

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590080

研究課題名(和文)リン脂質の細胞内輸送機構に関する研究

研究課題名(英文) Intracellular transport of phospholipids

研究代表者

久下 理 (Kuge, Osamu)

九州大学・理学(系)研究科(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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質の細胞内輸送は、生体膜の形成・機能維持に必須の反応である。しかし現在、膜脂質の細胞内輸送に関する遺伝子に関する情報は少なく、これらの同定・解析が、生体膜の形成・機能維持機構の解明に重要な研究課題となっている。そこで本研究では、リン脂質の細胞内輸送に関与する遺伝子、及び新規リン脂質代謝関連遺伝子の同定を試み、ミトコンドリア内膜におけるリン脂質の輸送に関与すると考えられる2種類の新規遺伝子とリン脂質代謝酵素遺伝子PSD2の発現に関与する新たな遺伝子を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Intracellular transport of phospholipids is an essential event for the biogenesis of functional biological membranes. However, the transport processes are largely unknown with respect to mechanisms, genes and gene products involved. In this study I tried to identify novel genes involved in the phospholipids transport or phospholipid metabolism in yeast, and identified two genes that probably functioned in phospholipid transport to mitochondrial inner membrane, and one gene that was involved in the expression of a phospholipid metabolism gene, PSD2.

研究分野：医歯薬学

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

1. 研究開始当初の背景

生体膜の形成・維持機構の解明は現代生命化学の最も重要な研究課題の一つである。生体膜の基本構造は、膜タンパク質と膜脂質から形成されているが、細胞膜や多くの細胞内オルガネラ膜は、これら構成分子を合成する能力がないため、生体膜の形成にはタンパク質と脂質が合成された場所から機能する場所に輸送されることが必要である。現在、タンパク質の細胞内輸送は、膨大な研究によりその基本的な機構が明らかにされているものの、脂質の細胞内輸送機構に関する研究は、脂質の物性（水に難溶性であり蛍光標識などわずかな修飾で本来の性質が変化してしまう）により困難であり、遅々として進んでいない。生体内反応の理解が飛躍的に進展している近年、意外に思われるかもしれないが、脂質の細胞内輸送機構は、セラミドやコレステロールなどの一部の脂質の輸送反応を除き、文字通り全く不明といっても過言ではない。作業仮説的には、脂質の細胞内輸送機構として、可溶性の脂質結合タンパク質を介した輸送、膜小胞を介した輸送、あるいは供与体膜と受容体膜の接触領域を介した輸送などいくつかのモデルが提唱されているものの、生体膜の形成維持に実際に重要な役割を担うリン脂質輸送分子・装置、あるいは輸送反応がどのようなものかはほとんど理解されていない。タンパク質の細胞内輸送に膜小胞が関与することは疑いのない事実であり、その過程で膜脂質が細胞内を移動すると考えられるが、膜小胞を介した脂質輸送が、脂質を選別し、各生体膜の機能に適した脂質を供給しているか否かは不明である。また、ミトコンドリアやペルオキシソームへのタンパク質輸送は膜小胞を介しておらず、これらオルガネラへの膜脂質の輸送は、タンパク質を輸送する膜小胞では説明できない。このような背景の基、膜脂質の細胞内輸送に関与する遺伝子あるいは遺伝子産物の同定が、生体膜の形成・維持機構の解明に急務を要する重要な研究課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝学的解析が容易で、真核細胞の最も単純なモデルである酵母を用いてリン脂質の細胞内輸送に関与する遺伝子の同定を試みる。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) における主要リン脂質代謝経路において、リン脂質代謝酵素の細胞内局在が限定されているため、この代謝経路が進行するためには多くの局面でリン脂質のオルガネラ間輸送が必要である。例をあげると、カルジオリピン (CL) の生合成には、その前駆体リン脂質であるホスファチジン酸 (PA) の脂質顆粒 (lipid particle) あるいは小胞体 (ER) からミトコンドリアへの輸送が必要であり、ホスファチジルセリン (PS) の脱炭酸によるホスファチジルエタノールアミン (PE) の生合成には PS の小胞体からミトコ

