

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20572

研究課題名（和文）オルガネラ膜コンタクトを介したセラミド輸送の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of ceramide transport via organelle membrane contacts.

研究代表者

池田 敦子 (Ikeda, Atsuko)

広島大学・統合生命科学研究科（生）・助教

研究者番号：70909093

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：細胞プログラムの制御因子であるセラミドは様々な疾患に關する。しかしながら、“セラミドの輸送、代謝メカニズムの理解”は十分とは言えないのが現状である。真核細胞において、セラミドはその代謝過程で小胞体からゴルジ体へ運ばれる。セラミドのオルガネラ間輸送には、輸送小胞を介した「小胞輸送」の他に、オルガネラ膜同士の接触領域を介する「非小胞輸送」が存在する。本研究では、セラミド非小胞輸送に關するタンパク質であるTricalbinの結合脂質解析を行った。また、セラミドの非小胞輸送には、脂質の貯蔵庫としての役割を担うオルガネラである脂肪滴が關与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の物質輸送経路において、小胞輸送については詳細なメカニズムまで明らかとなっている一方で、非小胞輸送について得られている知見は未だ多くない。本研究から得られた成果は、膜接触領域を介したセラミド非小胞輸送研究についての新規の知見をもたらした。また、セラミドは様々な疾患に關与しており、抗がん剤耐性となったがん細胞ではセラミド量が減少することから、その治療薬候補としても注目されている。したがって本研究成果は、薬剤耐性がんをはじめとしたセラミドが關与する疾患に対する治療薬開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Ceramide, the regulator of cellular programs, are involved in various diseases. However, our understanding of transport and metabolic mechanisms of ceramide is still limited. In eukaryotic cells, ceramide is transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. The inter-organelle transport of ceramide occurs through both "vesicular transport" mediated by transport vesicles and "non-vesicular transport" mediated by the contact sites between organelle membranes. In this study, we analyzed the binding lipids of tricalbin, a protein family involved in the non-vesicular transport of ceramide. Furthermore, we found that lipid droplets, organelles responsible for lipid storage, may also play a role in the non-vesicular transport of ceramide.

研究分野：農芸化学

キーワード：酵母 Tricalbin セラミド 非小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

脂質の輸送が異常になると細胞が正常に機能しなくなり、様々な疾患が引き起こされる。その重要性にも関わらず、脂質輸送の選別機構や分子機構はよく分かっていない。真核細胞において、セラミドはその代謝過程で小胞体からゴルジ体へ運ばれる。セラミドの輸送には2つの経路が存在することが分かっており、1つは輸送小胞を介した「小胞輸送」、もう1つは特異的な脂質輸送タンパク質が介する「非小胞輸送」である。小胞輸送については、その発見者である **Randy Schekman** 氏が2013年のノーベル生理学・医学賞を受賞したことから分かるように、非常に発展した研究分野でありその詳細なメカニズムまで明らかとなっている。一方、非小胞輸送については、未だ得られている知見は多くない。

小胞体からゴルジ体へのセラミドの非小胞輸送は膜同士の接触領域 (Membrane Contact Site, MCS) を必要とすることが、酵母で2001年 (Funato and Riezman, *J. Cell Biol.*) に示唆された。2003年に、セラミド輸送タンパク質として、動物細胞で **CERT** が発見されたが (Hanada et al., *Nature*)、酵母ホモログは見出されていない。その後、小胞体ストレスを誘導した条件下において、酵母 **Nvj2** がセラミド非小胞輸送に機能することが報告された (Liu et al., *J Cell Biol.*, 2017)。その一方で我々は、酵母の **Tricalbin** タンパク質ファミリー (**Tcb1**, **Tcb2**, **Tcb3**) がセラミドの非小胞輸送に必要であることを発見した (Ikeda et al., *iScience*, 2020)。酵母の **Tricalbin** タンパク質は、小胞体と細胞膜の間に MCS を形成し、脂質の代謝や輸送に関与することが報告されている (Manford et al., *Dev Cell.*, 2012; Quon et al., *PLoS Biol.*, 2018)。また、酵母 **Tricalbin** のヒトホモログとしては **Extended-Synaptotagmin (E-Syt1, 2, 3)** が存在する (Giordano et al., *Cell*, 2013)。ヒト **E-Syt** も小胞体-細胞膜 MCS の形成に関与し、神経伝達細胞において重要な機能を持つと考えられているが、小胞体-ゴルジ体 MCS においてセラミド非小胞輸送に機能しているという報告は未だない。

