

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460069

研究課題名(和文) 多層的オミックス解析によるミトコンドリア透過性遷移の制御因子の探索

研究課題名(英文) Omics analyses of the regulatory mechanisms of mitochondrial permeability transition

研究代表者

山本 武範 (YAMAMOTO, Takenori)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・講師

研究者番号：80457324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアに過剰なカルシウムが取り込まれると、その膜透過性が亢進する「透過性遷移」という現象が引き起こされ、細胞死が誘導される。ミトコンドリアへのカルシウム取込みは透過性遷移の起点だが、その取込みの仕組みは十分に理解されていない。

本研究では、酵母を使って、ミトコンドリアカルシウム取込みの制御機構を詳細に解析できる独自の実験系を構築した。この実験系を用いた検討の結果、MCUとEMREというタンパク質がカルシウム取込みの本質的な制御因子であることを明らかにした。また、EMREについて詳細に解析を行い、EMREがMCUの形成するチャンネル孔を開孔状態に固定する因子であることを提唱するに至った。

研究成果の概要(英文)：The mitochondrial calcium uniporter (MCU) complex is a highly-selective calcium channel, and this complex is believed to consist of a pore-forming subunit, MCU, and its regulatory subunits. As yeast cells lack orthologues of the mammalian proteins, the yeast expression system for the mammalian calcium uniporter subunits is useful for investigating their functions. We here established a yeast expression system for the mouse MCU and 7 other subunits. Using this expression system, we analyzed the essential MCU regulator (EMRE), which is a key subunit for Ca<sup>2+</sup> uptake but whose functions and structure remain unclear. Deletion of acidic amino acids conserved in EMRE did not significantly affect Ca<sup>2+</sup> uptake; thus, EMRE did not have basic properties of ion channels such as ion-selectivity filtration and ion concentration. Meanwhile, the close interaction between MCU and EMRE suggested that EMRE might be a structural factor for opening of the MCU-forming pore.

研究分野：生化学

キーワード：ミトコンドリア 透過性遷移 カルシウム 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは長らくエネルギー産生器官としてとらえられてきたが、近年では細胞死の制御を担っていることも分かってきた。細胞に死を誘導する刺激、例えば細胞内  $Ca^{2+}$  の増加など、が伝わると、 $Ca^{2+}$  の多くはミトコンドリアに伝えられ、ミトコンドリア膜の物質透過性の上昇を引き起こす。この現象はミトコンドリアの「透過性遷移」と呼ばれ、タンパク質の複合体で構成された小孔が開くことで誘起される。透過性遷移の誘起に伴い、ミトコンドリア内に存在する様々な細胞死の誘導因子が漏出し、これにより細胞は死に至る。このように透過性遷移は、事実上、細胞死実行の最終決定を行うプロセスである。しかし、透過性遷移がどのように引き起こされるのかという疑問については未だ解答が得られていない。

申請者は、酵母がミトコンドリアの機能を欠損していても生育が可能である点に注目し、酵母のミトコンドリアを用いた透過性遷移の解析系を世界に先駆けて確立することによって、この分野に遺伝学的アプローチの道を拓いた。さらにこの解析系を基盤とし、これまでに複数の遺伝子欠損酵母を用いて透過性遷移の制御因子を探索した。その結果、これまで多くの論文の中で透過性遷移の制御因子と目されてきた遺伝子は、いずれも中心的な制御因子ではないことを明らかにした。このことは、未知の透過性遷移の制御因子が存在していることを意味している。

## 2. 研究の目的

本研究では、透過性遷移に対する分子標的薬の開発を最終目標として、基盤となる「酵母を使った透過性遷移の解析系」にオミックス解析を応用した、スクリーニングによって、透過性遷移の制御因子を確実にかつ効率的に同定し、同定された因子の機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

透過性遷移はミトコンドリアへのカルシウムの過剰な蓄積により誘起される。透過性遷移の制御因子を同定するため、ゲノムに無作為に変異を導入した酵母の中から、特徴的な表現型を利用して、透過性遷移に抵抗性を持つ変異株を単離することにより、その変異の位置から透過性遷移の制御遺伝子を同定することを試みた。

