

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08275

研究課題名(和文)オルガネラ標的創薬を指向したミトコンドリアカルシウム取込みの制御機構の解明

研究課題名(英文)The regulatory mechanisms of mitochondrial calcium uptake

研究代表者

山本 武範(Yamamoto, Takenori)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：80457324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死のキーマシナリーであるミトコンドリアの透過性遷移のON/OFFを制御する分子基盤の構築に向け、その起点となるミトコンドリアのカルシウムユニポーターがカルシウムを取り込む分子機構を解明することにより、筋ジストロフィーなどの細胞死疾患の革新的な治療薬を創製することを目的とした。透過性遷移を制御し得る分子としてカルシウムユニポーターのMCUに焦点を当て、MCUがカルシウムを輸送する分子機構を解析した。その結果、MCUのカルシウムの輸送機能に重要なアミノ酸残基を特定でき、このアミノ酸残基を中心とするMCUのコイルドコイル構造が透過性遷移をON/OFFする標的部位として有用なことが示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は筋ジストロフィーや虚血再灌流障害の原因となるミトコンドリアの透過性遷移を制御することにより、その新規な治療薬の創製を目指すものである。本研究により、透過性遷移の起点を制御するタンパク質であるMCUの機能に重要なアミノ酸残基を同定することができた。ヒトMCUは2019年に詳細な立体構造も明らかになっており、本研究から明らかになった機能に必須なアミノ酸残基の情報を合わせることで、この部位を標的とする新たな阻害剤のデザインが可能になった。ミトコンドリア透過性遷移を選択的に阻害できる化合物は種々の疾患の治療薬創製に繋がるため、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of mitochondrial permeability transition is a key machinery of cell death. Since the mitochondrial calcium uptake is the initial step of mitochondrial permeability transition, the regulation of mitochondrial calcium uptake is important for therapy of some diseases, i.e., muscular dystrophy, which is caused by mitochondrial permeability transition. In this study, we examined the regulatory mechanisms of MCU in mitochondrial calcium uptake. As a result, we revealed amino acid residues which were critical for mitochondrial calcium uptake. These findings suggested that the coiled-coil structure including these amino acid residues would be a critical target for the regulation of mitochondrial permeability transition.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンチャネル カルシウム ミトコンドリア 透過性遷移 コイルドコイル 虚血再灌流障害 筋ジストロフィー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアはエネルギー変換の場であるとともに、Ca²⁺貯蔵庫としても機能し細胞内Ca²⁺ホメオスタシスの維持に寄与している。また、ミトコンドリアへの過剰なCa²⁺の蓄積はミトコンドリア膜の物質透過性を更新させる現象である「透過性遷移」を誘導し、ミトコンドリア機能破綻を引き起こす。ミトコンドリア透過性遷移は虚血再灌流障害や筋ジストロフィーを初めとする種々の疾患を引き起こす原因となる。このため、透過性遷移の制御がこれらの疾患の新たな治療薬の開発に重要と考えられ、このようなオルガネラ標的創薬を指向した研究が世界中で行われている。透過性遷移はミトコンドリアへのCa²⁺の過剰な取り込みが起点となって引き起こされるため、ミトコンドリアCa²⁺取り込みの分子機構の解明が透過性遷移のON/OFFの制御に重要である。

(2) ミトコンドリアがCa²⁺取り込み機能を持つことは1960年代から知られており、その取り込みを司る分子はカルシウムユニポーターと名付けられた。その後、電気生理学的な解析から、カルシウムユニポーターがイオンチャネルであることが明らかにされたが、その分子実体は長らく不明であった (Fig. 1A)。最近、Ca²⁺取り込みに関与するタンパク質として mitochondrial calcium uptake 1 (MICU1)が発見されたことを皮切りに、mitochondrial calcium uniporter (MCU)、mitochondrial calcium uniporter regulator1 (MCUR1)、essential MCU regulator element (EMRE)を初めとするサブユニットが次々と同定された (Fig. 1B)。現在、MCUホモオリゴマーにより形成されたチャネル孔に6種類の調節サブユニットが相互作用することによってCa²⁺取り込みが行われると考えられているが、各サブユニットの構造や機能的な役割は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

チャネル孔を形成するMCUに関してはこれまで最も精力的に研究が進められてきた。MCUは2つの膜貫通領域 (TM1とTM2)とその間にDXXEモチーフ、さらに2つの膜貫通領域を挟むようにコイルドコイルドメイン (CC1とCC2)を有している (Fig. 1C)。これまでの研究から、DXXEモチーフがCa²⁺選択性フィルターとして機能することが明らかにされた。しかし、DXXEモチーフ以外のドメインの機能や、Ca²⁺が細胞質側のDXXEモチーフによって選別された後、どのように内膜中やマトリックスに位置するドメインを通過してマトリックス内に流入するのかは未だ不明である。この点を明らかにすることを目的として、本研究では、MCUの持つ種々のドメインに対する構造機能解析を行った。

