

機関番号：17102
 研究種目：新学術研究（課題提案型）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20200058
 研究課題名（和文） メンブレンモルフォテクノロジー（膜形態工学）
 -ひだ状人工膜の構築を目指して-
 研究課題名（英文） Membrane morphology -An attempt to reconstitute the cristae structure in liposome-
 研究代表者
 岡 敏彦 (OKA TOSHIHIKO)
 九州大学・医学研究院・准教授
 研究者番号：40263321

研究成果の概要（和文）：細胞内には固有の形態を持つ様々なオルガネラがあり、その形態は細胞の種類、外的環境、細胞周期などの条件により大きく変化する。本研究では、実際にオルガネラの形態を決める要因（管状、球状、ひだ状）の一つであるひだ状膜構造を人工膜上に再構成することで、その膜環境で働くタンパク質の機能をより生理的な条件下で解析し、また生体膜の物性を詳細に検討することを目指した。これらの成果により、オルガネラ形態の機能的意味の手掛かりを得たいと考えた。

ミトコンドリア内膜が陥入し折りたたまれた膜構造（クリステ構造）に必須なタンパク質 LETM1 を用い、人工膜リボソーム上に折りたたみ構造の再構成を試み、球状のリボソーム膜が多重に内側に落ち込んだ構造体を再構成することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Biomembranes are various in form, and the diversity of the shapes of biomembranes are critical for cell viability. To understand the function of the shapes in intra-and inter-cellular activities, we attempted to reconstitute *in vitro* the cristae structure, an invaginated inner membrane of mitochondria, onto liposomes. Using a recombinant protein of LETM1, a mitochondrial protein required for maintenance of the cristae structure, multiple membrane invagination was successfully formed on liposomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
総計	23,000,000	6,900,000	29,900,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：(1) 細胞生物学、(2) 形態・構造

キーワード：メンブレンモルフォロジー、クリステ構造

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内膜コンパートメント（つまり、オルガネラ）は、細胞内で固有の形態を維持している。例えば、小胞体は細胞全体に広がる網目状構造を有しており、ゴルジ体は微小

管形成中心(MTOC)付近で層板状構造を形成している。また、ミトコンドリアは管状のネットワーク構造を呈する。さらに、これらのオルガネラ形態は、細胞の種類、外的環境、細胞周期などの条件により大きく変化する。

細胞分裂期にゴルジ体が消失することや、アポトーシスの際にミトコンドリアが断片化することなどはよく知られた例である。

各オルガネラに固有の形があることは、その形態がオルガネラ機能にとって重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、これまでの多くの研究では、オルガネラの機能に欠損や傷害が生じた際の形態変化を報告してきただけで、その形態のオルガネラ機能に対する意義にまで踏み込んだ研究は行われてこなかった。私達自身も、線虫を用いて全ミトコンドリアタンパク質を網羅的にノックダウンした際に、ミトコンドリア遺伝子の8割以上が、発現抑制により、異常なミトコンドリア形態を誘導することを観察した (Ichishita et al., 2008)。このことは、ミトコンドリアの殆どの機能が正常な管状ネットワーク構造を維持するために不可欠であることを示している。しかし、管状ネットワーク構造を直接的に必要なミトコンドリアの機能については、何の手掛かりも得られなかった。つまり、個々の機能や反応経路の欠損から得られる表現形では、多面的な影響を排除できないために、オルガネラ形態の機能的意義について探ることが出来ない。

そこで、オルガネラ膜の形状を人工的に作り出し、その環境下で各オルガネラの機能（酵素反応、膜を介したイオン・電子の受け渡し、シグナル伝達など）を再構築することが、オルガネラ形態の持つ機能的な意義にアプローチして行くために必要であると考えられた。

