

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860045

研究課題名(和文) カルジオリピンを中心とした線虫体細胞の生存に必須なリン脂質とその代謝経路の同定

研究課題名(英文) Identification of novel phospholipid metabolic pathway which is essential for somatic cell survival in *C. elegans*

研究代表者

坂本 太郎 (Sakamoto, Taro)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：10383655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カルジオリピン(CL)はミトコンドリアの内膜特異的に存在し、ミトコンドリアの機能や構造の維持に必須なリン脂質であると考えられている。CL合成酵素を欠損した線虫*C. elegans*では、生殖細胞のミトコンドリアに異常を来たし不妊になるにも関わらず、体細胞のミトコンドリアは正常に保たれることを研究代表者は明らかにしている。本研究では、体細胞のミトコンドリアがカルジオリピンの減少という危機的状況をどのように回避するのか、その分子基盤を明らかにすることを目的とし、未知のCL合成経路の順遺伝学的スクリーニングを行い、CL含量が減少した新規遺伝子変異線虫の作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Cardiolipin (CL) is an acidic phospholipid specifically localized in mitochondrial inner membrane. By interacting with various mitochondrial proteins, CL contributes to the maintenance of the structure and function of those mitochondrial proteins. We have demonstrated that deletion of CL synthase (*crls-1*) selectively caused abnormal mitochondrial function and morphology in germ cells but not in somatic cells. In this study, by a forward genetic screening, we isolated a gene deletion mutant that shows synthetic lethal phenotype in combination with the *crls-1* deletion mutant allele. This is the first study to suggest the existence of a novel CL synthetic pathway or a phospholipid that compensate the function of CL in *C. elegans*.

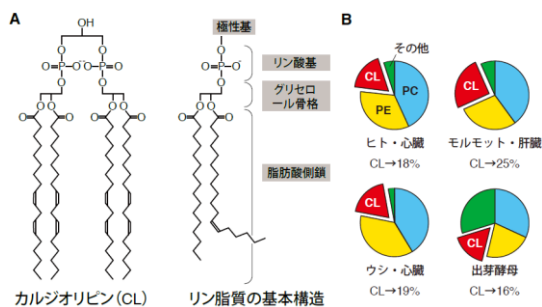
研究分野：医歯薬学

キーワード：カルジオリピン ミトコンドリア 脂質 線虫 生殖細胞 体細胞

1. 研究開始当初の背景

カルジオリピン (CL) はミトコンドリアの内膜に局在する微量リン脂質である (下図参照)。これまでの酵母や培養細胞を用いた研究から、CL がミトコンドリア内エネルギー産生に関わる種々の機能タンパク質と相互作用し活性発現を促進すること、ミトコンドリアからのチトクロム *c* の放出を抑制することでアポトーシスを調節すること、CL のミトコンドリア外膜へ露出がミトコンドリア選択的オートファジーの起点となることなどが明らかになっており、単なる膜リン脂質にとどまらない機能性リン脂質として注目されている。しかし、CL 合成酵素のノックアウトマウスは作成されておらず、個体レベルでの十分な機能解析は行われていなかった。

そこで研究代表者は、遺伝学的解析が容易な線虫 *C. elegans* を使い、カルジオリピンの個体レベルにおける生理機能を明らかにすることを試みた。その結果、CL 合成酵素 (*cls-1*) の遺伝子欠損線虫は生殖細胞のミトコンドリアに機能低下や構造異常を来とし、生殖細胞の増殖不全により不妊となることを明らかにした。



2. 研究の目的

CL 合成酵素 (*cls-1*) の遺伝子欠損線虫は生殖細胞の増殖不全により不妊となったものの、非常に興味深いことに *cls-1* 欠損線虫は筋肉細胞や上皮細胞などの体細胞系列には異常を示さず、体細胞のミトコンドリア機能や構造、細胞増殖能は正常であることも明らかとなった (Sakamoto et al, JBC, 2012)。また、*cls-1* 欠損線虫は活性中心がゲノムから欠失しているにも関わらず、CL は野生型に比べ 40% 残存していた。この結果は *cls-1* に対する RNAi 処理でも再現された。また、線虫以外の解析例として、HeLa 細胞で CL 合成酵素遺伝子に対する RNAi を行っても CL が 40% 程度残存することが報告されている。これらの結果から、研究代表者は以下の 2 つの仮説を立てた。

