

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06096

研究課題名(和文)ミトコンドリア膜融合を駆動するGTPase蛋白質の動的変化とGTP加水分解の役割

研究課題名(英文)Elucidating role of GTP hydrolysis in GTPase-driven mitochondrial membrane fusion

研究代表者

伴 匡人(Ban, Tadato)

久留米大学・分子生命科学研究所・講師

研究者番号：00579667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア同士の融合は、ミトコンドリアの多彩な機能維持に必須の生命現象であり、その破綻が様々な病態と関わることから、生物学や医学を始めとした多くの分野からその分子機構の理解が求められている。本研究では、調製の問題から長らく解析されていなかったミトコンドリア膜融合GTPaseによる膜融合の分子機構解明を目的とした。精製タンパク質と人工脂質二重膜小胞を使ったin vitro膜融合・結合実験を進め、ミトコンドリア膜融合GTPase OPA1、Mfn2の挙動を解析した。さらに、内膜融合の分子機構の全貌理解に向けた構造解析に向けた、高度に精製されたOPA1の大量調製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは、細胞内のエネルギーを生産する以外にも、細胞死の制御やホルモン、脂質などの生体分子の代謝に機能する多彩な細胞小器官である。ミトコンドリア膜融合は、この多彩な機能を支える必須の過程であり、その分子機構を理解することは、生命の成り立ちを理解する上でも重要である。近年、ミトコンドリア融合の不全が、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患や、がん、糖尿病の発症に深く関連し、ミトコンドリアに着目した予防・治療法が注目されている。本研究から得られる知見は、ミトコンドリアの関与するさまざまな病態の治療や予防に向けて、広く社会に還元できるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are highly dynamic organelles, which move and fuse to regulate their shape, size and fundamental functions. The dynamin-related large GTPases has been reported to play a central role in mitochondrial fusion. However, how these GTPases mediated mitochondrial fusion remains unclear. To address the molecular mechanisms underlying mitochondrial fusion, we have been developed in vitro assays to analysis the membrane fusion reaction using highly purified recombinant proteins and model membranes. From a series of in vitro membrane fusion and binding analysis, we found that short form OPA1 bridges the opposite membrane in a mitochondrial specific lipid cardiolipin. In addition to in vitro assays, we have developed the methods to purify large amount of recombinant OPA1 for the structural analysis.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：ミトコンドリア 膜融合 GTPase 膜タンパク質 脂質膜 リボソーム カルジオリピン 試験内再構成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、酸素呼吸による ATP 合成、脂質やホルモンの代謝、細胞死の制御など多彩な機能を持つ細胞小器官 (オルガネラ) である。哺乳動物細胞では、細長く枝分かれした形態と共に、頻りに融合と分裂を繰り返す姿が観察される。ミトコンドリアの形態は、融合と分裂のバランスにより維持されている。分裂を抑制すると融合のみが進行し、長く連結したミトコンドリアネットワークが観察される。逆に融合を抑制すると分裂のみが進行し、短く断片化したミトコンドリアが観察される。近年、この動的なミトコンドリアの形態変化が、ミトコンドリア機能や病態に関与することが明らかになりつつあり、融合と分裂の分子機構に多くの注目が集まっている。

ミトコンドリアは外膜と内膜に囲まれた二重膜構造を持ち、融合の際は、外膜融合と内膜融合が協調的に起こると考えられている。融合の制御因子として、局在の異なる GTP 加水分解タンパク質 (GTPase) が同定されている。哺乳動物の場合、外膜融合には外膜に存在する mitofusin (Mfn) の 2 つアイソフォーム (Mfn1, Mfn2)、内膜融合には内膜に存在する OPA1 が機能する (図.1)。