ンドリアあるいはゴルジ/液胞への輸送が必要である。また、ミトコンドリアは、二重の脂質二重層膜 (外膜と内膜) に囲まれており、ミトコンドリアの CL 合成経路の酵素と PS 脱炭酸酵素 1 はミトコンドリア内膜に局在する。従って、ミトコンドリアにおける CL と PE の生合成には、これらリン脂質の前駆体である PA と PS が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が必要である。しかしながら、リン脂質のミトコンドリア内膜への輸送に関わる因子としては、Ca²⁺-結合タンパク質 S100B、ユビキチンリガーゼ複合体の一つである Met30、ミトコンドリアの融合に関与する MFN、及び ER-ミトコンドリア繫留複合体 (tethering complex) が知られているのみである。ミトコンドリア内膜へのリン脂質輸送の複雑さを考えると、これら因子だけでこの輸送が制御されているとは考えにくい。そこで本研究では、PS あるいは PA のミトコンドリア外からミトコンドリア内膜への輸送に関わる遺伝子に欠損をもつ変異株の分離を具体的な目的の一つとした。さらに、得られた変異株の変異遺伝子の同定とその機能解析を詳細に行い、リン脂質のミトコンドリア内膜への輸送機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

先に述べたように、酵母ミトコンドリアにおけるカルジオリピン (CL) とホスファチジルエタノールアミン (PE) の生合成には、これらリン脂質の前駆体であるホスファチジン酸 (PA) とホスファチジルセリン (PS) が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が必要である。一方、近年、ミトコンドリア内膜で PE を合成する酵素 Psd1p と CL を合成する酵素 Crd1p の遺伝子 (*PSD1*, *CRD1*) をそれぞれ破壊しても酵母は生育可能であるが、両者を破壊した二重変異株は生存できず、この二重変異が致死性となることが報告された。これらのことから、*PSD1* 遺伝子が欠損した変異株 (*psd1Δ*) において CL 生合成に必要な PA のミトコンドリア内膜への輸送に関与する遺伝子がさらに欠損した場合、あるいは *CRD1* が欠損した変異株 (*crd1Δ*) においてミトコンドリア PE レベルの維持に必要な PS のミトコンドリア内膜への輸送に関与する遺伝子がさらに欠損した場合、それら遺伝子欠損が致死性あるいは増殖損傷を示すと考えられる。そこで本研究では、PA あるいは PS のミトコンドリア内膜への輸送に関与する遺伝子を同定するため、*PSD1* 欠損あるいは *CRD1* 欠損の遺伝的背景において、その欠損が致死性あるいは増殖損傷となる遺伝子を網羅的に検索した。網羅的検索は、非必須遺伝子約 4800 個が個別に破壊 (*kanR* 遺伝子に置換) されて

いる酵母ノックアウトライブラリーを用い、それら全ての変異株それぞれと *PSD1* 破壊株 (*natR* 遺伝子に置換) あるいは *CRD1* 破壊株 (*natR* 遺伝子に置換) とのヘテロ接合体 2 倍体細胞を作成した後に、その減数分裂により得られる二重欠損変異株の増殖を調べることにより行った。各変異株の増殖速度の判定は、近年開発された SGA (synthetic genetic arrays) 分析法を 1 次スクリーニングに用い、2 次スクリーニングにランダム孢子解析を用いた。次に、これらのスクリーニングにより得られた各候補遺伝子の欠損株、および *PSD1* あるいは *CRD1* との各二重欠損株のリン脂質組成を調べることにより目的遺伝子をさらに選別した。この方法では、リン脂質の輸送に関与する遺伝子の他に、リン脂質代謝酵素やその調節に関与する新規遺伝子も同定されると考えられるが、それら遺伝子の同定も大変に意義深いものであり、それら遺伝子の機能解析もあわせて本研究において実施した。