## 4. 研究成果

### 透過性遷移の制御分子の探索

本研究において、ミトコンドリア透過性遷移の制御因子を同定するためには、透過性遷移に起因する酵母の表現型が必要とな

る。透過性遷移を誘起する刺激となるのはミトコンドリアへの過剰なカルシウムの蓄積であるが、哺乳類と異なり、酵母のミトコンドリアはカルシウムの取込機能を有していない。このため、野生型酵母に単にカルシウムを添加しても透過性遷移に起因する表現型を観察することはできない。これまでに我々は、酵母から単離したミトコンドリアにカルシウムイオノフォアである ETH129 を処理した後、カルシウムを添加すると透過性遷移を誘起することを報告している。そこでまず、酵母を ETH129 とカルシウムを含む培地で培養した場合に、特徴的な表現型が観察されるかを調べた。その結果、非発酵性炭素源を含む培地に ETH129 と高濃度の  $Ca^{2+}$  を添加した場合に、酵母の顕著な生育低下が認められた。

そこで、この培養条件を用いて、メチルスルホン酸エチル(EMS)を酵母に添加することによって、酵母のゲノムに無作為に変異を導入し、透過性遷移が抑制される復帰変異株を単離することを試みた。検討の結果、復帰変異株のコロニーを得る指摘な EMS 濃度を決定し、複数の復帰変異株を得ることができた。

続いて、得られた変異株のいくつかを選択して培養し、ミトコンドリアを単離して、実際に透過性遷移が抑制されているかを、透過性遷移に伴いミトコンドリアから漏出するシトクロム c を Western blotting で確認することにより調べた。しかしながら、解析した複数のコロニーについては、すべて透過性遷移の抑制は認められなかった。この結果は、今回得られた復帰変異株が、透過性遷移の制御とは無関係な遺伝子への変異導入のために生育が回復した擬陽性株であることを示している。

### ミトコンドリアへの Ca 取込機構の解析

2011~2014 年にかけて、透過性遷移の引き金となるミトコンドリアへのカルシウム取込みを制御するタンパク質群が発見された。ミトコンドリアへのカルシウム取込みは透過性遷移誘導の起点であり、その取込機能を分子レベルで理解することは透過性遷移を制御する創薬に重要である。そこで、本研究では酵母を利用したミトコンドリアカルシウム取込みの分子機能解析も並行して進めることとした。

これまで、他の研究グループにより、ミトコンドリアのカルシウム取込みは 8 種類以上のタンパク質で構成される複合体により行われることが報告されている。しかしながら、これらの因子が実際にどのようにカルシウムを取り込んでいるのかは未だ不明である。我々はまず、どのタンパク質がミトコンドリアのカルシウム取込みに本質的に関与しているのか？という疑問について解答を得ることを試みた。

前述したように、哺乳類とは異なり、酵

母はミトコンドリアのカルシウム取込機能を欠損している。この性質を利用して、哺乳類のカルシウム取込みに関わる8つのタンパク質を個々または様々な組み合わせで酵母に発現させ、酵母のミトコンドリアにカルシウム取込機能が再構成されるかを調べた。

実験の開始当初、哺乳類(マウス)のタンパク質を酵母に発現させるという異種間発現の試みには種々の困難が伴った。しかし検討の末、最終的に全てのタンパク質について、コドンの最適化のみにより、本来のアミノ酸配列を変えず天然型での酵母発現が可能になった。この酵母発現系を用いた検討の結果、これまでに同定されている8種のタンパク質はいずれも単独で酵母に発現させた場合にはカルシウム取込みを行わないことが分かった。一方で、様々な組み合わせで発現させたところ、MCUとEMREという2つのタンパク質を共発現させた場合に、カルシウム取込機能が酵母のミトコンドリアに再構成されることが明らかになった(Yamamotoら、*Biochim Biophys Acta* (2016))。

さらに、MCUとEMREのうち、EMREについて詳細な機能解析をすすめ、EMREはMCUによって形成されるチャネル孔を開口状態に固定する構造因子であることを提唱するに至った(Yamamotoら、*Biochim Biophys Acta* (2016))。

現在、ミトコンドリアへのカルシウム取込みを行う中核分子であることが分かったMCUとEMREを使って、ミトコンドリア透過性遷移を制御する試みを行っている。

#### 今後の課題：

本研究の開始当初、酵母を基盤とするスクリーニングによって、透過性遷移の制御因子の同定を試みていた。しかしながら、スクリーニングに必須となる「透過性遷移に起因する酵母の表現型」を見い出すことができなかった。これは、酵母ミトコンドリアがカルシウム取込機能を欠損している点を補うために酵母の培地に添加するカルシウムイオノフォアが、実際にはミトコンドリア以外の生体膜にも作用してしまうことが原因であると考えられた。

