

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21473

研究課題名(和文)小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送タンパク質VAT-1の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of VAT-1, a phospholipid transfer protein between the ER and mitochondria

研究代表者

渡邊 康紀(Watanabe, Yasunori)

愛媛大学・農学研究科・助教

研究者番号：30772636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官(オルガネラ)を構成する生体膜中のリン脂質の組成が正しく保たれるには、各オルガネラ間においてリン脂質が効率的に輸送されることが重要である。本研究では、高等真核生物における小胞体-ミトコンドリア間でリン脂質の輸送を担うことが指摘されているタンパク質VAT1の構造機能解析を行った。VAT1の立体構造からリン脂質を輸送するために結合する領域および、膜からリン脂質を引き抜く際に膜へ結合するために重要な領域を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Phospholipid trafficking between organelles is necessary for the achievement of membrane-specific phospholipid compositions. Here we focused on VAT1, which involves phosphatidylserine (PS) transfer from the endoplasmic reticulum (ER) to mitochondria, and determined the crystal structure of VAT1. Crystal structure of VAT1 and structure-based mutational analyses indicates acidic phospholipid binding region and an exposed flexible loop region which is important for the acidic phospholipid transfer and acidic membrane binding. We also showed that basic residues and two tryptophan residues in the exposed flexible loop region are important for acidic phospholipid transfer and acidic membrane binding and that these tryptophan residues are buried into the acidic membranes upon binding. These results provide the structural basis for understanding the molecular mechanism of phospholipid transfer between the ER and mitochondria.

研究分野：構造生物学

キーワード：リン脂質輸送タンパク質 結晶構造解析 オルガネラ間リン脂質輸送

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核細胞内において呼吸によるエネルギー生産を行なうだけでなく、アポトーシスによる細胞死を引き起こすなど、細胞にとって重要な役割を果たしている。そのためミトコンドリアの異常はがん、代謝疾患など様々な疾患の原因になりうる。ミトコンドリアは外膜と内膜の2枚の生体膜によって囲まれ、外膜、膜間部、内膜、マトリックスの4つの区画から成る。ミトコンドリアが正常に機能するには、ミトコンドリアのタンパク質が翻訳後、ミトコンドリア内の正しい区画に輸送されること、及び多くのタンパク質の機能の場となる外膜と内膜を構成するリン脂質の組成が正しく保たれることが重要である。これまで、ミトコンドリア内へのタンパク質の輸送機構に関しては関連因子の構造情報も含めて多くの知見が得られている。しかし、ミトコンドリア膜を構成するリン脂質が、どのように適切な膜系に効率よく輸送されるかについては、関与する因子の全貌も含めて、分子機構などほとんど分かっていない。

リン脂質の合成に関わる酵素は小胞体膜またはミトコンドリア内膜に局在し、リン脂質の合成は小胞体とミトコンドリアにまたがって行われる。このため、小胞体膜、ミトコンドリア外膜及び内膜の間での脂質の輸送が水溶性区画を超えて効率的に行われることが重要である。ミトコンドリア機能に必須でその内膜に主として存在するカルジオリピンは、前駆体のホスファチジン酸が小胞体で合成された後、ミトコンドリア内膜に輸送され、内膜の一連のカルジオリピン合成酵素に受け渡されることで合成される。また、生体膜を構成する主要リン脂質の一つであるホスファチジルエタノールアミンは、前駆体のホスファチジルセリンが小胞体で合成された後、ミトコンドリア内膜に輸送され、そこでホスファチジルセリン脱炭酸酵素によって合成される。出芽酵母においてホスファチジン酸及びホスファチジルセリンの小胞体膜からミトコンドリア外膜への輸送は、小胞体膜と外膜を物理的に繋ぐタンパク質複合体のERMES が担う可能性がある。ミトコンドリア外膜から内膜へのホスファチジン酸の輸送は、Ups タンパク質の Ups1 と Mdm35 の複合体が担う。Ups タンパク質と Mdm35 に関しては出芽酵母からヒトに至るまで広く保存されているが、ERMES 複合体に関しては高等真核生物には保存されておらず、酵母にしか見つかっていない。最近のアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた解析から、高等真核生物における小胞体膜からミトコンドリア外膜へのホスファチジルセリンの輸送にサイトゾルに局在するタンパク質 VAT1 が関与することが報告されている (Junker and Rapoport, *Traffic* 2015)。しかし、高等真核生物の小胞体膜とミトコンドリア外膜の間で、VAT1 が具体的にどのようにリン