- ① 線虫には既存の CL 合成酵素 (*cls-1*) を介さない未知の CL 合成経路が存在する。
- ② 体細胞のミトコンドリアでは生命維持のために他のリン脂質が CL の機能を代替する。

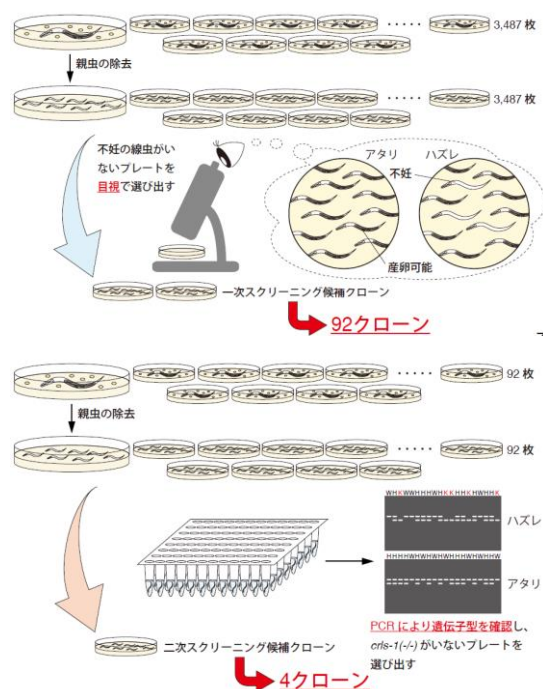
本研究の目的は、この仮説を検証することにより、CL を中心とした線虫の体細胞の生存に関わる必須リン脂質、および CL の機能を

相補する新たな代謝経路 (新規 CL 合成酵素を含む) を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 未知の CL 合成経路の順遺伝学的スクリーニング

順遺伝学的スクリーニングにより、未知の CL 合成経路に関わる分子 (便宜的に *cls-2* と呼ぶ) を同定する。*cls-1* ヘテロ線虫 (*cls-1*(+/-)) からは、*cls-1* 欠損線虫 (*cls-1*(-/-)) が 25% の確率で産まれる。*cls-1*(+/-) に対しエタンメタンスルホン酸処理を行いランダムに点変異を導入し、変異導入により *cls-1*(-/-) の出現率が 25% を大きく下回る *cls-1*(+/-);*cls-2*(-/-) をスクリーニングした (下図参照)。



(2) リン脂質組成の解析

(1) のスクリーニングで得られる *cls-1*(+/-);*cls-2*(-/-) 候補線虫に対して、リン脂質組成がどのように変動しているのか、Bligh and Dyer 法による脂質抽出と Rouser 法によるリン定量により検討した。

(3) PHGPx 欠損線虫の表現型解析

CL の過酸化を抑制する抗酸化酵素である PHGPx の遺伝子欠損線虫を作成し、寿命に関する表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) 未知の CL 合成経路の順遺伝学的スクリーニング

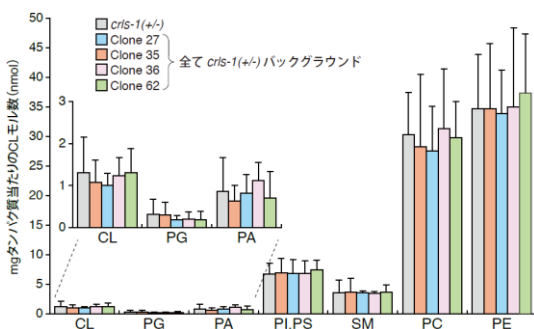
約 1000 匹の P0 世代 *cls-1*(+/-) に対しエタンメタンスルホン酸処理を行いランダムに点変異を導入した。次亜塩素酸処理により F1 世代を取り出し、32,000 匹を 40 本のフリーズストックとして分けて保存した。*cls-1*(-/-) 線虫は生殖細胞の増殖異常によ