Mfn や OPA1 が欠損したマウスが構築され、ミトコンドリア融合が個体の発生・分化に必須の現象であることが明らかにされた。さらに培養細胞を使った解析から、Mfn や OPA1 の抑制は、呼吸活性の低下やミトコンドリアが独自に持つ DNA (mtDNA) の不安定化をもたらすことから、ミトコンドリア融合がミトコンドリア機能と密接に関わることが示された。膜融合はタンパク質とリン脂質などの相互作用を経て進むことから、詳細な分子機構を理解するためには、各々の要素の役割を直接的に解析することができる *in vitro* 膜融合実験など蛋白質科学や構造生物学に基づく解析が有効である。一方、Mfn や OPA1 は高分子量の膜タンパク質であるために、蛋白質科学や構造生物学実験に適した高純度の精製タンパク質の調製が困難であった。そのために、ミトコンドリア膜融合の分子機構の解明は、解決すべき課題として残されてきた。

研究代表者は、ミトコンドリア膜融合の分子機構の解明を目指して、組換えタンパク質と人工脂質二重膜小胞 (リポソーム) を使ったタンパク質科学及び構造生物学手法を用いた解析を行ってきた (Ban et al., Hum Mol Genet 2010)。さらにカイコ幼虫とバキュロウイルスを用いたタンパク質発現システム (カイコ・バキュロウイルス発現) を使い、世界に先駆けて膜貫通量領域を持つ OPA1 (L-OPA1) の大量発現・精製に成功した (Ban et al., Methods Mol Biol 2020)。さらに、精製 L-OPA1 をリポソームに組み込んだ L-OPA1 プロテオリポソームを使ったミトコンドリア内膜の *in vitro* 膜融合実験の構築を行った。この解析から L-OPA1 が膜融合に先立ち、融合する相手側の脂質膜中の脂質カルジオリピン (CL) と特異的に結合し、リポソーム同士を結合させること、GTP 加水分解が膜融合に必要であることを見出し、ミトコンドリア内膜が既知の膜融合とは異なる膜融合機構を持つことを示した (図.2、Ban et al., Nat Cell Biol 2017)。