脂質を輸送しているのか、その分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送因子 VAT1 に着目し、X線結晶構造解析とリン脂質輸送アッセイに基づくアプローチを適用し、構造生物学的手法により、VAT1 による小胞体膜、ミトコンドリア外膜の間でのリン脂質の輸送機構を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

ヒト由来 VAT1 を大腸菌の系を用いて N 末端に GB1-6xHis タグを融合させたタンパク質として発現させ、His タグアフィニティークロマトグラフィー、プロテアーゼによる GB1-6xHis タグの切除、ゲルろ過クロマトグラフィーの順で精製し、機能解析および結晶化に用いるサンプルとして調製した。結晶化は蒸気拡散法により行い、0.2 M 硝酸アンモニウム、18-20% PEG3350 の条件で良質な単結晶が得られた。得られた結晶から SPring-8 の BL32XU にて X 線回折実験を行い、2.2 Å 分解能の回折データを得た。位相は VAT1 ホモログである VAT1L の結晶構造をモデル分子とした分子置換法により決定した。比重の異なるドナーリポソームとアクセプターリポソームを用いて質量分析法により VAT1 のリン脂質輸送活性を調べた。

4. 研究成果

質量分析法を利用したリン脂質輸送アッセイにより VAT1 はホスファチジルセリンだけではなく酸性リン脂質であるホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロールの輸送活性を持つことが明らかになった (図 1)。ま

PC: ホスファチジルコリン
PE: ホスファチジルエタノールアミン
PA: ホスファチジン酸
PS: ホスファチジルセリン
PG: ホスファチジルグリセロール

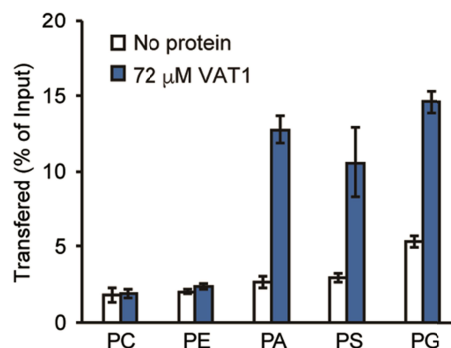


図 1

た、膜からリン脂質を引き抜く際に膜へ結合する必要があると考えられるため、フローテーションアッセイにより、VAT1 のリポソームへの結合を調べたところ、酸性リン脂質を含むリポソームとの結合が見られた。

VAT1 による酸性リン脂質輸送の詳細なメカニズムを明らかにするため、VAT1 の結晶化を行いその結晶構造を 2.2 Å 分解能で決定した(図 2)。VAT1 は二つのサブユニットか

