

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：83206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18534

研究課題名（和文）ミトコンドリアー小胞体間の物理的結合を形成するERMES複合体の機能解明

研究課題名（英文）Functional elucidation of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure (ERMES) complex

研究代表者

小島 理恵子 (Kojima, Rieko)

富山県薬事総合研究開発センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：60769652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の中には、核や小胞体など、膜で囲まれた様々な機能をもつオルガネラが存在しています。近年、異なるオルガネラ同士が物理的に結合し、オルガネラコンタクトサイトを形成することが明らかになってきましたが、オルガネラコンタクトの機能には不明な点が多く残っています。本研究では、ミトコンドリアと小胞体を物理的に結合させるERMES複合体に着目し、ERMES複合体がミトコンドリアと小胞体の間で脂質を輸送する役割をもつことや、ERMES複合体の機能が脂質の不飽和度と関わっていることなどを見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアと小胞体間のオルガネラコンタクトは、神経変性疾患等の病気とも深く関わっていることが知られているため、オルガネラコンタクトの機能の理解を深めることは、これらの病気の原因メカニズム解明や将来的な治療へと結びつく可能性があり、重要な研究であると考えられます。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have shown that different organelles physically bind to each other to form an organelle contact site. Organelle contacts are physiologically important because they are associated with diseases such as neurodegenerative diseases, but their functions are not well understood. In this study, we investigated the function of the ERMES complex that physically binds mitochondria to endoplasmic reticulum (ER) and revealed that the ERMES complex plays an important role in transporting phospholipids between mitochondria and ER. We also showed that the ERMES complex is functionally related to the degree of lipid unsaturation.

研究分野：細胞生物学，構造生物学

キーワード：オルガネラコンタクト ERMES 脂質輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オルガネラは長い間独立に存在し、機能していると考えられてきたが、2009年に酵母細胞においてミトコンドリアと小胞体の一部を物理的に結合させるタンパク質複合体として、ERMES複合体が同定されたことにより、異なるオルガネラ同士がメンブレンコンタクトサイト (MCS) を形成し機能的に連携していることが明らかとなった (Kornmann et al., *Science*, 2009)。ERMES複合体を構成する因子はリン脂質結合ドメインを有していることから、ERMES複合体がミトコンドリア-小胞体間でリン脂質輸送に関与することが示唆されていた一方、リン脂質輸送への関与を否定する論文も複数報告されており、ERMES複合体のリン脂質輸送能については議論となっていた (Kornmann et al., *Science*, 2009, Nguyen et al., *Traffic*, 2012)。酵母細胞において、ERMES複合体の構成因子が1つでも欠損すると強い増殖阻害を引き起こし、ミトコンドリアの形態やリン脂質組成にも異常を示すことから、重要な機能を持っていることは明らかであったが、研究開始当初はERMES複合体の機能についての明確なコンセンサスが存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究は、①ERMES複合体がリン脂質輸送能をもつか検証すること、②ERMES複合体構成因子欠損細胞の増殖阻害を回復させるマルチコピーサプレッサー遺伝子を単離し、その遺伝子の機能を調べることで、①の二点によって、ERMES複合体の主要機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

In vitro リン脂質輸送実験系の構築と、それを活用したERMES複合体のリン脂質輸送能の検証実験

ERMES複合体のリン脂質輸送能の有無が明らかでない原因として、リン脂質輸送を評価する実験系が確立されていないことや、ERMES複合体のもつ脂質輸送能が他のMCSによりバックアップされるため、ERMES複合体にターゲットを絞った細胞レベルでの解析が困難であること等が考えられた。そこで、ミトコンドリア-小胞体間におけるリン脂質輸送を直接的に評価するための*in vitro*実験系を構築することにした。酵母細胞からミトコンドリアと小胞体を含む膜画分を調製し、¹⁴C-Serineを加えて30分で一定時間インキュベートすることにより、小胞体で新たに合成されるホスファジチルセリン (PS) をラベルした。ラベルされたPSはミトコンドリアに輸送され、内膜に存在するPS脱炭酸酵素によりホスファチジルエタノールアミン (PE)へと変換された後、さらに小胞体に輸送されて小胞体膜上のPEメチル化酵素によりホスファチジルコリン (PC)へと変換される (図1A)。この一連のリン脂質合成・輸送反応 (PS → PE → PC) をモニターすることにより、ミトコンドリア-小胞体間のリン脂質輸送を評価した。また、ERMES複合体構成因子欠損株から膜画分を調製し、*in vitro*リン脂質輸送実験を行うことにより、ERMES複合体がリン脂質輸送能をもつか調べた。