4. 研究成果

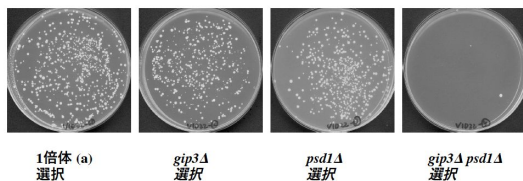
1) *GIP4*, *GIP5* 遺伝子に関する研究

PSD1 との二重欠損で致死あるいは増殖損傷となる *GIP* (Genetic Interactors of *PSD1*) 遺伝子を新たに多数同定した。そのうち *GIP4* と *GIP5* と名付けた互いに相同性を持つ遺伝子が *PSD1* との二重欠損で、致死性となり、それぞれの単独欠損で CL の減少とモノリゾカルジオリピンあるいはホスファチジルグリセロールの蓄積を示した。また、*GIP4*, *GIP5* 遺伝子産物は、いずれもミトコンドリア内膜タンパク質であると考えられた。この結果と既知の CL 生合成経路酵素の局在を考え合わせると、これら遺伝子が、リン脂質のミトコンドリア内膜における膜横断輸送に関与するものと考えられた。

2) *GIP3* に関する研究

図 1 に示されるように、*GIP3* と *PSD1* との二重欠損が最小合成培地で合成致死となることがランダム孢子解析により明らかにされた。

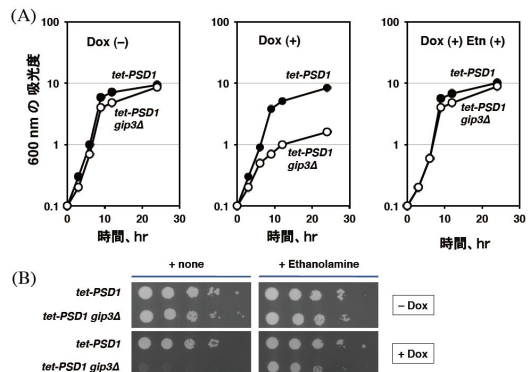
図 1. ヘテロ接合体 2 倍体 (*psd1Δ/PSD1^{WT} gip3Δ/GIP3^{WT}*) のランダム孢子解析



PSD1 と *GIP3* の二重欠損が酵母に及ぼす影響を調べる目的で、*PSD1* のプロモーターの変換により、その発現をテトラサイクリンあるいはドキシサイクリン (Dox) の培地への添加で抑制できる *tet-PSD1* 株とこの株に *GIP3* 欠損を導入した *tet-PSD1 gip3Δ* 株を構築した。これら酵母株の細胞増殖を調べたところ、*PSD1* 発現抑制の条件下で、*GIP3* 欠損株は

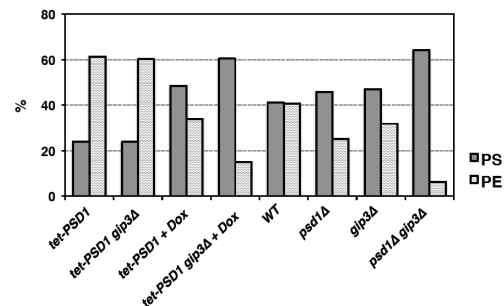
GIP3 正常株に比べ、増殖速度が低下し、その低下はエタノールアミンの培地への添加で回復することが明らかとなった (図 2)。

図 2. 細胞増殖の解析



PSD1 発現抑制の条件下における *gip3Δ* 株の増殖低下がエタノールアミンの添加で正常に回復することから、*gip3Δ* 株が PS 脱炭酸経路による PE 合成に損傷を有している可能性が考えられた。そこで、各種変異株を [¹⁴C]セリンで代謝標識し、[¹⁴C]PS の合成とその脱炭酸で生じる [¹⁴C]PE を解析した。その結果、*gip3Δ* 株では PS 脱炭酸経路による PE 合成が低下していることが判明した (図 3)。

図 3. [¹⁴C]セリンの PS と PE への取り込み

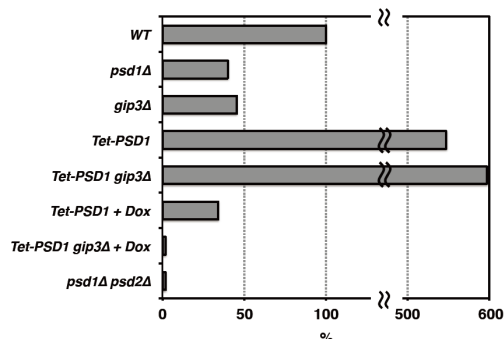


次に、各種変異株の細胞抽出液を調製し、その PS 脱炭酸酵素活性を測定した。活性測定は、基質に NBD-PS を用い、Psd1p と Psd2p の両者の酵素活性を測定できる反応系で行った。その結果、*GIP3* 単独欠損株が野生株に比べて部分的に低下した PS 脱炭酸酵素活性を示すこと、及び *PSD1* の発現を抑制した *GIP3* 欠損株が PS 脱炭酸酵素活性をほとんど有さないことが判明した。この結果より *GIP3* 欠損株が Psd2p の活性をほとんど有さないことが示唆された (図 4)。