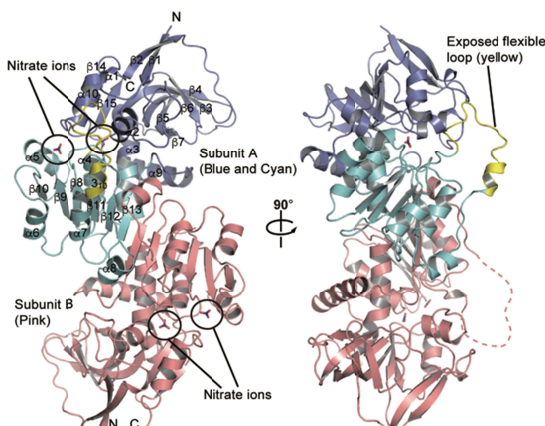


図 2

らなるホモ二量体を形成しており、一つのサブユニットは二つのドメイン構造を形成していた。VAT1 の結晶構造と類似した構造を形成する酵母由来 NADPH-キノン酸化還元酵素 Zta1 と比較したところ、Zta1 の NADPH リン酸基結合領域には、VAT1 では結晶化溶液由来の二つの硝酸イオンが結合しており、それぞれ 172 番目の Asn 残基(N172)と 225 番目の Lys 残基(K225)が結合に関与していた。これらのアミノ酸残基がリン脂質輸送活性に関与するかどうか検証するために VAT1 の N172A および K225E 変異体を調製し、リン脂質輸送活性を調べたところ、K225E 変異では輸送活性の低下は見られなかったが、N172A 変異により輸送活性の低下が見られた。以上の結果から、N172 はリン脂質輸送に重要であることが明らかになった。また、N172 の近傍には疎水性アミノ酸残基に富んだ領域があるため、硝酸イオンが結合していた領域にリン脂質のリン酸基頭部が、近傍の疎水性領域にはリン脂質のアシル鎖が結合することが示唆される。

VAT-1 の結晶構造では、塩基性残基と疎水性残基から構成されたループ構造が分子表面から突出している(図 2 の黄色で示した領域)。VAT-1 は酸性リン脂質を含む膜と結合することからこのループ領域が膜との結合に関与する可能性が考えられる。ループ領域を欠損させた変異体、K295E/R296E/R303E 変異体、W305A/W306A 変異体についてリン脂質輸送活性が低下していた。さらにループ領域の変異により酸性リン脂質含有リポソームとの結合は見られなくなった。以上のことから VAT-1 の露出したループ領域はリン脂質輸送活性および膜結合能に重要であることが明らかになった。以上の結果から、VAT1 のリン脂質を輸送する際の膜との結合および引き抜いた後のリン脂質を結合する領域のモデルを構築した。以上の結果をまとめ、現在投稿論文として準備中である。

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)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Ayaka Matsumura, Jun Higuchi, Yasunori Watanabe, Masahiro Kato, Keigo Aoki, Shiori Akabane, Toshiya Endo, Toshihiko Oka (2017) Inactivation of cardiolipin synthase triggers changes in mitochondrial morphology. *FEBS Letters* **592**, 209-218. doi: 10.1002/1873-3468.12948.
2. Akinori Yamasaki*, Yasunori Watanabe*, Wakana Adachi, Kuninori Suzuki, Kazuaki Matoba, Hiromi Kirisako, Hiroyuki Kumeta, Hitoshi Nakatogawa, Yoshinori Ohsumi, Fuyuhiko Inagaki, Nobuo N. Noda (*Co-first authors) (2016) Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. *Cell Rep.* **16**, 19-27. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.066.
3. Non Miyata, Yasunori Watanabe, Yasushi Tamura, Toshiya Endo, Osamu Kuge (2016) Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria. *J. Cell Biol.* **214**, 77-88. doi: 10.1083/jcb.201601082

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 渡邊康紀、田村康、遠藤斗志也、VAT-1 による小胞体-ミトコンドリア間リン脂質輸送の構造的および機能的洞察。2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月
2. 渡邊康紀、田村康、遠藤斗志也、VAT-1 による ER-ミトコンドリア間のリン脂質輸送の構造基盤。第 17 回日本蛋白質科学会年会、仙台国際センター、2017 年 6 月
3. 渡邊康紀、田村康、遠藤斗志也、小胞体—ミトコンドリア間のリン脂質輸送タンパク質 VAT-1 の構造機能解析。第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜。2016 年 11 月。
4. Yasunori Watanabe, Yasushi Tamura, Shin Kawano, Toshiya Endo. Structural basis of phospholipid transfer between the mitochondrial outer and inner membranes by Ups1-Mdm35. *Molecular Biophysics of Membranes FASEB Science Research Conferences*. Snowmass Village, Colorado. July, 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 康紀 (WATANABE, Yasunori)
愛媛大学大学院農学研究科・助教
研究者番号：30772636