この問題の解決には、酵母のミトコンドリア選択的にカルシウムを取り込ませる何らかの方策が必要となる。そこで我々は、近年発見された哺乳類ミトコンドリアのカルシウム取込みを制御する因子群に注目した。研究の結果、MCUとEMREという2つの因子を酵母に組み込むと、酵母ミトコンドリアにカルシウム取込機能を再構成できることが分かった。この遺伝子改変酵母は「カルシウムを取り込むことができるミトコンドリアを持つ酵母」ということになる。従って、今後はこの酵母株に対する表現型の解析を進めることによって、この酵母株の

表現型を利用した透過性遷移を制御する因子の網羅的な探索が可能になると期待される。

#### 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12件)

#### [原著論文]

1. Yamagoshi R, Yamamoto T, Hashimoto M, Shiotsuki T, Miyoshi H, Terada H, Shinohara Y.  
Identification of amino acid residues of mammalian mitochondrial phosphate carrier important for its functional expression in yeast cells, as achieved by PCR-mediated random mutation and gap-repair cloning.  
**Mitochondrion** 32 (2017) 1-9.  
(査読有)
2. Murai M, Okuda A, Yamamoto T, Shinohara Y, Miyoshi H.  
Synthetic Ubiquinones Specifically Bind to Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1 (VDAC1) in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria.  
**Biochemistry** 56 (2017) 570-581.  
(査読有)
3. Takagi K, Ohgita T, Yamamoto T, Shinohara Y, Kogure K.  
Transmission of External Environmental pH Information to the Inside of Liposomes via Pore-Forming Proteins Embedded within the Liposomal Membrane.  
**Chem Pharm Bull (Tokyo)** 64 (2016) 432-438.  
(査読有)
4. Yamamoto T\*\* (co-corresponding authors), Yamagoshi R, Harada K, Kawano M, Minami N, Ido Y, Kuwahara K, Fujita A, Ozono M, Watanabe A, Yamada A, Terada H, Shinohara Y\*\*.  
Analysis of the structure and function of EMRE in a yeast expression system.  
**Biochim Biophys Acta** 1857 (2016) 831-839.  
(査読有)
5. Yamamoto T (corresponding author), Matsuo T, Yamamoto A, Yamagoshi R, Ohkura K, Kataoka M, and

