

論文内容要旨（和文）

氏名 椎野 浩也

論文題目 細胞内局在改変リン脂質合成酵素及びリン脂質合成阻害剤開発による脂質代謝機構の解析

真核細胞内には脂質二重膜で囲まれたオルガネラが発達している。オルガネラが正常に機能するためには、オルガネラ膜の主成分であるリン脂質が、そのオルガネラ膜にとって適切な組成で維持されることが重要である。リン脂質の一部は小胞体（ER）膜とミトコンドリア内膜間をシャトルしながら合成される。例えば、ERで合成されたホスファチジルセリン（PS）は、ミトコンドリア内膜へ輸送され、PS脱炭酸酵素によってホスファチジエタノールアミン（PE）に変換される。PEはさらに、ミトコンドリアからERに輸送され、ERに局在するPEメチル化酵素によってホスファチジルコリン（PC）に変換される。このように、オルガネラ膜を超えたリン脂質輸送が、リン脂質の合成に必須である一方で、水に溶けにくい脂質分子がどのようにしてサイトゾルや、ミトコンドリア膜間部といった水溶性の区画を横切って、異なるオルガネラ膜へと輸送されるのかは長年不明であった。近年、所属研究室を含めた複数の研究グループによりPSの輸送因子（ERMES, Ups2-Mdm35）などが同定され、ミトコンドリアを介したリン脂質輸送機構の一端が明らかとなった（Kojima et al. *Sci. Rep.* 2016; Miyata et al., *JCB*, 2016; Kawano et al. *JCB*. 2018）。しかし、オルガネラ膜に最も多く存在するリン脂質PCやその前駆体となるPEなど、その他多くのリン脂質の輸送因子はほとんど明らかになっておらず、オルガネラ間リン脂質合成輸送機構には依然として不明な点が多い。このような基礎的な問題が未解決である原因として、リン脂質の細胞内動態を解析する手法が乏しいことが挙げられる。そこで本研究では、細胞内でリン脂質動態を解析できる新しい実験系の構築及びリン脂質代謝を特異的に阻害する化合物を開発することで、リン脂質の細胞内輸送機構やリン脂質が持つ生理的意義の解明を目指した。

まず、細胞内でリン脂質動態を解析するために、リン脂質合成酵素の細胞内局在区画を強制的に改変した変異酵母株の作成を行った。上述の通り、出芽酵母では、ERに局在するPS合成酵素Chol1によってPSが合成され、その後PSがミトコンドリアに輸送され、PEに変換される。そのため、PE合成にはERからミトコンドリアへのリン脂質輸送が必須となる。すなわち、Chol1の局在をERから他のオルガネラに変化させることができれば、PSからPEへの変換をモニターすることによって、ER以外のオルガネラからミトコンドリアへのリン脂質輸送を測定できるはずである。しかし、Chol1は複数回膜貫通タンパク質であり、内在性の小胞体局在化シグナルを有するため、その局在を人為的に変化させることは困難である。そこで、可溶性のタンパク質である大腸菌PS合成酵素PssAに着目し、PssAに様々なオルガネラ移行シグナル配列を付加することでその細胞内局在を操作した。このようなPssA変異体をChol1欠損細胞に発現させ、細胞内の異なる場所で合成されたPSの運命をモニターすることで、リン脂質輸送経路の解析を試みた。本研究により、PssAをChol1欠損株のミトコンドリア、小胞体、ペルオキシソーム、脂肪滴といった異なるオルガネラに発現させても、Chol1欠損株による増殖阻害を部分的に回復することがわかった。また、¹⁴C-Serineを用いて放射性同位体標識したPSを合成し、その運命を追跡したところ、合成されたPSがPEに、そしてその後PCに変換されることを確認した。これらの結果から、ER以外のオルガネラからミトコンドリア

アへPSを輸送する経路が存在することや、ミトコンドリア内膜のマトリクス側リーフレットで合成されたPSが膜間部側リーフレットへ効率よく移動することが示唆された。

第2に本研究では、リン脂質代謝の阻害剤を開発し、リン脂質の生理的意義の解析に利用した。阻害剤を用いてリン脂質合成や輸送を急激に阻害することができれば、遺伝子欠損細胞の環境適応の影響を抑えた解析が可能になると期待される。まず、酵母を用いた化学遺伝学的スクリーニング系を開発し、ホスファチジルコリン(PC)の生合成を阻害できる低分子化合物を単離しPCiB-1, 2, 3, 4と命名した。PCiB-1, 2, 3, 4を用いて遺伝学的および生化学的解析を行ったところ、PCiB-2, 3, 4はCho2のPEメチル化活性を阻害し、PCiB-1はミトコンドリアからERへのPE輸送ステップを阻害することが示唆された。また、PCiB化合物で処理した酵母細胞ではミトコンドリアが著しく断片化することを見出した。これらの結果から、PCがミトコンドリア分裂を制御する生理機能を持つこと明らかとした。

これらの研究成果は、これまで解析することが困難だったリン脂質代謝機構の解明に大きく貢献できるものである。特に、本研究で得られたPCiB化合物は、酵母における初めてのPC生合成阻害剤であり、PCの生理的役割やミトコンドリア形態形成のメカニズムを解析する研究ツールとして利用できる可能性がある。

論文内容要旨 (英文)

氏名 椎野 浩也



論文題目 Analysis of the mechanism of lipid metabolism by developing subcellularly localized modified phospholipid synthase and inhibitors of phospholipid synthesis

Phospholipids, main components of organelle membranes are crucial for maintaining organelle functions. As phospholipid synthetic enzymes are localized in the restricted organelle membranes, such as the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondrial inner membrane (MIM), phospholipids must be transported to different organelles from the site of synthesis. However, the mechanisms of the intracellular phospholipid transport are not well understood. To tackle these problems, we developed a new experimental system that can analyze intracellular phospholipid dynamics. Moreover we isolated small molecule compounds that inhibits phospholipid synthesis or transport and used them to analyze a physiological role of phosphatidylcholine.