ERMES複合体構成因子欠損株のマルチコピーサプレッサー遺伝子の単離と機能解析

ERMES複合体構成因子の1つであるMmm1を欠損させた酵母細胞の増殖阻害を回復させるマルチコピーサプレッサー遺伝子として、*SPT23*, *MGA2*, *YOR228C*, *YGR250C*の4つの遺伝子を単離した。*Spt23*と*Mga2*は互いに相同な転写因子で、 $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和酵素をコードする*OLE1*の転写を活性化する。*YOR228C*はERMES複合体構成因子Mdm10を欠損させた細胞のマルチコピーサプレッサー*MCPI*として報告されており、ミトコンドリアのリン脂質とエルゴステロールの割合の調節に関わる事が示唆された (Tan et al., *J Cell Sci.*, 2013)。また*YGR250C*はグルコース飢餓により形成されるストレス顆粒に局在する、機能未知のタンパク質である (Buchan et al., *J Cell Biol.*, 2008)。これらの4つのマルチコピーサプレッサー遺伝子の機能を調べることで、ERMESの主要機能の解明を試みた。まず、これらの遺伝子がMmm1欠損細胞だけでなく、他のERMES複合体構成因子の欠損細胞の増殖阻害を回復させるか調べた。次に、ERMES複合体構成因子の欠損によるミトコンドリアの形態異常およびリン脂質組成異常を回復させるかを調べた。機能未知である*YGR250C* (*RIE1* (Restoration of Impaired growths of ERMES-lacking cells 1)と名付けた)については、単独欠損細胞およびERMES複合体構成因子との二重欠損細胞を作製し、細胞増殖実験およびミトコンドリアの形態観察を行った。最後に、*OLE1*の過剰発現がERMES複合体構成因子の欠損細胞の増殖阻害や形態異常、リン脂質組成異常を回復させるかを調べた。

4. 研究成果

In vitro リン脂質輸送実験系の構築と、それを活用したERMES複合体のリン脂質輸送能の検証実験

野生型酵母細胞から調製したミトコンドリアと小胞体を含む膜画分に、¹⁴C-Serineを加えてインキュベートすることにより、¹⁴CラベルされたPSが合成され、インキュベーション時間が長くなるにつれてPE、PCが合成されていく様子が確認できた (図1B, WT)。この反応系で合成される全てのリン脂質を合計したTotalの値は時間とともに増加するがPSの割合 (PS/Total)は減少した (図1B, C, D)。PSの割合の減少は、小胞体からミトコンドリアへPSが輸送されPEやPC

に変換された結果,すなわち PS の輸送効率を示していると考えられる。ERMES 複合体構成因子である Mmm1 および Mdm12 を欠損した細胞では,PS の減少 (=PS の輸送) が顕著に遅くなったことから(図 1D),ERMES が小胞体からミトコンドリアへの PS 輸送に直接的に関与していることが示された。一方,PE のミトコンドリアから小胞体への輸送効率 ((PDME+PC)/PE) は, Mdm12 欠損細胞では野生型細胞と変わらず, 予想外にも Mmm1 欠損細胞では野生型細胞よりも速かった(図 1E)。このことから,PE のミトコンドリアから小胞体への輸送には ERMES は必要ではないことに加えて,PE の輸送には未知の因子が関与していることが示唆された。本成果は 2016 年に Scientific Reports 誌に掲載された。また本成果と関連して,共同研究により, Mdm12 の疎水性ポケットにリン脂質が tail-in の配向で結合することや, Mmm1 と Mdm12 の複