- Shinohara Y  
Differential immunoreactivities caused by certain amino-acid substitutions in a short peptide: possible effects of differential refolding of the peptide on a nitrocellulose or PVDF membrane.  
**Methods Mol Biol** 1348 (2015) 303-310.  
( 査読有 )
6. Suga T, Asami Y, Hashimoto S, Nonaka K, Iwatsuki M, Nakashima T, Watanabe Y, Sugahara R, Shiotsuki T, **Yamamoto T**, Shinohara Y, Ichimaru N, Murai M, Miyoshi H, Ōmura S, Shiomi K.  
Trichopolyn VI: a new peptaibol insecticidal compound discovered using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* screening system.  
**J Gen Appl Microbiol** 61 (2015) 82-87.  
( 査読有 )
7. Yamamoto A, Hasui K, Matsuo H, Okuda K, Abe M, Matsumoto K, Harada K, Yoshimura Y, **Yamamoto T**, Ohkura K, Shindo M, Shinohara Y.  
Bongkrelic acid analogue, lacking one of the carboxylic groups of its parent compound shows moderate but pH-insensitive inhibitory effects on the mitochondrial ADP/ATP carrier.  
**Chem Biol Drug Des** 86 (2015) 1304-1322.  
( 査読有 )
8. Suga T, Asami Y, Hashimoto S, Nonaka K, Iwatsuki M, Nakashima T, Sugahara R, Shiotsuki T, **Yamamoto T**, Shinohara Y, Ichimaru N, Murai M, Miyoshi H, Ōmura S, Shiomi K. Ascosteroside C, a new mitochondrial respiration inhibitor discovered by pesticidal screening using recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.  
**J Antibiot (Tokyo)** 68 (2015) 649-652.  
( 査読有 )
9. Sugahara R, Jouraku A, Nakakura T, Kusakabe T, **Yamamoto T**, Shinohara Y, Miyoshi H, Shiotsuki T.  
Two adenine nucleotide translocase paralogues involved in cell proliferation and spermatogenesis in the silkworm *Bombyx mori*.  
**PLoS One** 10 (2015) e0119429.  
( 査読有 )
10. Kuwahara K, Harada K, Yamagoshi R, **Yamamoto T**, Shinohara Y.  
Effects of employment of distinct strategies to capture antibody on antibody delivery into cultured cells.  
**Mol Cell Biochem** 404 (2015) 25-30.  
( 査読有 )
11. **Yamamoto T\*\* (co-corresponding authors)**, Ito M, Kageyama K, Kuwahara K, Yamashita K, Takiguchi Y, Kitamura S, Terada H, Shinohara Y\*\*.  
Mastoparan peptide causes mitochondrial permeability transition not by interacting with specific membrane proteins but by interacting with the phospholipid phase.  
**FEBS J** 281 (2014) 3933-3944.  
( 査読有 )
12. Ido Y, Yoshitomi T, Ohkura K, **Yamamoto T**, Shinohara Y.  
Utility of syntenic relationships of VDAC1 pseudogenes for not only an understanding of the phylogenetic divergence history of rodents, but also ascertaining possible pseudogene candidates as genuine pseudogenes.  
**Genomics** 102 (2014) 128-133.  
( 査読有 )
- [学会発表](計 8 件)
1. **山本 武範**, 大園 瑞音, 山越 亮平, 山田 安希子, 廣島 佑香, 寺田 弘, 篠原 康雄  
酵母発現系によるミトコンドリアカルシウムユニポーター(MCU)の構造機能解析  
日本薬学会年会, 2017年3月26-28日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)
2. **山本 武範**, 大園 瑞音, 山越 亮平, 山田 安希子, 廣島 佑香, 寺田 弘, 篠原 康雄  
酵母再構成系を用いたミトコンドリアカルシウムユニポーターの構造機能解析  
第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2016年11月19-20日, 名古屋市立大学薬学部(愛知県名古屋市)
3. **Takenori Yamamoto**, Yamagoshi Ryohei, Harada Kazuki, Kawano Mayu, Minami Naoki, Ido Yusuke, Ozono Mizune, Watanabe Akira, Akiko Yamada, Hiroshi Terada and Yasuo Shinohara  
Analysis of the Structure and Function of EMRE in Mitochondrial Calcium Channel using a Yeast Expression System,  
European Bioenergetics Conference 2016, Convention center, Riva del Garda, Italy, Jul2-7, 2016

4. **山本 武範**, 山越 亮平, 原田 一樹, 河野 麻由, 桑原 かな, 南 尚希, 山田 安希子, 寺田 弘, 篠原 康雄  
ミトコンドリアのカルシウムイオンチャネル複合体における EMRE の機能解析,  
日本薬学会年会, 2016年3月, 横浜パシフィコ (神奈川県横浜市)
5. **山本 武範**, 山越 亮平, 原田 一樹, 河野 麻由, 桑原 かな, 南 尚希, 山田 安希子, 寺田 弘, 篠原 康雄  
酵母を使ったミトコンドリアのカルシウム取込みにおける EMRE の機能解析,  
第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2015 年 11 月 19-20 日, 熊本大学薬学部 (熊本県熊本市)
6. **山本 武範**, 玉置 春菜, 勝田 千恵, 中谷 極, 寺内 さつき, 寺田 弘, 篠原 康雄  
ヒドロキシアパタイトによるミトコンドリアタンパク質分離の分子論,  
第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2015 年 8 月 21-22 日, 長崎大学薬学部 (長崎県長崎市)
7. **山本 武範**  
プロテオミクスによる分離分析技術と生化学的解析を応用したミトコンドリア研究,  
日本薬学会年会, 2015 年 3 月 26-28 日, 神戸学院大学 (兵庫県神戸市)
8. **Takenori Yamamoto**, Ito Mika, Kageyama Keita, Kuwahara Kana, Kikuji Yamashita, Yoshiharu Takiguchi, Seiichiro Kitamura, Hiroshi Terada and Yasuo Shinohara  
Mastoparan causes mitochondrial permeability transition not by interacting with specific proteins, but by interacting with the phospholipid phase,  
The American Society for Cell Biology 2014, Moscorn center, Philadelphia, USA, Dec2-6. 2014.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山本 武範 (YAMAMOTO, Takenori)

徳島大学・先端酵素学研究所・講師

研究者番号：80457324