2. 研究の目的


(1) 生体膜の形成と維持には、2つの要素があると考えられる。一つは、膜の融合と分裂（または出芽）を制御することにより膜の動的変化を調節し、その形状を形成・維持するものである。もう一つは、膜形状そのものを支持・形成することで、オルガネラの形態を作り出すものである。これまでの研究では、前者の膜の融合・分裂を制御する因子の研究に焦点が充てられ、その形態への役割が議論されてきた。Dynamin、SNARE、Drp1、mitofusins (Mfns)などは分泌経路やミトコンドリアにおける膜の融合や分裂を制御する因子で、これらの欠損は、小胞の蓄積、小胞体やゴルジ体の肥大化、ミトコンドリアのネットワーク構造の破壊などをもたらす。このような形態変化は、異常な融合・分裂の結果の最終表現形であり、これらの変化からオルガネラ形態の意義を推測することは難し

い。また、これらの因子の活性をどの様に調節しても、オルガネラ固有の膜形状を作り出すことは出来ない。ところが最近になり、小胞体膜の管状構造を精製タンパク質 Yop1 (または Rtn1) とリボソームより *in vitro* で再構成出来ることが報告された (Hu et al., 2008)。これにより、リボソームを使って人工的に膜構造を作り出すことが可能であることが証明された。オルガネラの膜形状には、少なくとも3通り (球状、管状、ひだ状) あると考えられる (図1)。しかし、生体膜は水溶液中では球状をとるため、残り2つの形状を作り出すことが出来ればオルガネラ膜を構成するための要素が揃うことになる。つまり、この2つの膜形状を操れば、人工オルガネラを創造することも可能となる。小胞体の管状構造は、すでに Yop1 や Rtn1 を用いて再構成された。残りのひだ状 (又は折り畳み) 構造は、ミトコンドリア内膜や極性を持つ上皮細胞の細胞膜などに見られる重要な形状であり、この再構成が人工オルガネラ膜へのカギとなる。本研究では、細胞とタンパク質の間を媒介する生体膜に着目し、その膜形状

図1) 膜形態を制御する因子

を人工的に自在に操作することにより、

- 1) 生体膜の融合・分裂の制御
ex) dynamin, SNARE, Drp1, Mfns, Atg8
- 2) 膜形状の形成・維持
ex) Yop1, Rtn1

管状 ひだ状 球状

Yop1, Rtn1 LETM1 ? ?

生体膜に近い膜環境を作り出すメンブレンモルフォテクノロジー (膜形態工学) を確立し、生物学に新たな切り口を提示したい。

3. 研究の方法

(1) 折り畳み膜構造の再構築；
私達はミトコンドリア内膜タンパク質 LETM1 の研究から、LETM1 が内膜の折り畳み構造 (クリステ) の形成に必須であり、その欠損がミトコンドリアの膨張を引き起こすことを見出した (Tamai et al., submitted)。電子顕微鏡観察より、これは内膜をマトリックス

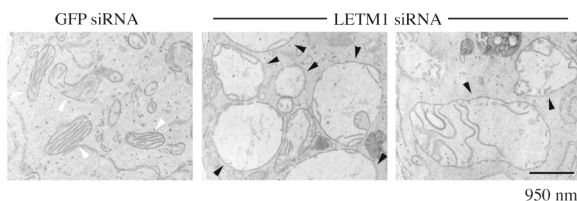


図2) LETM1ノックダウン細胞のミトコンドリアの電子顕微鏡写真
黒い矢印は肥大したミトコンドリアを示す。

側に折り畳めないために、ミトコンドリアが膨らんだものと考えられた(図2)。私達は、このLETM1を中心にミトコンドリアのクリステ構造を形成する因子を検索・解析することにより、最終的にはミトコンドリア内膜に見られるひだ状構造を人工的に再構築することを目指している。具体的には、精製したLETM1 リコンビナントタンパク質を用いて、人工膜リポソームで折り畳み膜構造を再構成する。脂質はミトコンドリア内膜組成に近い物を使用し、カルジオリピンなどのミトコンドリア特異的脂質で構成されたリポソームでの再構成を試みる。また、リポソームがひだ状になれば、内部の浸透圧が上昇することが予想されるため、溶液中の浸透圧の条件を塩やスクロースなどで調整することで検討する。