3. 研究の方法

ミトコンドリアのカルシウム取り込み機能は真核生物に広く保存されているが、酵母 (*S. cerevisiae*) では欠損しており、そのゲノム上にはMCUを初めとするほぼ全てのサブユニットが存在しない。これまでに我々は、マウスのMCUとEMREを共発現させた酵母から単離したミトコンドリアにCa²⁺取り込み機能が再構成されることを明らかにした¹⁾。本研究では、マウスのMCUとEMREを共発現させた酵母のミトコンドリアを使って、MCUの構造機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) まず、マウスMCUの種々のアミノ酸領域を欠損させた変異体をEMREとともに酵母に発現させ、ミトコンドリアのカルシウム取り込み活性を調べた。その結果、2つのコイルドコイルドメイン (CC1およびCC2)をそれぞれ欠損させた場合にCa²⁺取り込み機能が消失することが分かった。そこで、CC1とCC2におけるコイルドコイル構造の形成がCa²⁺取り込み機能に必要なのかを調べるために、コイルドコイル構造の形成を阻害する点変異をCC1またはCC2に導入

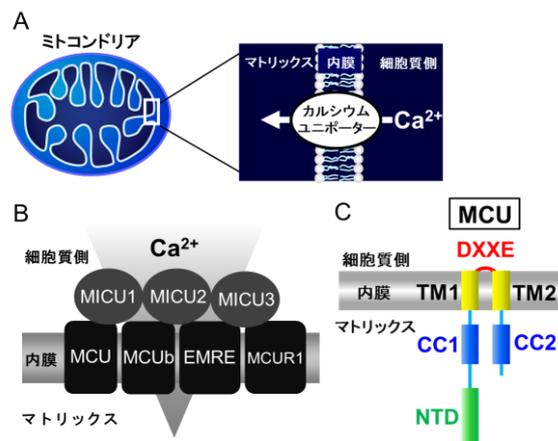


Fig.1 ミトコンドリアのカルシウムユニポーターの構成分子と機能性ドメイン

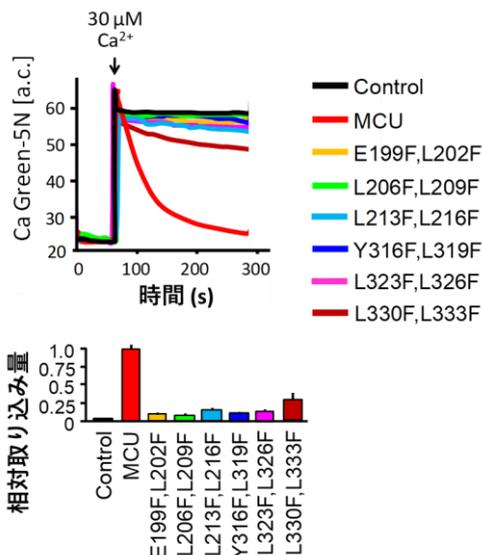


Fig. 2 MCU変異体のCa²⁺取り込み活性

したところ、いずれも Ca^{2+} 取り込み機能が消失した (Fig. 2)。このことから、 Ca^{2+} 取り込みには MCU の CC1 と CC2 がそれぞれコイルドコイル構造を形成することが必要であることが示唆された。続いて、なぜ MCU のコイルドコイル構造が Ca^{2+} 取り込みに必要なかを調べた。過去に、MCU は調節サブユニットである MCUR1 および EMRE と相互作用することが報告されている。そこで、MCU の CC1 と CC2 がこれら調節サブユニットとの相互作用に関わる可能性を検討した。しかしながら、MCUR1 欠損酵母でも、野生型酵母と同様に、MCU の CC1 と CC2 が Ca^{2+} 取り込み機能に必要なであったことから、両コイルドコイルドメインの機能的重要性に MCUR1 は関係無いことが示された。一方、真菌の一種である *D. discoideum* は EMRE 非依存的に Ca^{2+} を取り込む MCU を有している。そこで、*D. discoideum* の MCU についても CC1 と CC2 をそれぞれ欠損させたところ、いずれも Ca^{2+} 取り込み機能が消失した。この結果は、両ドメインの機能的重要性に EMRE も無関係であることを示している。以上の結果は、MCU の CC1 と CC2 は調節サブユニットとコイルドコイル構造を形成するのではなく、CC1 と CC2 の間でコイルドコイル構造を形成し、その構造が MCU のチャネル孔形成に重要であることを示唆している。

