸送経路に関する知見の再検討の必要に迫られた。さらに、哺乳動物 PS 合成酵素、PSS1(PTDSS1)は、細胞内 PS 量に応じて活性が制御されている。この活性制御に重要なアミノ酸残基への点変異は、ヒトにおいて Lenz-Majewski 症候群と呼ばれる先天性疾患の原因となることが近年明らかにされている。この様なアミノ酸残基は PSS1 のアミノ酸配列上に広く散在しており、どの様なドメインが PSS1 活性制御に関与しているか不明であった。

2. 研究の目的

上述の様な背景の下、代表者は、細胞内リン脂質合成制御機構およびその生理的機能解明を目的とし、以下の研究を行なった。

- (1) 出芽酵母におけるミトコンドリア PE を介した静止期細胞分化制御機構の解析
- (2) 出芽酵母における PE 合成酵素 Psd1 の細胞内局在と制御機構の解析
- (3) 哺乳動物 PS 合成酵素 PSS1 の小胞体膜配向性の解析

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母におけるミトコンドリア PE を介した静止期細胞分化制御機構の解析
野生型、Ups2 欠損酵母のグルコース枯渇時における遺伝子発現を RNA シークエンスによって比較した。

(2) 出芽酵母における PE 合成酵素 Psd1 の細胞内局在制御機構の解析

出芽酵母には Psd1、Psd2 による PS 脱炭酸経路、エタノールアミンからの新規合成経路(ケネディ経路)の 3 経路によって PE が合成され、これら 3 経路が全て不全となると酵母は生育できない。これを応用し、Psd1 の機能制御に関与する新規遺伝子の同定を目的として、Psd2 との二重欠損によりエタノールアミンを含有しない培地において酵母が生育不全となる遺伝子を、出芽酵母非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いて網羅的に検索した。

(3) PSS1 膜配向性の解析

PSS1 は小胞体に局在する膜貫通タンパク質であるが、その膜配向性は詳細には解析されていない。PSS1 活性制御に関与するアミノ酸残基群が、小胞体膜上でサイトゾル側、内腔側どちらに分布しているのかを明らかにするため、PSS1 の各所に HA タグを挿入し、HA 抗体がサイトゾル側から各 HA エピトープにアクセスできるかを指標に PSS1 の膜配向性を解析した。

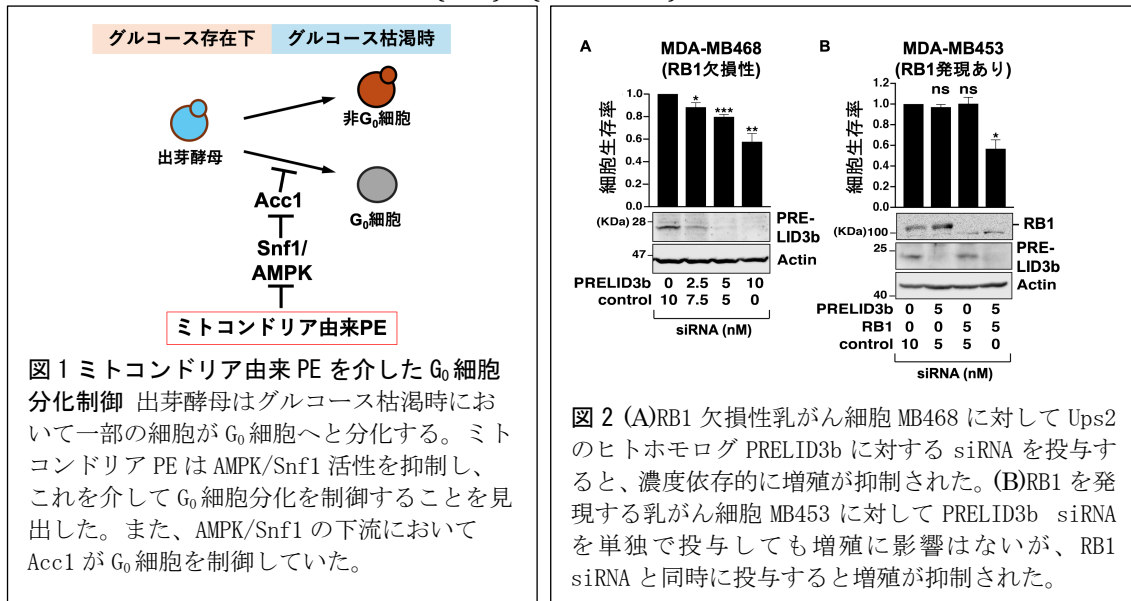
4. 研究成果

(1) 出芽酵母におけるミトコンドリア PE を介した静止期細胞分化制御機構の解析

RNA シークエンスの結果、グルコース枯渇前後の出芽酵母において数千の遺伝子の発現変動が観察された。一方、グルコース枯渇時の野生型酵母と Ups2 欠損酵母間では、わずかに数十個の遺伝子の発現の差異が観察された。これらの内、Ups2 欠損酵母において野生型酵母より発現が上昇した遺伝子の多くが、細胞内エネルギーセンサー AMPK (出芽酵母 Snf1) の下流において発現が制御されているものであった。さらに、Ups2 欠損酵母、Psd1 欠損酵母ではグルコース枯渇時の AMPK/Snf1 の過剰活性化が観察された。これらのことより、ミトコンドリアにおいて合成される PE は、グルコース枯渇時の AMPK/Snf1 の活性を負に制御する作用を有することが示唆された。また、AMPK/Snf1 は PE と in vitro で結合を示した。このことから、PE は AMPK/Snf1 と物理的な相互作用を介して活性を制御している可能性がある。