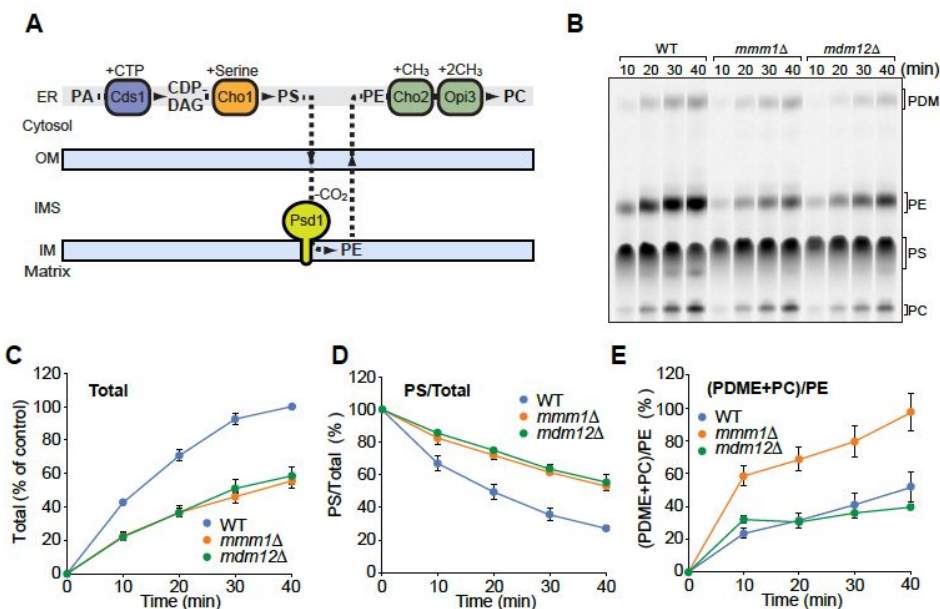


図1 ERMES複合体は小胞体からミトコンドリアへのホスファチジルセリン (PS)の輸送に関与する

合体がリン脂質輸送の最小単位として機能することを X 線結晶構造解析等を用いて明らかにし, 成果が 2018 年に Journal of Cell Biology 誌に掲載された。

ERMES 複合体構成因子欠損株のマルチコピーサプレッサー遺伝子の単離と機能解析

Mmm1 欠損細胞のマルチコピーサプレッサー遺伝子として単離した *SPT23*, *MGA2*, *MCPI*, *RIE1* が, Mmm1 欠損細胞だけでなく他の ERMES 複合体構成因子欠損細胞の増殖も部分的に回復させることに加えて,ミトコンドリアの形態異常も部分的に回復させることを明らかにした(図 2)。これらのことから,ミトコンドリアの増殖および形態維持に ERMES が必須ではないことが示唆された。次に, ERMES 欠損細胞におけるカルジオリピン (CL)量の減少を回復させるかを調べたところ, Rie1 の発現により Mmm1 欠損細胞のみにおいて CL 量の回復傾向が見られたが,他の組み合わせでは回復が見られなかった。Rie1 の単独欠損株細胞では細胞増殖阻害は見られず, ERMES 複合体構成遺伝子とも遺伝的相互作用を示さなかったことから(図 3), Rie1 は酵母細胞の生育とミトコンドリア形態に必要なことが分かった。Spt23 と Mga2 により転写が活性される *OLE1(Δ9)* 脂肪酸不飽和