我々のこれまでの解析から、セラミドの非小胞輸送において **Tricalbin** が「小胞体とゴルジ体中間層との MCS を形成する繫留因子としての機能」と「脂質を膜から引きぬいて受け渡す輸送体としての機能」という2つの役割をもち、**C2** ドメイン (カルシウムイオンに依存して脂質との結合性を示すドメイン) と **SMP** ドメイン (脂質輸送に機能することが推定されるドメイン) がそれぞれに役割を担うことが推察された。しかしながら、これらのドメインが直接結合するターゲットについて、実験的エビデンスは示されていない。

また、これまでに我々は、セラミド非小胞輸送の低下が脂肪滴の形成を促進することを明らかにした。セラミドは細胞死を誘導するシグナル因子であり、小胞体に蓄積することで毒性を示す。その毒性緩和のため、セラミドはアシル化され中性脂質 (アシルセラミド) に変換されて、脂肪滴に貯蔵される機構が示唆されている。これらを踏まえ本研究では、セラミド非小胞輸送における脂肪滴とアシル化の関与について検証を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は、**Tricalbin** によるセラミド非小胞輸送メカニズムを明らかにすることを目的とし、**Tricalbin** と脂質との結合性を解析した。さらに、脂質の貯蔵庫としての役割を担うオルガネラである脂肪滴とアシル化の関与についても解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) **Tcb3** の機能ドメインと結合するターゲット分子の同定

**GFP** タグを融合した **SMP** ドメインまたは **C2** ドメインを発現させた細胞を、セラミドの前駆体である放射性 **dihydrosphingosine (DHS)** を用いて標識した後、免疫沈降法により精製したドメインから脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー (**TLC**) 法により解析した。

### (2) 立体構造に基づく **Tcb3** と脂質の結合分子メカニズムの解析

アルファフォールド予測により **Tricalbin** タンパク質の立体構造モデルを構築し、脂質との結合に重要であると思われるタンパク質構造および疎水性アミノ酸残基を探索した。

### (3) 細胞内におけるオルガネラの共局在性解析

**Tcb3-GFP** と、ゴルジ体マーカー **Gos1-RFP** および脂肪滴染色試薬 **AUTOdot** を用いて、蛍光顕微鏡観察により局在を解析した。

### (4) セラミド非小胞輸送の解析

セラミドのアシル化に関与する遺伝子の破壊株を用いて、小胞輸送をブロックした条件下で放射性脂質前駆体により標識した後、細胞から抽出した脂質を **TLC** 法により解析した。

#### 4. 研究成果

(1) Tcb タンパク質ファミリー (Tcb1, Tcb2, Tcb3) はそれぞれ、N 末端には小胞体膜への局在に必要な膜貫通領域 (TM ドメイン)、C 末端側にはカルシウムイオンに依存して脂質との結合性を示すとされる multiple Ca<sup>2+</sup>-binding domains (C2 ドメイン)、さらにその間には脂質輸送に機能することが推定される synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding protein domain (SMP ドメイン) を持つ。特に SMP ドメインはセラミド非小胞輸送において、脂質を小胞体膜から引き抜きゴルジ膜へと受け渡す機能に重要である可能性が、これまでの我々の解析から示唆されている (Ikeda et al., iScience, 2020)。そこで、実際に SMP ドメインとセラミドが結合するという実験的エビデンスを得るため、解析を行った。放射性 DHS で標識した細胞から、免疫沈降法により精製した SMP ドメインに結合している脂質を TLC 法により解析した結果、各種セラミドのバンドが検出された。またこれらのバンドは、C2 ドメインに対しては検出されなかったことから、セラミドと Tcb3 の結合が SMP ドメイン特異的であることも示された。

(2) 次に、構造解析によりリガンド認識機構を明らかにするため、AlphaFold2 予測を用いて、Tcb3 タンパク質の立体構造モデルの構築を試みた。その結果、Tcb3 の SMP ドメインは疎水性アミノ酸残基に富んだポケット構造を持つことが確認された。また、Tcb1 および Tcb2 の SMP ドメインについても同様に立体構造モデルを構築し、Tcb3 の SMP ドメインと類似する構造が確認された。特に、このポケット構造の中で複数の疎水性アミノ酸が直線上に配置されていることが分かった。これらの立体構造的知見に基づいて、脂質との結合に寄与すると推察される疎水性アミノ酸の置換変異体を発現するプラスミドの作製を行った。アミノ酸置換後もポケット構造は維持されることを、立体構造予測により確認済みである。脂質との結合性へのアミノ酸置換の影響については、引き続き解析中である。

(3) Tricalbin の欠損は、アシルセラミドを蓄積し、脂肪滴の形成を誘導させることを、これまでに我々は見出した。これは、Tricalbin によるセラミド非小胞輸送のメカニズムに脂肪滴が関与している可能性を示唆している。非小胞輸送はオルガネラ膜同士の接触領域を介して行われることから、小胞体・ゴルジ体・脂肪滴の3つのオルガネラの細胞内局在について、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、小胞体に局在する Tcb3 はゴルジ体および脂肪滴に近接して存在している様子が確認された。またこれらの接触領域は、セラミド非小胞輸送が促進されると考えられるストレス条件において、増加することが示された。