(2) 最近、種々の真菌 MCU の立体構造が解明された。我々は *C. europaea* の MCU の立体構造を元に、マウス MCU の立体構造モデルを構築し、CC1 と CC2 の構造を解析した。その結果、CC1 と

CC2 は MCU 分子内で相互作用してコイルドコイル構造を形成していることが確認され、このことは我々が得た生化学的な知見とよく一致していた。また、その立体構造モデルから、CC1 と CC2 によるコイルドコイル構造はイオン選択性フィルターを透過した Ca^{2+} がチャネル内腔からマトリクス内に拡散する出口にあたる空洞を形成することが示唆された (Fig. 3)²⁾。本研究の成果は *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* (2019) 1860(12):148061 に掲載された。すでに海外の論文にも引用されており、関連する分野でのインパクトも大きいと考えている。

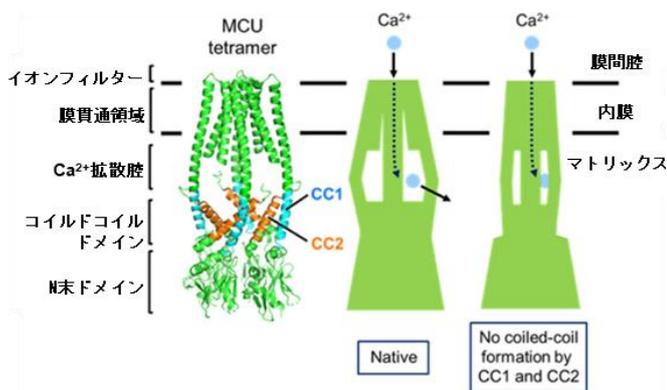


Fig. 3 本研究により提唱された MCU 四量体によるミトコンドリアへの Ca^{2+} の取り込みモデル

(3) 本研究の結果から、MCU の CC1 と CC2 を標的として、コイルドコイル構造の形成を阻害できるような化合物がミトコンドリア Ca^{2+} 取り込みの選択的な阻害剤となり得ることが初めて示唆された。現在、CC に結合する人工ペプチドの創製を開始している。このような試みがミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みが起点となって発症する様々な疾患に対する新たな治療薬開発に繋がることが期待される。

<引用文献>

1) Yamamoto T (corresponding author), 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: 831-839 (2016).

2) Yamamoto T (corresponding author), Ozono M, Watanabe A, Maeda K, Nara A, Hashida M, Ido Y, Hiroshima Y, Yamada A, Terada H, Shinohara Y: Functional analysis of coiled-coil domains of MCU in mitochondrial calcium uptake.

Biochim Biophys Acta Bioenerg. 1860(12):148061 (2019)