Specifically, we expressed *E. coli* phosphatidylserine (PS) synthase PssA in various organelle membrane compartments with distinct membrane topologies in yeast cells lacking a solo PS synthase Cho1. Interestingly, PssA could complement loss of Cho1 when targeted to the ER, peroxisome or lipid droplet (LD) membrane. The synthesized PS could be converted to phosphatidylethanolamine (PE) by Psd1, the mitochondrial PS decarboxylase, suggesting that PS synthesized in peroxisome and LD can efficiently reach to mitochondria. Furthermore, we found that PssA integrated into the mitochondrial inner membrane (MIM) from the matrix side could partly complement of loss of Cho1. The PS synthesized in the MIM was also converted to PE, indicating that PS translocates across the MIM to be PE. These findings expand our understanding of the intracellular phospholipid transport routes via mitochondria.

We also performed a chemical-genetic screening using yeast and identified small molecules capable of inhibiting PC biogenesis, which we designated PC inhibitors 1, 2, 3, and 4 (PCiB-1, 2, 3, and 4). Biochemical analyses indicated that PCiB-2, 3, and 4 inhibited the PE methyltransferase activity of Cho2, whereas PCiB-1 may inhibit PE transport from mitochondria to the ER. Interestingly, we found that PCiB treatment resulted in mitochondrial fragmentation, which was suppressed by expression of a dominant-negative mutant of the mitochondrial division factor Dnm1. These results provide evidence that normal PC biogenesis is important for the regulation of mitochondrial division.

学位論文の審査及び学力確認の結果の要旨

令和6年 8月 1日

理工学研究科長 殿

論文博士論文審査委員会

主査 田村 康

副査 近藤 慎一

副査 渡邊 康紀



学位論文の審査及び学力確認の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	氏名 椎野 浩也		
論文題目	細胞内局在改変リン脂質合成酵素及びリン脂質合成阻害剤開発による脂質代謝機構の解析		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	令和6年7月17日 ~ 令和6年7月29日
論文公聴会	令和6年7月29日	場所	理学部1号館14番教室
学力確認結果	合格	学力確認年月日	令和6年7月29日

学位論文の審査結果の要旨 (1,000字程度)

ホスファチジルセリン (PS) は小胞体で合成された後、ミトコンドリアで脱炭酸され、ホスファチジルエタノールアミン (PE) に変換される。このPEは再び小胞体へ輸送されメチル化されることでホスファチジルコリン (PC) へと変換される。このようにリン脂質の合成には、異なるオルガネラ膜間における脂質輸送が必須であるが、疎水的な脂質分子がどのように水溶性の細胞区画を乗り越えて、異なる生体膜へと移動するメカニズムについては不明な点が多い。

本学位論文では、細胞内リン脂質交通経路の解明を目指し、細胞内局在改変リン脂質合成酵素の開発による脂質輸送機構の解析を行った。具体的には、本来小胞体に局在するPS合成酵素を、異なるオルガネラ膜上に強制的に局在化させることで、さまざまな場所で合成されたPSがミトコンドリアへ輸送されるかを、PSからPEへの変換を指標に解析した。その結果、脂肪滴やペルオキシソームからミトコンドリアへリン脂質を輸送する経路があることを見出した。またミトコンドリア内膜のマトリクス側で合成されたPSの膜間部側へフロップを検出する実験系を確立することに成功した。

本学位論文ではさらに、細胞内リン脂質代謝の研究ツール開発を目指し、20万種類以上の化合物の中からリン脂質代謝を阻害する化合物をスクリーニングした。その結果、PC合成を阻害する化合物を複数単離し、それを利用することで、PCがミトコンドリアの分裂制御に重要な役割を果たすことを発見した。以上から、論文申請者が、これまでに例のない新規性、独自性の高い研究テーマを推進し、細胞内リン脂質交通経路や、リン脂質が持つ生理的意義に関する新規知見を得たことを確認した。

本学位論文は4章で構成され、第1章では、研究の背景、目的が専門知識を基に正しく述べられていた。第2章では、研究を推進した際の実験材料及び実験方法が過不足なく、丁寧に記述されていた。また、第3、4章では研究目的を達成するために仮説をたて、それを実験により検証した結果と考察が論理的に記述されていた。学位論文の構成が適切で、体裁が整っていること、論文の記述が論理的で設定した研究テーマにそった明確な結論が述べられていることから、本論文が山形大学大学院理工学研究科博士後期課程の学位論文審査基準を満たしていると判断し、博士学位論文審査を合格と判定した。

また本論文は、研究倫理又は利益相反等に係る学内規則に基づく手続きは必要ありません。

学力確認の結果の要旨

公聴会実施後、論文内容を中心に、生物化学、細胞生物学、遺伝学等に関する口頭試問を行い、学力確認を行った。主査、副査の質問に対して適切に回答できたことから、申請者が博士の学位取得に十分な専門知識、学力を身につけていると判断した。以上から、学力確認の結果を合格と判定した。