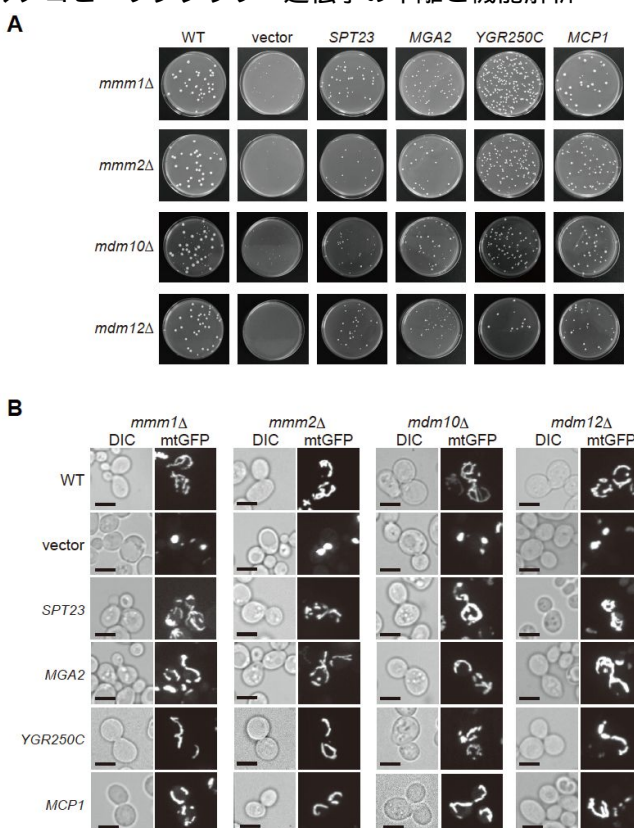


図2 Mmm1欠損細胞のマルチコピーサプレッサー遺伝子は,他のERMES複合体構成因子欠損細胞の細胞増殖阻害およびミトコンドリア形態異常を部分的に回復させる

酵素をコードする)をGPDプロモーター制御下で過剰発現させたところ,ERMES複合体構成因子欠損細胞の増殖阻害は部分的に回復したが,ミトコンドリアの形態異常およびCL量の減少は回復しなかった(図4)。これらのことから,Spt23とMga2がOLE1以外の未同定の遺伝子の転写を活性化することにより,ミトコンドリアの形態を回復させている可能性が示唆された。実際に,Mga2が転写を促進することが報告されているERG5(ステロールC-22側鎖不飽和化酵素をコードする遺伝子)の過剰発現によってもERMES欠損細胞の増殖が回復することから(図4A),ERMESの機能は脂質の不飽和度と関連していることが示唆された。これらの成果は2016年にFEBS Letters誌に掲載された。一方,これらマルチコピーサプレッサー遺伝子の発現により,細胞増殖阻害やミトコンドリアの形態異常が回復するにもかかわらずCL量が回復しない理由や,Ole1の過剰発現により増殖が回復するがミトコンドリア形態は回復しない理由,Rie1のもつどのような機能がERMES欠損細胞における様々な異常な表現型を相補しているのか等,現時点で不明な点も多く,今後さらなる研究により明らかにしたいと考えている。