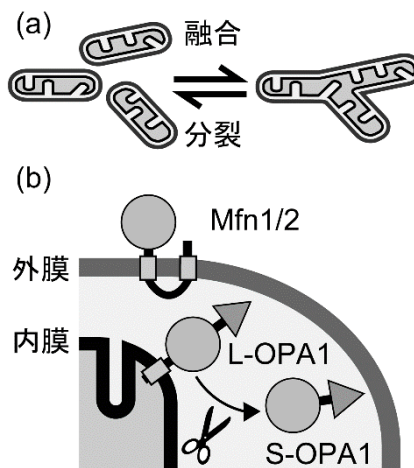


図.1:(a) ミトコンドリア融合と分裂  
(b) 膜融合を制御する GTPase

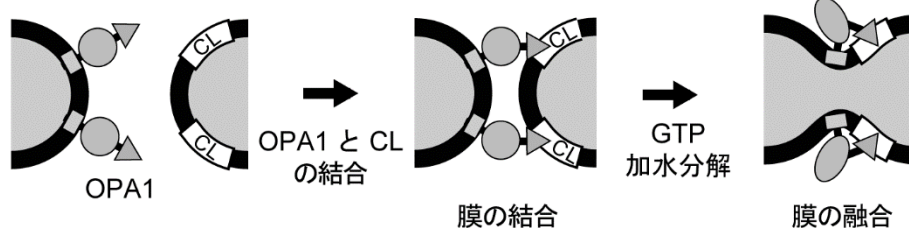


図.2: これまでの研究から提唱した OPA1 膜融合モデル  
膜の片側に OPA1、もう片側にカルジオリピン (CL) があれば融合が起こる

一方で、「L-OPA1 による GTP 加水分解が、どのように膜融合の完了につながるのか?」や「L-OPA1 は、どのように CL と特異的に結合するのか?」、また膜貫通領域が欠損した S-OPA1 の役割がわかっておらず、ミトコンドリア内膜融合の全容理解にはまだ不明な点が残されている。これまでの研究から Mfn は、融合に先立ち融合するミトコンドリア間でトランス会合体を形成し、ミトコンドリア間をつなぎ留めることが示されている (Ishihara et al., J Cell Sci 2004)。また N 末端 (Cao et al., Nature 2017) 及び C 末端 (Koshiba et al., Science 2004) の細胞質に露出したドメインの X 線結晶構造解析から異なる膜結合及び膜融合モデルが提唱されている。これらは異なる断片を用いた結果だと考えることもできるが、Mfn2 の一部は小胞体にも局在し、ミトコンドリアと小胞体の膜接触構造の形成に機能することが示されており (de Brito et al., Nature 2008)、周囲の脂質膜環境に応じて異なる様式のトランス複合体形成を形成する可能性も考えられる。しかしながら全長の Mfn を用いた *in vitro* 膜融合実験が行われおらず、ミトコンドリア外膜融合の分子機構については不明な点が数多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が構築したミトコンドリア膜融合の分子機構解析を基盤として、より詳細な膜融合の分子機構の理解を目的とした。本研究では、研究代表者が確立した精製ミトコンドリア膜融合 GTPase とリポソームによる *in vitro* 膜結合・融合解析、さらに構造解析からミトコンドリア膜融合におけるタンパク質とリン脂質の機能の解明を目指した。目的を達成するために、以下の研究を計画した

- (1) 構造解析に向けた L-OPA1 の大量発現・精製法の確立
- (2) ミトコンドリア内膜融合に機能する S-OPA1 の解析
- (3) ミトコンドリア外膜融合に機能する Mfn2 の解析

## 3. 研究の方法

- (1) 構造解析に向けた L-OPA1 の大量発現・精製法の確立

GTP 加水分解が L-OPA1 のコンフォメーション変化に寄与するか？またカルジオリピンとどのように結合するか？を明らかにするためには、構造解析が有効である。本研究では、構造解析を行う上で重要となる高純度 L-OPA1 の大量調製法の確立を目指した。L-OPA1 の cDNA を含んだ組換えバクテリオファグ DNA を、DNA 導入試薬と共に、カイコの五齢幼虫に接種し、L-OPA1 の発現を行った。接種後 6 日後に、L-OPA1 が発現する脂肪体をカイコから単離し、ホモジナイザーで懸濁した。超音波処理後の脂肪体を遠心操作により分画し、L-OPA1 を含む分画を界面活性剤で処理し、可溶化された L-OPA1 を得た。L-OPA1 の N 末端に付加された His-tag により、Ni-アフィニティクロマトグラフィー精製を行った。続いて、イミダゾール溶出分画をゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、精製 L-OPA1 を得た。

- (2) ミトコンドリア内膜融合に機能する S-OPA1 の解析

定常状態の細胞では、OPA1 は膜貫通領域を持つ L-OPA1 と蛋白切断により膜貫通領域が欠損した S-OPA1 の両フォームで存在している (図.1a)。L-OPA1 と S-OPA1 の膜融合挙動を解析するために、S-OPA1 を L-OPA1 と同様に、カイコ・バキュロウイルス発現システムで発現・精製した。ミトコンドリア内膜のリン脂質組成を元に、リン脂質を混合し、窒素ガス及び真空乾燥を行い lipid film を調製した。lipid film を界面活性剤存在下で懸濁し、透析により界面活性剤を除去することで、ミトコンドリア内膜モデルリポソーム (CL25) を調製した。*in vitro* 膜融合実験は、蛍光色素 NBD と Rhodamine で修飾された phosphatidylethanolamine (PE) を含む donor liposome と、蛍光色素で標識されたリン脂質を含まない acceptor liposome 間の脂質混合アッセイを用いて行った。S-OPA1 の膜融合活性は、タンパク質を含まない donor liposome と acceptor liposome と S-OPA1 を用いた脂質混合アッセイから解析した。*in vitro* 膜結合実験は、ビオチン修飾 PE を含む L-OPA1 プロテオリポソームを結合させたアビジンコート磁気ビーズを利用して行った。