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 0件）

1. 著者名 Takenori Yamamoto, Mizune Ozono, Akira Watanabe, Kosuke Maeda, Atsushi Nara, Mei Hashida, Yusuke Ido, Yuka Hiroshima, Akiko Yamada, Hiroshi Terada, Yasuo Shinohara	4. 巻 1860
2. 論文標題 Functional analysis of coiled-coil domains of MCU in mitochondrial calcium uptake	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148061-188071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2019.148061	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 Yufu Unten, Masatoshi Murai, Takenori Yamamoto, Akira Watanabe, Naoya Ichimaru, Shunsuke Aburaya, Wataru Aoki, Yasuo Shinohara and Hideto Miyoshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Pentenediol-type compounds specifically bind to voltage-dependent anion channel 1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mitochondria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1141-1154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b01209	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 Takenori Yamamoto, Moe Tsunoda, Mizune Ozono, Akira Watanabe, Kazumasa Kotake, Yuka Hiroshima, Akiko Yamada, Hiroshi Terada and Yasuo Shinohara	4. 巻 652
2. 論文標題 Polyethyleneimine renders mitochondrial membranes permeable by interacting with negatively charged phospholipids in them	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 9-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2018.06.003	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 Fujita Satoshi, Suyama Masaki, Matsumoto Kenji, Yamamoto Atsushi, Takenori Yamamoto, Yuka Hiroshima, Iwata Takayuki, Kano Arihiro, Yasuo Shinohara and Shindo Mitsuru	4. 巻 74
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of simplified functionalized bongkreikic acid analogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 962-969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2018.01.018	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 Yuka Hiroshima, Takenori Yamamoto, Watanabe Masahiro, Yoshinobu Baba and Yasuo Shinohara	4. 巻 15
2. 論文標題 Effects of cold exposure on metabolites in brown adipose tissue of rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 36-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgmr.2018.01.005	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 Masatoshi Murai, Ayaka Okuda, Takenori Yamamoto, Yasuo Shinohara and Hideto Miyoshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Synthetic Ubiquinones Specifically Bind to Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1 (VDAC1) in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mitochondria., <i>Biochemistry</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 <i>Biochemistry</i>	6. 最初と最後の頁 570-581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.6b01011	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 Yuya Yoshimura, Kosuke Fujisaki, Takenori Yamamoto and Yasuo Shinohara	4. 巻 137
2. 論文標題 Pharmacokinetic Studies of Orally Administered Magnesium Oxide in Rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the Pharmaceutical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 581-587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.16-00020	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 R Sugahara, A Jouraku, T Nakakura, M Minaba, Takenori Yamamoto, Yasuo Shinohara, H Miyoshi and T Shiotsuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Tissue-specific expression and silencing phenotypes of mitochondrial phosphate carrier paralogues in several insect species.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 <i>Insect Molecular Biology</i>	6. 最初と最後の頁 332-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imb.12297	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 Takenori Yamamoto, Akiko Yamada, Ozono Mizune and Watanabe Akira	4. 巻 89
2. 論文標題 The Functions of EMRE in Mitochondrial Calcium Uptake System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Seikagaku	6. 最初と最後の頁 453-457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890453	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 Yuka Hiroshima, Eijiro Sakamoto, Kaya Yoshida, Kaori Abe, Koji Naruishi, Takenori Yamamoto, Yasuo Shinohara, Jun-ichi Kido and Carolyn L Geczy	4. 巻 119
2. 論文標題 Advanced glycation end-products and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide increase calprotectin expression in human gingival epithelial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1591-1603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.26319	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10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山本武範
2. 発表標題 ミトコンドリアのカルシウム取り込み制御の分子機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本武範、大園瑞音、渡辺朗、前田康輔、奈良篤、橋田芽依、井戸佑介、山田安希子、寺田 弘、篠原康雄
2. 発表標題 トコンドリアカルシウムユニポーター(MCU)の コイルドコイルドメインの構造機能解析
3. 学会等名 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 朗、山本 武範、前田 康輔、山田 安希子、井戸 佑介、寺田 弘、篠原 康雄
2. 発表標題 ミトコンドリアカルシウムユニポーター複合体におけるコアサブユニットの化学量論比の決定
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 武範
2. 発表標題 酵母再構成技術を用いた ミトコンドリアのCa ²⁺ 輸送メカニズムの解明
3. 学会等名 第4回 産業技術総合研究所 オープンイノベーションワークショップ(バイオナノ研究会) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大園 瑞音, 問山 温未, 井戸 佑介, 山本 武範, 篠原 康雄
2. 発表標題 ミトコンドリアのADP/ATP輸送体のボンクレキン酸との相互作用に關与するアミノ酸の同定
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学术大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 武範, 角田 萌, 渡辺 朗, 大園 瑞音, 井戸 佑介, 廣島 佑香, 山田 安希子, 寺田 弘, 篠原 康雄
2. 発表標題 ポリエチレンジイミンがミトコンドリアからの シトクロムc漏出を誘起するメカニズム
3. 学会等名 第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣島 佑香, 山本 武範, 篠原 康雄
2. 発表標題 最終糖化産物とPorphyromonas gingivalis由来LPSが誘導するヒト歯肉上皮細胞の遺伝子発現の解析
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takenori Yamamoto, Mizune Ozono, Akira Watanabe, Kousuke Maeda, Akiko Yamada, Hiroshi Terada and Yasuo Shinohara
2. 発表標題 The structure-function analysis of mitochondrial calcium uniporter (MCU) using a yeast expression system
3. 学会等名 The 20th European Bioenergetics Conference, Budapest (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大園 瑞音, 山本 武範, 渡辺 朗, 山田 安希子, 廣島 佑香, 寺田 弘, 篠原 康雄
2. 発表標題 ミトコンドリアカルシウムユニポーター(MCU)の構造と機能の相関解析
3. 学会等名 第9回日本生物物理学会中国四国支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高 暢秀, 山本 武範, 渡辺 朗, 廣島 佑香, 山田 安希子, 寺田 弘, 篠原 康雄
2. 発表標題 哺乳類ミトコンドリアに存在するMitochondrial Calcium Uniporter (MCU) の定量解析
3. 学会等名 第56回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----