

令和 元 年 8 月 9 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 181

氏 名 莫山 明慶

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ケルン （国名： ドイツ ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
小胞体とミトコンドリア間におけるリン脂質輸送メカニズムの解明
3. 派遣期間：平成 29 年 7 月 18 日 ～ 令和 元年 7 月 17 日
4. 受入機関名及び部局名
Max Planck Institute for Biology of Ageing マックスプランク老化学研究所
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

ミトコンドリアは ATP 産生、カルシウム貯蔵、アポトーシス、脂質代謝、自然免疫反応など、細胞の多様な機能制御に関与しているオルガネラであり、高等生物が生命活動を営むうえで無くてはならない存在である。ミトコンドリアは二重の生体膜で構成されており、その生体膜の主成分はリン脂質である。リン脂質はミトコンドリアに限らず、オルガネラなどを構成する生体膜の主成分であるが、ミトコンドリアは独自のリン脂質であるカルジオリピン(CL)を有している。ミトコンドリアが正常に機能を発揮するためには、CL は重要なリン脂質であり、哺乳類では CL の代謝酵素がバース症候群の原因遺伝子として同定されている。CL はミトコンドリアの内膜において、小胞体由来のホスファチジン酸(PA)から、CDP-ジアシルグリセロール(CDP-DAG)、ホスホホスファチジルグリセロール(PGP)、ホスファチジルグリセロール(PG)、カルジオリピン(CL)と、4 段階の反応を経て合成される。CL の合成は小胞体からミトコンドリアへの脂質輸送に依存し、その輸送は両者のコンタクトサイトで行われていると考えられている。しかし、小胞体とミトコンドリア間で脂質輸送がどのように制御されているのか、あまり理解が進んでいない。加えて、PA 以外の CL の前駆体である脂質が、小胞体からミトコンドリアに輸送されるかどうかとも明らかとなっていない。

CL の前駆体の一つであるホスファチジルグリセロール(PG)は、ミトコンドリアでは Gep4 によって合成される。また、PG は CL だけでなく、他の脂質の前駆体でもあり、その合成を Protein A が担う。加えて、Gep4 欠損細胞ではミトコンドリアの CL 量が減少するが、Protein A とダブルで欠損させる(細胞内の PG 量を上昇させる)と、ミトコンドリアの CL の量が増加することを、所属ラボの先行研究により明らかにしている。つまり PA の他に、PG もミトコンドリアに輸送され、CL 合成に利用されていることが考えられる。そこで本研究は、PG を始めとする、PA 以外の CL 前駆体脂質のミトコンドリア輸送機構を解明することで、リン脂質全般のミトコンドリアへの輸送メカニズムの理解に繋げることを目標とした。

PG 合成酵素の Gep4 を欠損した細胞は生育不全を示すことがわかっている。一方、Gep4 に加え、Protein A も欠損させて PG 量を上げると、上述のようにミトコンドリアの CL 量が上昇するが、この時、細胞の生育も回復する。このことから、Gep4 欠損細胞は PG 輸送の促進を引き金として、細胞の生育が回復すると考えられる。よって、酵母の遺伝子欠損ライブラリーにて、小胞体からの PG 輸送に関与する因子が欠損している場合、*GEP4* と Protein A をコードする *GENE A* のダブルノックアウト細胞と掛け合わせ、トリプルノックアウト状態にすると、細胞は生育不全を示すことになる。よって初めに、このスクリーニングを実行した。結果として 700 以上の遺伝子が、*GEP4* と *GENE A* のダブルノックアウト細胞と掛け合わせると生育不全を示した。ここで候補因子を絞り込むため、過去の報告で代替の CL 合成経路の存在を示唆するデータに着目した。PA のミトコンドリア内における外膜から内膜への輸送は Ups1 が担っている。Ups1 欠損細胞でもミトコンドリアの CL 量が減少し、細胞の生育不全も示す。その Ups1 の他に、ミトコンドリア内のリン脂質輸送を担うタンパク質として Ups2 が存在し、この因子はホスファチジルセリン(PS)をミトコンドリア外膜から内膜へと輸送する。ミトコンドリアの PS も小胞体由来と考えられており、小胞体にて PA から CDP-DAG、PS の順に合成される。過去に、Ups1 と Ups2 の両方を欠損した細胞では、Ups1 単独の欠損で見られた CL 量の減少が抑制され、細胞の生育も回復することが報告されている。これらの結果から、*UPS1*、*UPS2* ダブルノックアウト細胞において、PA や CDP-DAG の CL 前駆体脂質の小胞体での蓄積がおこり、CL の代替の合成経路を活性化させていると考えた。よって Ups1、Ups2 の両方を欠損した細胞を用いて、*GEP4* と *GENE A* のダブルノックアウトと同様のスクリーニングも行った。その結果 400 ほどの遺伝子が、*UPS1*、*UPS2* ダブルノックアウト細胞とネガティブな遺伝的相互作用を示した。これらのスクリーニング結果を参照すると、両方のスクリーニングでヒットした因子は 87 あり、そのうち細胞の生育に general に関与するであろう因子を除くと、その数を 45 まで絞りこむ