- (3) ミトコンドリア外膜融合に機能する Mfn2 の解析

外膜融合 GTPase Mfn2 を L-OPA1、S-OPA1 と同様にカイコ・バキュロウイルス発現システムで発現・精製した。ミトコンドリア外膜をモデルとしたリポソーム (CL4) と Mfn2 を界面活性剤存在下で混合し、透析により界面活性剤を除去し、Mfn2 が挿入されたリポソーム (Mfn2 プロテオリポソーム) を調製した。*in vitro* 膜融合実験は、S-OPA1 と同様に脂質混合アッセイにより行った。

## 4. 研究成果

- (1) 構造解析に向けた L-OPA1 の大量発現・精製法の確立

収量の増加のために、カイコでの発現用にコドンをも最適化した L-OPA1 の cDNA を用いた。その結果、収量を 1.5 倍に増やすことが出来た。カイコ由来の夾雑タンパク質の混入を減らすために、界面活性剤 DDM による L-OPA1 の可溶化における塩濃度、さらに Ni-アフィニティクロマトグラフィー精製におけるイミダゾール濃度を再検討し、より純度の高い L-OPA1 を得ることができるようになった (図.3)。この L-OPA1 を使い、研究協力者であるカリフォルニア工科大学 David Chan 教授と、引き続き結晶化条件のスクリーニングを行う予定である。

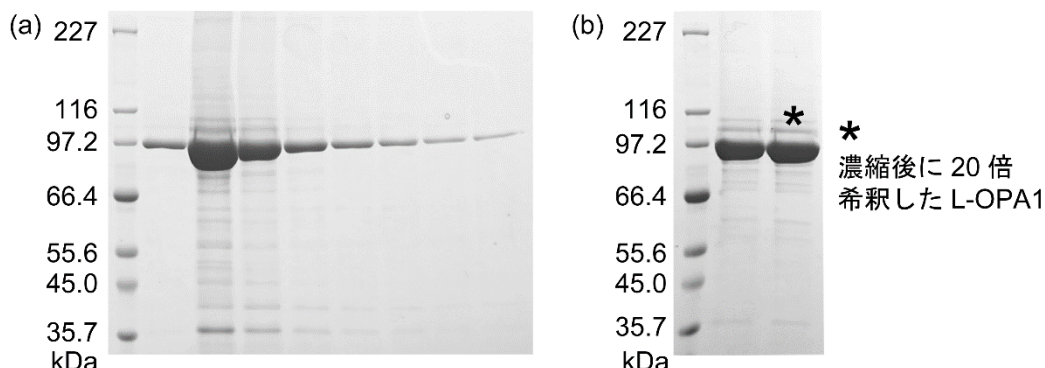


図.3: (a) L-OPA の Ni-アフィニティクロマトグラフィー溶出分画

(b) L-OPA1 のゲルろ過クロマトグラフィー溶出分画と、濃縮・希釈後の L-OPA1

(2) ミトコンドリア内膜融合に機能する S-OPA1 の解析

L-OPA1 を CL が豊富に含まれるミトコンドリア内膜モデルリポソーム (CL25、全脂質濃度の 25% が CL) に挿入すると膜融合が起こる。一方、CL が少ないミトコンドリア外膜モデルリポソーム (CL4、全脂質濃度の 4% が CL) に挿入すると、融合が観察されなくなることから、L-OPA1 による膜融合には、CL が必須であることが分かっている (Ban et al., Nat Cell Biol 2017)。L-OPA1 を CL4 に挿入した L-OPA1 プロテオリポソームと、L-OPA1 を含まない CL25 の間で膜融合が観察されたことから、融合する脂質膜の片側に L-OPA1、もう一方に CL があれば方向性の融合が起こる (図.2)。一方で、膜貫通領域が欠損した S-OPA1 を、CL25 と CL4 と混合しても、膜融合は観察されない。そこで S-OPA1 が CL25 間で融合を起こすかどうかを解析した。その結果、GTP 存在下で CL25 間の膜融合が観察された (図.4a)。また磁気ビーズを利用した *in vitro* 膜結合アッセイから、両方の脂質膜に CL が豊富に存在する CL25 を使った場合にのみ、S-OPA1 による膜の係留が確認された (図.4b)。これらの結果から、L-OPA1 と S-OPA1 の CL 要求性の違いが、示唆された。一方、S-OPA1 は膜貫通領域が欠損していることや、カイコで発現した S-OPA1 が多量体を形成していることから、今回の実験条件では、細胞内での S-OPA1 の脂質膜への配向性を正しく再現できていない可能性も考えられる。この配向性の問題を解決するには、プロテオリポソーム中での酵素切断による L-OPA1 から S-OPA1 への変換も含めたより詳細な解析が必要であると考えられる。