(4) 続いて、脂肪滴の形成あるいはセラミドのアシル化がセラミド非小胞輸送に関与している可能性を検証するために、脂肪滴へ貯蔵されるアシルセラミドを含む中性脂質の合成に必要なアシル化酵素遺伝子 *DGA1* および *LRO1* の破壊によってセラミド非小胞輸送が影響を受けるか解析を行った。*SEC12* 遺伝子の温度感受性変異によって小胞輸送経路を阻害した条件において、放射性イノシトールを用いて脂質を標識し、ゴルジ体においてセラミドから合成される inositol phosphorylceramide (IPC) の量を解析した。その結果、*sec12-ts* 変異株と比較して *sec12-ts dga1Δlro1Δ* 三重変異株では IPC 合成量の有意な減少が示された。この結果は、非小胞輸送の一部は脂肪滴もしくはセラミドのアシル化を必要とする経路である可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikeda Atsuko, Hanaoka Kazuki, Funato Kouichi	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for measuring sphingolipid metabolism in budding yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Miyako, Sabido-Bozo Susana, Okazaki Kouta, Aguilera-Romero Auxiliadora, Rodriguez-Gallardo Sofia, Cortes-Gomez Alejandro, Lopez Sergio, Ikeda Atsuko, Funato Kouichi, Muniz Manuel	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural analysis of the GPI glycan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0257435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0257435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Flor-Parra Ignacio, Sabido-Bozo Susana, Ikeda Atsuko, Hanaoka Kazuki, Aguilera-Romero Auxiliadora, Funato Kouichi, Muniz Manuel, Lucena Rafael	4. 巻 23
2. 論文標題 The Ceramide Synthase Subunit Lac1 Regulates Cell Growth and Size in Fission Yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23010303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中里光希、加藤萌伊、金井宗良、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 転写制御因子によるCOP 小胞輸送の制御機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第59回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuki Nakazato, Yuga Sono, Atsuko Ikeda, Kouichi Funato
2. 発表標題 Screening for kinase genes regulating COPII vesicle trafficking in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 ICY15 meets ICYGB30 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Hanaoka, Kensuke Nishikawa, Sayumi Yamashita, Aya Nakaji, Atsuko Ikeda, Kouichi Funato
2. 発表標題 Membrane contact sites regulate vacuole morphology via sphingolipid metabolism
3. 学会等名 ICY15 meets ICYGB30 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中里光希、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 小胞体での脂質代謝変動の核による感知が小胞輸送を調節する
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会 (中四国支部第 60 回講演会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井日向子、荒木美彩子、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 オルガネラの構造における GPI 脂質リモデリングの役割
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会 (中四国支部第 60 回講演会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻木桂子、關川裕一郎、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 セラミドの長さが脂質ドメインを介した TORC1 の活性に重要である
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部合同大会（中四国支部第 60 回講演会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中里光希、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 小胞体での脂質代謝変動の核による感知が小胞輸送を調節する
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野美咲、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 Nnk1 キナーゼは小胞輸送を介したスフィンゴ脂質の合成に関与する
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後田梨緒、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 TORC2 の下流で働く新規キナーゼの探索
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤内孝樹、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 メチオニン代謝がCOP 小胞輸送を調節する可能性の発見
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻木桂子、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 液胞膜ドメインの形成におけるスフィンゴ脂質とMCS の役割に関する研究
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井日向子、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 オルガネラの形態維持におけるGPI 脂質リモデリングの役割
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花岡和樹、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 分裂酵母のセラミド合成酵素Lag1 とLac1 の機能解析
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中里光希、池田敦子、Isabelle Riezman、Howard Riezman、船戸耕一
2. 発表標題 リビドーム解析から見えてきた小胞輸送の脂質代謝制御
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第61回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花岡和樹、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 出芽酵母におけるスフィンゴ脂質による液胞の形態制御機構
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第61回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中里光希、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 COPII小胞輸送を制御する遺伝子の探索と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第62回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花岡和樹、池田敦子、船戸耕一
2. 発表標題 分裂酵母におけるセラミド合成酵素Lag1とLac1の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第62回講演会
4. 発表年 2022年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 三本木 至宏監修・上田 晃弘・杉野 利久・鈴木 卓弥・富山 毅・船戸 耕一編・池田敦子ほか54名執筆	4. 発行年 2021年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 256
3. 書名 SDGsに向けた生物生産学入門	

〔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
---------	---------