4. 研究成果

(1) LETM1蛋白質の構造解析；
クリステ構造の形成・維持に重要であるとして私達が見出したLETM1は、幾つかの構造的に特徴のあるドメイン(EFハンド、ロイシンジッパー、LETMホモロジドメイン)を有している。このドメインの役割を解析するため、それぞれを欠損したヒトLETM1変異体を作成後、酵母のLETM1相同遺伝子MDM38の欠損株に導入し、非発酵性炭素源のみに培地での生育を指標に相補能を解析した。LETM1のドメイン欠損体を用いた解析の結果、LETMホモロジドメインが相補能にとって不可欠であり、ロイシンジッパーとEFハンドは必要ないことが明らかとなった。さらに、LETMホモロジドメインの酵母からヒトまで保存された9残基をアラニンに置換した変異体も相補能を有していなかったことから、LETMホモロジドメインの固有の残基が重要であることが明らかとなった。

(2) LETM1過剰発現細胞でのクリステ構造の解析；

LETM1ノックダウン細胞では、クリステ構造が消失し、ミトコンドリアが膨潤していたことから、LETM1の過剰発現は、クリステ構造をより発達させる効果が期待できた。そこで免疫電子顕微鏡の解析により、ヒトLETM1を過剰発現したHeLa細胞を観察したところ、クリステ膜同士が部分的に張り付き、ハニカム構造を作ることが判った。さらに、内部のマトリックスの電子密度が上昇していることから、内膜に囲まれた部分が収縮し、マトリックスの内容物が濃縮されていると考えられた。

(3) 折りたたみ膜構造の再構築；
カイコで発現したLETM1を精製後、人工リポソームに埋め込み、折り畳み膜構造を再構成する際に、まず最初に電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法を検討した。再構成後のリポソームを蛍光色素DiIで染色してみると、蛍光顕微鏡で1 μm以上のリポソームが観察されたが、ネガティブ染色法では100 nm程度の小さなリポソームしか観察できず、物理的に膜の折り曲げを観察するのに不利だった。そこで、急速凍結置換法により電子顕微鏡解析を試みた。その際、有機溶媒への置換操作によりリポソーム消失を防ぐため、BSAやリゾチームなどの蛋白質を緩衝剤として溶液に加え実験を行った。その結果、リゾチームを加えたサンプルで明らかな膜の陥入をもつリポソームを観察できた。さらに、調製したサンプルにショ糖(0.25 M)を加え、直後に急速凍結置換法によりサンプルを調整することで、安定して500 nm以上の大きなリポソームが電子顕微鏡で観察できるようになった。これは、界面活性剤存在下での希釈によるリポソーム形成法では、初めての大きなリポソームの報告だと考えられる。

確立した方法で、LETM1 リコンビナントタンパク質をリポソームに再構成すると、球状のリポソーム膜が多重に内側に落ち込んだ構造体を観察することに成功した。今後は、この構造体へのLETM1の局在や(2)で同定したLETM1変異体を用いて、この構造体とLETM1の機能相関を明らかにする予定である。

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1件)

(1) Tamai, S., Iida, H., Yokota, S., Sayano, T., Kiguchiya, S., Ishihara, N., Hayashi, J.-I., Mihara, K., and Oka, T. (2008) Characterization of the mitochondrial protein LETM1, which maintains the mitochondrial tubular shapes and interacts with an AAA-ATPase BCS1L. *J. Cell Sci.* **121**, 2588-2600.

[学会発表] (計2件)

(1) 日本生化学会・日本分子生物学会合同大会 平成20年12月9日 神戸ポート

アイランド 「Regulation of mitochondrial morphology and cristae organization」

(2) 日本生化学会 平成21年10月23日 神戸ポートアイランド 「ミトコンドリアのクリステ構造の制御因子とその形成機構」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 敏彦 (OKA TOSHIHIKO)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：40263321

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：