り不妊となる。まず、全てのフリーズストックの F2 世代に対して目視により不妊という表現型を示す F3 世代が生まれていないものをスクリーニングした。その結果、92 ラインの *cls-1(+/-);cls-2(-/-)* 候補線虫が得られた。次いで目視よりも正確性を増すための二次スクリーニングを行った。一次スクリーニングで得られた 92 ラインの *cls-1(+/-);cls-2(-/-)* 候補線虫に対して、PCR により *cls-1* の遺伝子型を確認し、*cls-1(-/-)* の出現率が 1%以下に低下するラインを 4 ライン得た (下表参照)。

<i>cls-1(-/-)</i> 出現率		<i>cls-1(+/-)</i> 出現率		<i>cls-1(+/-)</i> 出現率		<i>cls-1(+/-)</i> 出現率		<i>cls-1(-/-)</i> 出現率	
No. 1	13.6%	No. 21	10.8%	No. 41	36.0%	No. 61	27.2%	No. 81	37.2%
No. 2	25.0%	No. 22	11.6%	No. 42	17.5%	No. 62	0.5%	No. 82	20.6%
No. 3	5.2%	No. 23	22.1%	No. 43	16.1%	No. 63	29.2%	No. 83	5.8%
No. 4	-	No. 24	2.3%	No. 44	26.7%	No. 64	34.5%	No. 84	-
No. 5	25.6%	No. 25	18.5%	No. 45	37.1%	No. 65	-	No. 85	9.8%
No. 6	-	No. 26	-	No. 46	26.3%	No. 66	15.9%	No. 86	-
No. 7	25.0%	No. 27	0.5%	No. 47	29.8%	No. 67	-	No. 87	15.4%
No. 8	21.6%	No. 28	27.7%	No. 48	12.9%	No. 68	21.8%	No. 88	15.7%
No. 9	-	No. 29	12.6%	No. 49	20.0%	No. 69	21.1%	No. 89	-
No. 10	23.5%	No. 30	15.7%	No. 50	26.5%	No. 70	24.7%	No. 90	-
No. 11	11.1%	No. 31	25.6%	No. 51	25.0%	No. 71	24.1%	No. 91	7.5%
No. 12	17.1%	No. 32	28.6%	No. 52	10.5%	No. 72	22.0%	No. 92	7.6%
No. 13	32.0%	No. 33	26.3%	No. 53	20.2%	No. 73	25.6%		
No. 14	5.3%	No. 34	15.4%	No. 54	25.0%	No. 74	6.5%		
No. 15	-	No. 35	1.3%	No. 55	27.5%	No. 75	23.5%		
No. 16	42.9%	No. 36	1.0%	No. 56	28.9%	No. 76	7.8%		
No. 17	-	No. 37	27.2%	No. 57	7.5%	No. 77	-		
No. 18	36.2%	No. 38	20.9%	No. 58	21.5%	No. 78	11.3%		
No. 19	21.1%	No. 39	-	No. 59	21.0%	No. 79	-		
No. 20	20.9%	No. 40	30.0%	No. 60	15.1%	No. 80	-		- 未確定

(2) リン脂質組成の解析

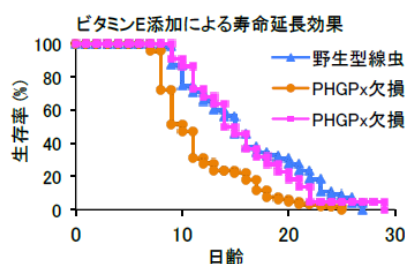
スクリーニングによって得られた 4 ラインの *cls-1(+/-);cls-2(-/-)* 候補線虫に対して CL を含む各種リン脂質の定量を行った。その結果、4 ライン中 2 ラインで若干 CL が減少していたが、他の 2 ラインについては CL 量の変動は見られなかった。また、ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンといった他のリン脂質含量に変動は見られなかった。研究代表者は *cls-1* 欠損線虫に対してホスファチジルセリン (PS) 合成酵素の RNAi を行うと成長停止が起きることを明らかにしているが、スクリーニングによって得られた 4 ラインの *cls-1(+/-);cls-2(-/-)* 候補線虫では PS の含量に変動は見られず、これらの 4 ラインは PS 合成とは無関係に体細胞に異常が現れているものと考えられた (下図参照)。