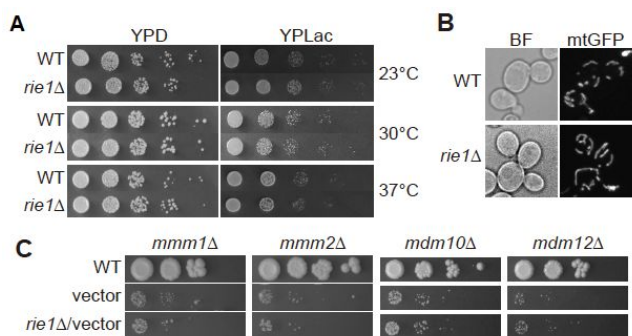


図3 Rie1は細胞増殖およびミトコンドリア形態維持に必須でない

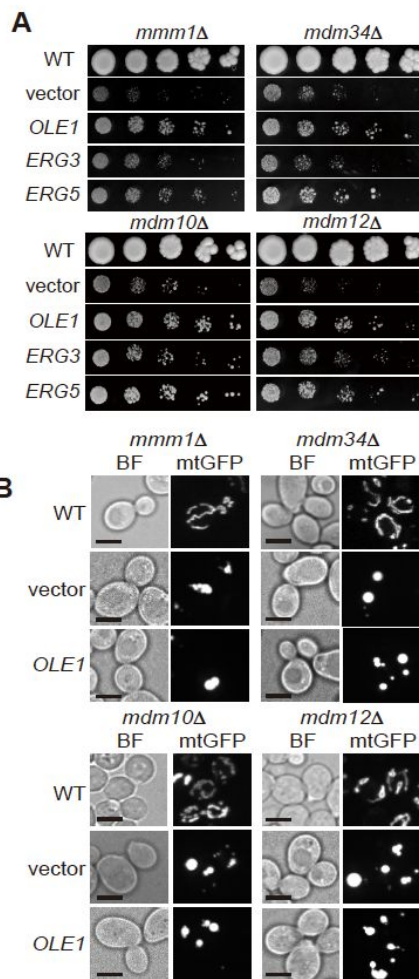


図4 脂質不飽和化酵素の過剰発現により,ERMES複合体構成因子欠損細胞の増殖阻害が部分的に回復する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Obita Takayuki, Kojima Rieko, Mizuguchi Mineyuki	4. 巻 1998
2. 論文標題 Crystallization and Biophysical Approaches for Studying the Interactions Between the Vps4-MIT Domain and ESCRT-III Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 175 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9492-2_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura Yasushi, Kojima Rieko, Endo Toshiya	4. 巻 1949
2. 論文標題 Advanced In Vitro Assay System to Measure Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Transport at ER/Mitochondria Interface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 57 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9136-5_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kojima Rieko, Kakimoto Yuriko, Furuta Shiina, Itoh Kie, Sesaki Hiromi, Endo Toshiya, Tamura Yasushi	4. 巻 26
2. 論文標題 Maintenance of Cardiolipin and Crista Structure Requires Cooperative Functions of Mitochondrial Dynamics and Phospholipid Transport	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 518 ~ 528.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.12.070	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 Kakimoto Yuriko, Tashiro Shinya, Kojima Rieko, Morozumi Yuki, Endo Toshiya, Tamura Yasushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24466-0	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 Kakimoto Yuriko, Tashiro Shinya, Kojima Rieko, Morozumi Yuki, Endo Toshiya, Tamura Yasushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24466-0	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 Kawano Shin, Tamura Yasushi, Kojima Rieko, Bala Siqin, Asai Eri, Michel Agnes H., Kornmann Benoit, Riezman Isabelle, Riezman Howard, Sakae Yoshitake, Okamoto Yuko, Endo Toshiya	4. 巻 217
2. 論文標題 Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1-Mdm12 of ERMES	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 959 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201704119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miwa Kohei, Kojima Rieko, Obita Takayuki, Ohkuma Yoshiaki, Tamura Yasushi, Mizuguchi Mineyuki	4. 巻 428
2. 論文標題 Crystal Structure of Human General Transcription Factor TFIIE at Atomic Resolution	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 4258 ~ 4266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2016.09.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Rieko, Kajiura Shu, Sesaki Hiromi, Endo Toshiya, Tamura Yasushi	4. 巻 590
2. 論文標題 Identification of multi-copy suppressors for endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3061 ~ 3070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Rieko, Endo Toshiya, Tamura Yasushi	4. 巻 6
2. 論文標題 A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep30777	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 Kojima Rieko, Obita Takayuki, Onoue Kousuke, Mizuguchi Mineyuki	4. 巻 428
2. 論文標題 Structural Fine-Tuning of MIT-Interacting Motif 2 (MIM2) and Allosteric Regulation of ESCRT-III by Vps4 in Yeast	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 2392 ~ 2404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2016.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小島 理恵子, 伊藤 喜重, 瀬崎 博美, 遠藤 斗志也, 田村 康
2. 発表標題 カルジオリピン量の維持には正常なクリステ構造が必要である
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 新規のin vitro PS輸送実験を用いたERMES複合体のリン脂質輸送機能の解明
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----