ことができた。次にこれらの因子が、実際に CL の合成に影響を及ぼしているのかを調べるため、*UPS1*、*UPS2* と、各候補因子の遺伝子を欠損した三重欠損株を用いて、リピドミクスにより CL の量を計測した。結果として、20 ほどの因子で、CL の量の減少が確認できた。その中には、過去にミトコンドリアと小胞体のコンタクト制御に関与すると報告された因子も含まれている。また、スクリーニングの結果から、ある脂質合成に関与する Protein B の機能解析を行うと、小胞体における PG の合成制御にも関与し、それが CL の代替の合成経路を促進するのに重要であることを示唆するデータも見出した。よって今後は、上述のスクリーニング結果と、Protein B が担う脂質の新規合成経路を早期に論文にまとめ、報告する予定である。

また当該プロジェクトの研究を進めていくなかで生じた新たな疑問から、とある仮説を立て検証を行った結果、非常に興味深い現象を見出し、当該プロジェクトの枠には収まらない大きな発展を遂げることができた。前述のように *Ups1* 欠損細胞では、ミトコンドリア内における PA 輸送が阻害され、ミトコンドリアにおける CL 量が減少し、細胞が生育不全を示す。この PA は小胞体から小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイトを介してミトコンドリアに運び込まれると考えられている。ここから、*Ups1* 欠損によるミトコンドリア内の PA 輸送の阻害は、小胞体の脂質組成にも影響を与えるのではないかと考えた。そこで、小胞体由来の膜成分が豊富に含まれる膜画分(マイクロソーム画分)を細胞から単離し、脂質組成をリピドミクスにより解析した結果、ホスファチジルエタノールアミン(PE)とホスファチジルコリン(PC)の量に変化が見受けられ、特に PE/PC 比が減少していた。PE/PC 比の変化は小胞体におけるストレス応答機能の一つ Unfolded Protein Response (UPR)に影響与えることが知られている。小胞体へのストレスは、小胞体に misfolding した異常タンパク質が蓄積することで引き起こされるが、細胞はそのストレス状況を改善し、恒常性を維持するための機能を備えている。小胞体に異常なタンパク質が蓄積すると、センサータンパク質である Ire1 がそれを感知し、転写因子である Hac1 を活性型に変化させ、シャペロンタンパク質など、異常タンパク質の蓄積を回避するような因子の発現を促進する。この一連の制御を Unfolded Protein Response (UPR)と呼ぶ。はじめに、UPR の活性を解析できるレポーター遺伝子(UPRE-GFP)を有している細胞を用いて、*Ups1* 欠損細胞の UPR 活性を通常の培養条件下で調べた。このレポーター遺伝子を用いることで、検出できる GFP の発現レベルによって UPR の活性を定量解析することができる。非常に興味深いことに、*Ups1* 欠損細胞では野生型に比べ、通常の生育条件下において、UPR の活性が抑制されていることを見出した。過去の報告から、PE/PC 比の上昇が UPR に正に作用することが知られていることから、*Ups1* 欠損細胞では、それとは反対の PE/PC 比の変化により、UPR に対して負の影響を与

えていると考えられる。そこで、PE/PC 比の減少が普遍的に UPR に負に影響するかどうかを判断するため、野生型の細胞に PC の合成に使われるコリンを加えて、PC の量のみを増加させたところ、UPR が抑制されることが判明した。つまり、Ups1 欠損細胞での UPR の抑制は PE/PC 比の減少に起因する可能性が高くなった。加えて、ER ストレスを引き起こすツニカマイシンや、UPR のセンサータンパク質である Ire1 を過剰発現させて UPR を活性化させたところ、UPS1 ノックアウト細胞において、細胞の生育が回復することを確認した。つまりこれらの結果は、Ups1 欠損における細胞の生育が、UPR の活性に相関していること示唆している。また、Ire1 を過剰発現している Ups1 ノックアウト細胞での CL の量を解析したところ、CL 量の回復は確認できなかった。よって、UPS1 ノックアウト細胞では、CL の減少とは独立して、UPR の活性と細胞の生育がリンクしていることを示唆している。次に、Ups1 欠損細胞の生育不全と、UPR の活性化による生育回復の実態を解明するため、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、通常の培養条件において、UPS1 ノックアウト細胞では野生型と比べてリボソーム合成が減少制御されていることがわかった。一方、ツニカマイシン処理した Ups1 欠損細胞では、処理前と比べてリボソーム合成が上昇制御されているデータを示した。そこで、リボソーム合成に関与する Protein C や Protein D を欠損させたところ、UPS1 ノックアウト細胞で確認できていたツニカマイシン処理による生育回復が、キャンセルされることを見出した。以上のように、ミトコンドリアにおける PA 輸送の阻害は、ミトコンドリア内での脂質の組成変化を引き起こすだけに留まらず、別のオルガネラである小胞体の脂質変化や機能抑制、加えて、リボソーム合成の減少制御などを誘発して、生育不全を示すことが示唆された。

小胞体とミトコンドリア間のリン脂質輸送メカニズムの解明を目指し、研究を行った結果、まず、当初の目的に即して、このメカニズムに関与するであろう因子を同定した。また、同定因子の中に、既知のものとは違う新規の脂質合成制御を有していることと、その制御が CL の代替の合成経路の促進に重要であろうことを見出した。加えて、ミトコンドリア内での PA 輸送が、小胞体の正常な脂質組成を維持し、UPR の活性に重要であること、そして、リボソーム合成にも関与し、最終的に細胞生育を維持することに重要であることを見出し、研究が大きく展開した。今後はこれらの結果を論文として世界に発表していく予定である。