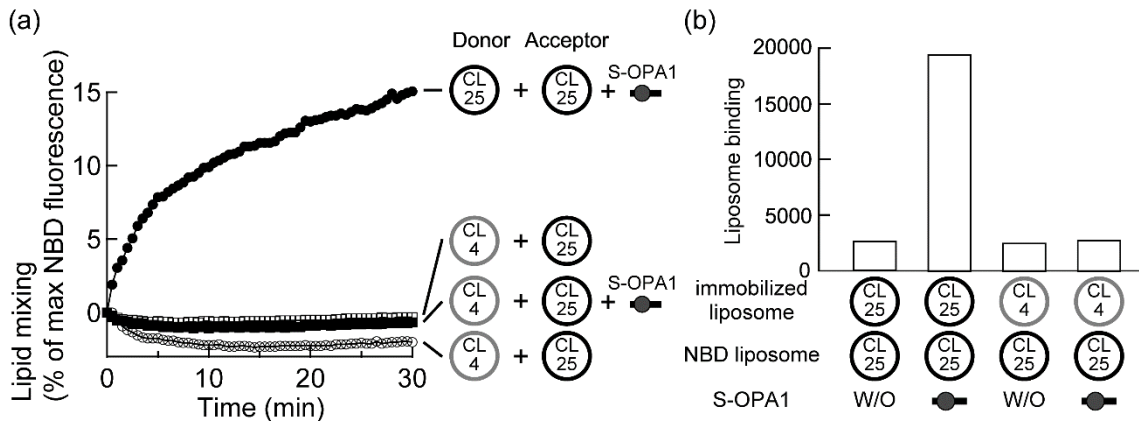


図 4: (a) S-OPA1 による *in vitro* 膜融合反応 (b) S-OPA1 による *in vitro* 膜結合反応

(3) ミトコンドリア外膜融合に機能する Mfn2 の解析

これまで報告されたことがない、精製 Mfn2 による *in vitro* 膜融合実験に向けた精製 Mfn2 の調製及び、Mfn2 を組み込んだ CL4 (Mfn2 プロテオリポソーム) による膜融合実験を行った。Mfn2 を発現したカイコ脂肪体から Mfn2 を含む分画を遠心処理により単離し、界面活性剤存在下で Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製したところ、*in vitro* 膜融合実験を行うのに十分な量の Mfn2 を得ることができた (図.5a)。Mfn2 プロテオリポソームの融合活性を調べたところ、GTP 存在下で膜融合が観察されてことから、Mfn2 が膜融合活性を持つことが示された。さらに GDP や GTP 非加水分解アナログ存在下では膜融合が観察されなかったことから、Mfn2 による膜融合は、GTP 加水分解に依存することが分かった (図.5b)。今後、Mfn のもう 1 つのアイソフォーム Mfn1 の解析や、*in vitro* 膜結合実験を行うことにより、外膜融合における Mfn1 と Mfn2 の融合挙動が明らかになり、Mfn によるミトコンドリア外膜の分子機構の理解が飛躍的に進むことが期待される。