AMPK/Snf1 をリン酸化し、活性化に関与するキナーゼ、Sak1 の欠損は、酵母のグルコース枯渇時の G₀ 細胞細胞への分化を低下させ、Ups2 欠損による G₀ 細胞細胞への分化亢進をキャンセルした。このことより、ミトコンドリア PE 合成低下による G₀ 細胞細胞の分化亢進は、AMPK/Snf1 の過剰活性化に起因することが確認された。さらに、AMPK/Snf1 によりリン酸化され、不活性化される脂肪酸合成の律速酵素、アセチル CoA カルボキシラーゼ Acc1 を発現抑制すると、グルコース枯渇時の G₀ 細胞分化が強く亢進した。これらのことから、ミトコンドリア由来 PE、AMPK/Snf1 の下流において ACC1 が G₀ 細胞分化を制御していることが強く示唆された(図 1)。

さらに、ミトコンドリア PE と細胞周期の関係解析の中で、G₁/S 期進行の中心的制御因子である Whi5、Whi7(ヒト Rb1 の機能的ホモログ)と Ups2 の三重欠損酵母は、重篤な合成生育損傷を引き起こすことを見出した。さらに、Rb1 欠損性のヒト乳がん細胞 MDA-MB-468 細胞においてヒト Ups2 ホモログ PRELID3b の発現抑制は、細胞増殖を強く阻害した。一方 Rb1 を発現している MDA-MB-453 細胞では、PRELID3b の発現抑制に対して MDA-MB-468 と比較して抵抗性を示したが、Rb1 と PRELID3b の同時発現抑制は合成生育損傷を引き起こした。これらのことから、Ups2/PRELID3b を介したミトコンドリア合成経路は、Rb1 欠損性のがんに対する新規抗がん剤開発の標的となると期待される(図 2)。(雑誌論文 1)



(2) 出芽酵母における PE 合成酵素 Psd1 の細胞内局在制御機構の解析

上述の Psd1 を介した PE 合成に関与する因子の遺伝学的スクリーニングの結果、小胞体膜タンパク質 Ice2 を見出した。出芽酵母を用いた遺伝学的スクリーニングにより、Psd1 を介した PE 合成に影響する因子の探索を行った。その結果、小胞体膜タンパク質 Ice2 の欠損が Psd1 を介した PE 合成を低下させることを見出した。また、Ice2 欠損酵母における PE 合成の低下は、小胞体局在型 Psd1 量の低下に起因していた。ごく最近、Ice2 は、ホスファチジン酸(PA)ホスファターゼ Pah1 の制御因子 Nem1/Spo7 の活性を抑制することで、Pah1 活性を負に制御することが報告されている。Nem1 欠損による Pah1 活性低下は、小胞体型 Psd1 量の増加を引き起こし、Ice2 欠損による小胞体型 Psd1 量の低下を打ち消した。これらのことより、小胞体型 Psd1 の存在量は、Ice2-Nem1/Spo7-Pah1 経路によって制御される PA 量によって規定されていることが示唆された。また、小胞体型 Psd1 存在量は、E3 リガーゼ Hrd1 を介した小胞体関連分解によっても制御されていること、Psd1 のミトコンドリアへの輸送は、Djp1 に依存していることを見出した。さらに、Ice2-Nem1/Spo7-Pah1 軸による PA 量制御、Hrd1 依存性小胞体型 Psd1 量の分解、Djp1 依存性 Psd1 のミトコンドリアへの輸送による Psd1 量および Psd1 細胞内局在の制御は、これまでに知られていた転写抑制因子 Opi1 による PSD1 遺伝子転写制御と共同して細胞内 PE 合成制御に重要な役割を有していることを見出した。

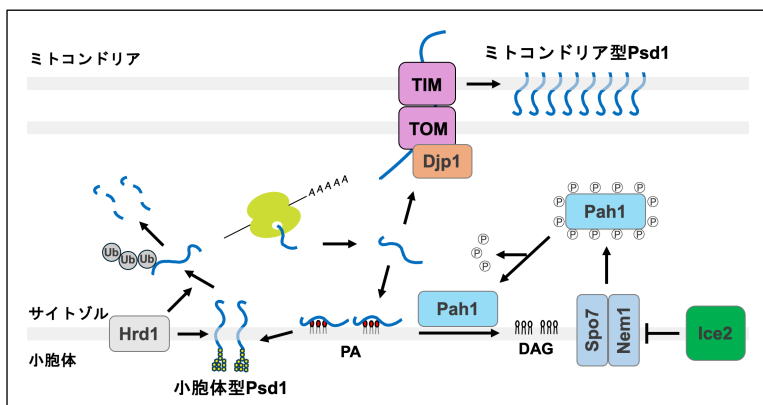


図 3 出芽酵母 Psd1 の細胞内局在と存在量の制御機構 Psd1 はミトコンドリアと小胞体両方に局在している。小胞体上 Psd1 の存在量は、Ice2-Nem1/Spo7-Pah1 を介した PA 代謝、Hrd1 を介した小胞体関連分解、Djp1 依存性ミトコンドリアへの輸送によって制御されていることが明らかになった。