PSD1 発現抑制の条件下で、*GIP3* 欠損株は *GIP3* 正常株に比べ、(1) 増殖速度が低下し、その低下はエタノールアミンの培地への添加で回復すること、(2) PS 脱炭酸経路による PE 合成の速度が低下していることが判明した。また、*PSD1* の発現を抑制した *GIP3* 欠損株が PS 脱炭酸酵素活性をほとんど有さないことも *in vitro* の活性測定により明らかとなった。これらの結果より、*GIP3* は酵母が Psd2p の活性を維持するために必要な遺伝子

であることが示唆された。現在、GIP3の欠損により、Psd2pの合成が抑制されるのか、分解が促進されるのか、あるいはPsd2pの活性に必要な修飾等に損傷が生じるのかについて検討している。

図4. PS脱炭酸酵素活性



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Tani M, Kuge O.

Involvement of Sac1 phosphoinositide phosphatase in the metabolism of phosphatidylserine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Yeast. 2014 Apr;31(4):145-58. doi: 10.1002/yea.3004. 査読有り

久下 理

ミトコンドリアにおけるリン脂質の生合成

医学のあゆみ、2014.3.29; 248: 1159-65
http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi, 査読無し

Tamura Y, Harada Y, Nishikawa S, Yamano K, Kamiya M, Shiota T, Kuroda T, Kuge O., Sesaki H, Imai K, Tomii K, Endo T.

Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria.

Cell Metab. 2013 May 7;17(5):709-18. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.018. 査読有り

Tani M, Kuge O.

Involvement of complex sphingolipids and phosphatidylserine in endosomal trafficking in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Mol Microbiol. 2012 Dec;86(5):1262-80. doi: 10.1111/mmi.12057. 査読有り

Lee S, Uchida Y, Emoto K, Umeda M, Kuge O., Taguchi T, Arai H.

Impaired retrograde membrane traffic through endosomes in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis.

Genes Cells. 2012 Aug;17(8):728-36. doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01622.x. 査読有り

Tani M, Kuge O.

Hydroxylation state of fatty acid and long-chain base moieties of sphingolipid determine the sensitivity to growth inhibition due to AUR1 repression in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 13;417(2):673-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.138. 査読有り

[学会発表](計 7 件)

谷 元洋, 久下 理

酵母ホスホイノシチドホスファターゼ SAC1 欠損によるホスファチジルセリン量低下のメカニズム解析

第 86 回日本生化学会大会 横浜

2013 年 09 月 11 日

谷 元洋, 久下 理

複合スフィンゴ脂質とホスファチジルセリンによるエンドソームリサイクリング経路の制御機構

第 85 回日本生化学会大会 福岡

2012 年 12 月 15 日

谷 元洋, 久下 理

出芽酵母の生育阻害誘導に必要なセラミドの構造的要因の解析

日本脂質生化学会 福岡

2012 年 6 月 8 日

久下理、三好琢弥、山口剛典、谷元洋

酵母ホスファチジルセリン脱炭酸酵素 2 の活性発現に關与する新規遺伝子の同定と解析

日本脂質生化学会 福岡

2012 年 6 月 7 日

友廣志穂、大橋順、前田敏孝、山本祐華、谷元洋、久下理

ミトコンドリア新規形態制御因子 IAT1 の解析

日本生化学会九州支部例会 福岡

2012 年 5 月 27 日

谷 元洋, 久下 理

出芽酵母のエンドソーム・ゴルジ間輸送における複合スフィンゴ脂質とホスファチジルセリンの機能

第 84 回日本生化学会大会 京都

2011 年 9 月 22 日

三好琢弥、中嶋友博、谷元洋、久下理

酵母ホスファチジルセリン脱炭酸酵素 2 の活性に關与する新規遺伝子(GIP3)の同定と解析

第 84 回日本生化学会大会 京都

2011 年 9 月 22 日

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