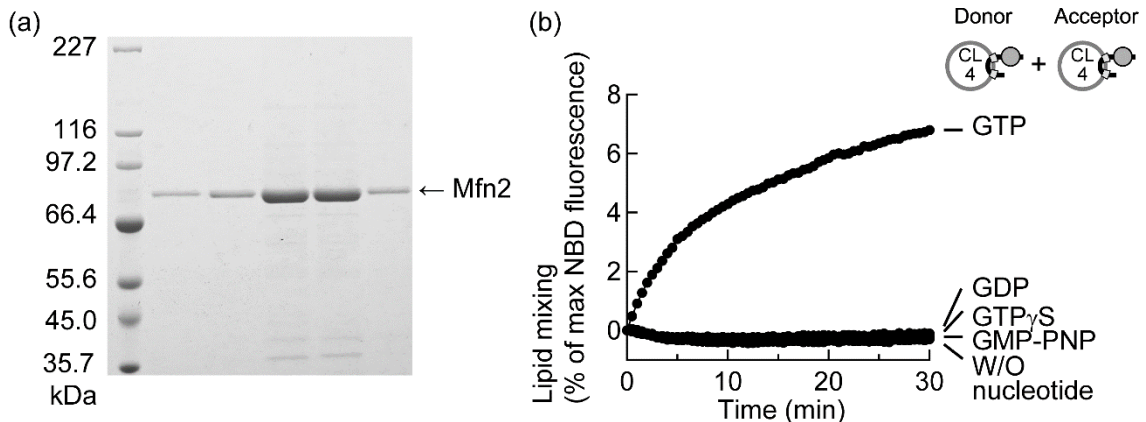


図 5: (a) Mfn2 の Ni-アフィニティークロマトグラフィー溶出分画 (b) GTP 加水分解に依存した Mfn2 による膜融合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 植田 依里, 伴 匡人, 石原 直忠	4. 巻 91
2. 論文標題 OPA1とカルジオリピンによるミトコンドリア内膜融合の制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 268-271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910268	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 Tadato Ban, Hiroto Kohno, Takaya Ishihara, Naotada Ishihara	4. 巻 1859
2. 論文標題 Relationship between OPA1 and cardiolipin in mitochondrial inner-membrane fusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 951-957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2018.05.016	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 Tadato Ban, Naotada Ishihara	4. 巻 2159
2. 論文標題 Analysis of Mitochondrial Membrane Fusion GTPase OPA1 Expressed by the Silkworm Expression System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 115-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0676-6_9.	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伴 匡人, 石原直忠
2. 発表標題 ミトコンドリア膜融合GTPase OPA1による膜融合機構の解析
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伴 匡人
2. 発表標題 再構成実験によるミトコンドリア内膜融合機構の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadato Ban, Naotada Ishihara
2. 発表標題 Heterotypic action between OPA1 and cardiolipin in mitochondrial fusion
3. 学会等名 The1st International Mitochondria Meeting for Young Scientist（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadato Ban, Naotada Ishihara
2. 発表標題 Elucidating the mechanism of selective mitochondrial fusion by OPA1 and cardiolipin
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会（日本発生物学会合同大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伴 匡人、石原 直忠
2. 発表標題 膜融合GTPase OPA1によるミトコンドリア膜融合機構の解明
3. 学会等名 平成30年度 日本生化学会 九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伴 匡人、石原 直忠
2. 発表標題 ミトコンドリア膜融合ダイナミクスの分子機構
3. 学会等名 レドックス第170委員会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伴 匡人、石原 直忠
2. 発表標題 膜融合GTPaseによるミトコンドリア膜融合メカニズム
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadato Ban, Naotada Ishihara
2. 発表標題 Elucidating molecular mechanism of OPA1 mediated mitochondrial inner membrane fusion
3. 学会等名 International Symposium on Mitochondrial Biology and Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tadato Ban, Naotada Ishihara	4. 発行年 2018年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 11ページ（分担）
3. 書名 Silkworm Biofactory : Silk to Biology, Chapter 11 "Expression and Purification of Mitochondrial Membrane Protein OPA1 for Reconstitution of Membrane Fusion"	

〔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
研究協力者	石原 直忠  (Ishihara Naotada)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関