(図 3)(論文投稿準備中)

(3) PSS1 膜配向性の解析

HA エピトープタグを用いた PSS1 の小胞体膜上での配向性の解析の結果、PSS1 は、N 末端、C 末端をサイトゾルに配向した 10 回膜貫通タンパク質であることが示唆された。さらに、この

膜配向性モデルでは、PSS1 の活性制御に関与するアミノ酸残基はサイトゾル側に、PSS1 の酵素活性に必須のアミノ酸は小胞体内腔側に配向することが明らかになった。これらのことから、PSS1 は、サイトゾル側で小胞体膜上の PS 量を検知し、内腔側で PS を合成する可能性が考えられる。(図 4)(雑誌論文 2)

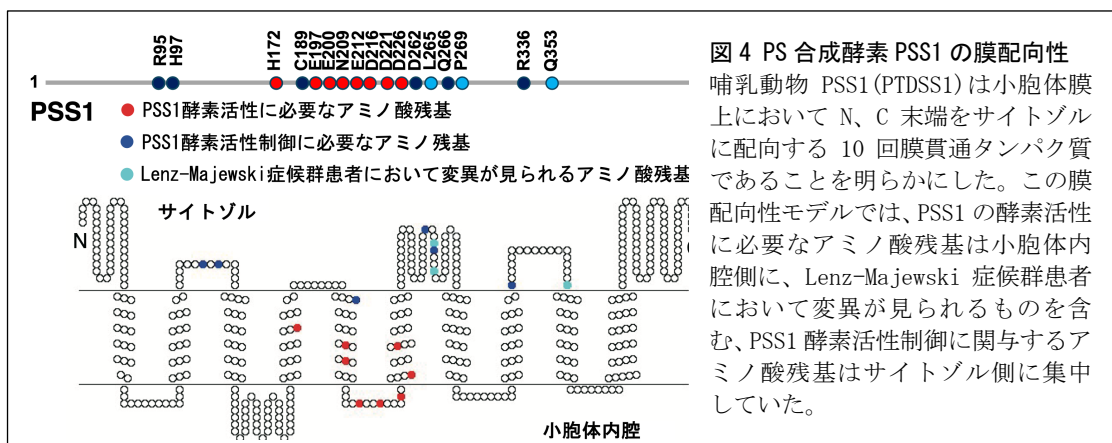


図 4 PS 合成酵素 PSS1 の膜配向性
哺乳動物 PSS1 (PTDSS1) は小胞体膜上において N、C 末端をサイトゾルに配向する 10 回膜貫通タンパク質であることを明らかにした。この膜配向性モデルでは、PSS1 の酵素活性に必要なアミノ酸残基は小胞体内腔側に、Lenz-Majewski 症候群患者において変異が見られるものを含む、PSS1 酵素活性制御に関与するアミノ酸残基はサイトゾル側に集中していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宮田 暖	4. 巻 95
2. 論文標題 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ミトコンドリア機能，細胞増殖制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 379～383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950379	査読の有無 無
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 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 -
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 Miyata Non, Kuge Osamu	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 -
1. 著者名 Fujiki Yukio, Abe Yuichi, Imoto Yuuta, Tanaka Akemi J., Okumoto Kanji, Honsho Masanori, Tamura Shigehiko, Miyata Non, Yamashita Toshihide, Chung Wendy K., Kuroiwa Tsuneyoshi	4. 巻 133
2. 論文標題 Recent insights into peroxisome biogenesis and associated diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 236943～236943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.236943	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 出芽酵母におけるホスファチジルセリン脱炭酸酵素1(Psd1) 制御機構の解析
3. 学会等名 第204回酵母細胞研究会例会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 小胞体およびミトコンドリアにおけるホスファチジルセリン脱炭酸酵素1(Psd1)量の制御
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 出芽酵母においてミトコンドリアにおけるPE合成は、Snf1/AMPKの抑制を介してミトコンドリアエネルギー代謝、静止期進入を低下させる。
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 ERMESを介した小胞体-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 宮田 暖
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
2. 発表標題 ミトコンドリア内リン脂質輸送体Ups2-Mdm35を介した細胞機能制御
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会九州部会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 ミトコンドリアホスファチジルエタノールアミン(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 宮田 暖
2. 発表標題 ホスファチジルセリン脱炭酸酵素Psd1の細胞内局在制御
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会 年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田 暖
2. 発表標題 出芽酵母においてポストダイオキシック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61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮田 暖
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮田 暖	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 ミトコンドリアを介したリン脂質輸送・代謝制御	

〔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

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