(3) PHGPx 欠損線虫における寿命短縮表現型に関する解析

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) は活性中心にセレノシステインを有するセレンタンパク

質で、生体膜に生じたリン脂質ヒドロペルオキシドを直接消去できる細胞内唯一の抗酸化酵素である。研究代表者はこれまでに、PHGPx がミトコンドリアに局在する CL の過酸化を抑制することにより、抗アポトーシス作用を示すことを明らかにしている。そこで、PHGPx 欠損線虫を作成し寿命を解析したところ、野生型線虫に比べ数日寿命が短くなることが明らかになった。また、脂溶性の抗酸化ビタミンである α トコフェロールを PHGPx 欠損線虫に与えることにより、寿命が野生型と同レベルに回復することを明らかにした。ミトコンドリアにおいてどの程度 CL の過酸化が亢進しているかは未検討であるが、CL の過酸化が個体の寿命を制御することを示唆するものと研究代表者は考えている (下図参照)。



本研究では、線虫の体細胞における新たな CL 合成経路に関わる分子 (*cls-2*) を単離することを目的とし、その順遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、*cls-2* に変異が導入されている可能性のある変異線虫が 4 ライン得られた。今後、どの遺伝子に変異が導入されているかを同定することにより、体細胞のミトコンドリアが CL の減少という危機的状況をどのように回避するのか、その分子基盤が明らかになることが期待される。また、線虫で見出した新たな CL の相補システムがヒトにおいても存在するのか解析することで、ヒトへの応用も可能になると考えられる。CL の代謝異常に起因する遺伝性疾患として Barth 症候群が知られており、本症候群患者ではミトコンドリアの機能低下が誘発される。本研究において、新規の CL 合成経路や CL の機能を代替するリン脂質が明らかになれば、Barth 症候群患者に対して、既存の CL 合成経路をバイパスして CL 量を回復させる、あるいは CL 以外のリン脂質によりミトコンドリアを再活性化する、という新しい治療モデルを提供することが可能となり、その社会的意義は大きいと研究代表者は考える。

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)

[学会発表] (計 6 件)

①前林花那, 坂本太郎, 今井浩孝

PHGPx 欠損線虫における VE による寿命延長効果

日本薬学会第 136 年会 (2016/3/29 パシフ

イコ横浜（神奈川県）

②坂本太郎，前林花那，今井浩孝
抗酸化酵素 PHGPx 欠損線虫へのビタミン E 投与による寿命延長効果
第 27 回ビタミン E 研究会（2016/1/8 アルファあなぶきホール（香川県））

③前林花那，坂本太郎，今井浩孝
リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ欠損線虫における老化促進効果の解析
第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会（2015/12/2 神戸ポートアイランド（兵庫県））

④坂本太郎，前林花那，今井浩孝
抗酸化酵素 PHGPx による線虫の寿命制御に関する研究
第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会（2015/6/11 かがしま県民県民ホール（鹿児島県））

⑤坂本太郎，前林花那，今井浩孝
PHGPx 欠損線虫における老化促進効果の解析
第 57 回日本脂質生化学会（2015/5/29 一橋大学（東京都））

⑥坂本太郎，前林花那，今井浩孝
グルタチオンペルオキシダーゼ欠損線虫における老化促進効果の解析
日本薬学会第 135 年会（2015/3/26 神戸学院大学（兵庫県））

〔図書〕（計 1 件）

サイトカイン・増殖因子キーワード事典（羊土社）
第 8 章 脂質メディエーター「HETE, LX」
p334-336, 2015
坂本太郎、今井浩孝

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 太郎 (SAKAMOTO TARO)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：10383655

(2) 研究協力者

前林 花那 (MAEBAYASHI KANA)
下郡 萌 (SHIMOGOORI MOE)
高橋 明日香 (TAKAHASHI ASUKA)
富永 啓太 (TOMINAGA KEITA)
三澤 香梨 (MISAWA KAORI)
廣吉 遼 (HIROYOSI RYO)