

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840020

研究課題名(和文)ミトコンドリア-小胞体係留複合体構成因子Mmm1とMdm12の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of Mmm1 and Mdm12 in the ERMES complex

研究代表者

河野 慎(KAWANO, Shin)

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

研究者番号：90431676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母において近年発見されたERMES(ER-mitochondria encounter structure)複合体は、小胞体とミトコンドリア外膜を物理的、機能的に繋留する超タンパク質複合体である。本研究では、ERMES複合体構成因子の1つであるMdm12の構造機能解析及び、他の因子であるMmm1の機能解析を行った。Mdm12の結晶構造にはリン脂質が結合している様子が観察された。さらにMdm12は、Mmm1と複合体を形成することで、リン脂質輸送能が促進されることが示された。以上の結果よりMdm12とMmm1複合体は、ERMES複合体のリン脂質輸送の最小単位である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The ERMES complex was recently found to be involved in the tethering system between ER and mitochondria in yeast. The complex consists of four core components (Mmm1, Mmm2, Mdm10, and Mdm12) and is supposed as a transducer of phospholipids between those two organelle. In this study, we succeeded in determining the crystal structure of Mdm12. In addition, the functional analyses of Mdm12 and Mdm12-Mmm1 soluble domain complex were also performed. The crystal structure of Mdm12 belongs to SMP domain fold, which can accommodate a phospholipid in its cave structure. Furthermore, in vitro lipid transfer assay using Mdm12 and Mdm12-Mmm1 complex showed that the lipid transfer activity of Mdm12 was largely enhanced by forming a hetero oligomeric complex with Mmm1. These observations indicate that ERMES complex transfers phospholipids between the ER and mitochondrial outer membrane via Mdm12-Mmm1 complex as a minimal unit.

研究分野：構造生物学

キーワード：結晶構造 オルガネラネットワーク リン脂質

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母における小胞体とミトコンドリア間を物理的に繋留する実体として、ERMES (endoplasmic reticulum mitochondria encounter structure) 複合体が発見されたことで、オルガネラ間ネットワークに関する研究が、世界的に開始される契機となった。ERMES 複合体の発見によって、オルガネラ間が物理的に相互作用している部位、すなわちコンタクトサイトと呼ばれる領域の本体が、タンパク質により構成されていることが初めて生化学的な実験的により明らかとなった。加えて、ERMES 複合体構成因子の欠損により、ミトコンドリア特有のリン脂質であるカルジオリピン (CL) の減少が観測された。CL は、小胞体で合成されたホスファチジン酸 (PA) を原材料として生合成されることは知られていたが、CL 合成に関わる一連の酵素群は全てミトコンドリアに局在しており、PA は CL 合成のために、小胞体からミトコンドリアへの輸送される必要がある。また、主要な膜構成リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) は主にミトコンドリアで合成される一方で、その原材料であるホスファチジルセリン (PS) と、PE を原材料として合成されるホスファチジルコリン (PC) は共に小胞体で合成されることから、両オルガネラ間のリン脂質輸送経路の存在が想定されていたものの、小胞輸送システムが存在しないオルガネラどうし、どのようにして不溶性のリン脂質を輸送しているのか、その実体は明らかとなっていなかった。このような背景から、ERMES 複合体が両オルガネラを物理的に繋留することで、リン脂質の輸送を担っていると期待されるようになった。さらにその他の実験証拠としては、バイオインフォマティクスに基づく解析により、ERMES 複合体の主要な構成因子である Mmm1、Mdm10、Mdm12、および Mdm34 のうち、Mdm10 を除く 3 つのタンパク質が、SMP (synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein) ドメインと呼ばれるモチーフを有していることが示された。SMP ドメインは、ある種のリン脂質結合タンパク質に共通して見られる構造を有することが推測されることから、これらのタンパク質から構成される ERMES 複合体が、リン脂質の輸送体であるという考え方が広く支持されるようになった。

しかしながら、このように ERMES 複合体とリン脂質輸送の関係性を示す状況証拠が集積していった一方で、肝心の ERMES 複合体が直接リン脂質を輸送している実験的な証拠は得られていなかった。すなわち ERMES 複合体は、構成因子に GFP を融合させたタンパク質を発現させた場合に、蛍光顕微鏡下でミトコンドリア上に蛍光のドットして観測されていたものの、精製された複合体としては得られておらず、そのため *in vitro* のリン脂質輸送測定系が確立していな

かった。さらに、構成因子の立体構造情報も得られておらず、リン脂質輸送の分子メカニズムを考える上で情報が圧倒的に不足している状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、ERMES 複合体による小胞体 - ミトコンドリア間の繋留メカニズムを解明することを試みた。特に、ERMES 複合体構成因子の結晶構造解析を通じた、推定機能であるリン脂質輸送の分子メカニズムの解明を目指し、解析を行った。また、前述のように ERMES 複合体は、主要 4 つのタンパク質から構成されているが、その相対位置や化学量論についてもほとんど情報が得られていなかった。そこで、*in vivo* および *in vitro* 光架橋や NMR を用いて、各構成タンパク質どうしの分子間相互作用地図の作成を試みた。複合体体内における構成因子の相互作用地図は、それぞれの構成因子がどのように結びつくことで、ERMES 複合体という巨大な分子システムを構築するか、ということ明らかとすることが期待できると同時に、構成因子 4 つのうち、3 つのタンパク質が共有する共通のモチーフである SMP ドメインが、どのように使い分けされているか、という謎の解明に大きく貢献できると期待された。

3. 研究の方法

本研究は ERMES 複合体の機能解明を目指し、X線結晶構造解析による構成因子の立体構造情報の取得および、各種生化学的解析によるリン脂質輸送メカニズムの解明を行った。機能解析を進める上で、立体構造情報は極めて重要であるため、最重要課題として取り組んだ。また、研究代表者が所属する研究室でその有用性が確認された、*in vivo* 部位特異的光架橋法を用いて、生体内における ERMES 複合体構成因子どうしの相互作用解析を試みた。*in vivo* 部位特異的光架橋法は、解析したいタンパク質の標的アミノ酸の部位に、光架橋性の側鎖を持つ *p*-benzoylphenylalanine (BPA) が導入されたタンパク質を、生体内で発現させることで、生きた細胞内におけるタンパク質の相互作用パートナーを解析できる手法である。具体的には、目的タンパク質の遺伝子の標的アミノ酸に相当するコドン、出現頻度の低いストップコドンであるアンバーコドン (TAG) に置き換える。そして、TAG を特異的に認識できるアンバーサプレッサー-tRNA および、アンバーサプレッサー-tRNA に BPA をチャージすることができるアミノアシル-tRNA 合成酵素を、細胞内で共発現させる。この時培地中に BPA を加えることで、TAG を導入した部位特異的に BPA を持つタンパク質を得ることができる。加えて、精製タンパク質を用いた *in vitro* 部位特異的光架橋法も本研究で確立し、機能解析に用いたサンプルそのものにおける相互作用解析も試みた。*in vitro*

部位特異的光架橋法は、Cys 残基を介した 4-N-maleimidobenzophenone (NMBP) による修飾を用いた。NMBP はチオール基特異的に結合するマレイミド基と、光架橋性のベンゾフェノン基を持つ修飾剤で、タンパク質の表面に存在する Cys 残基にベンゾフェノン基を導入することができる。本研究では、Mdm12 の様々な位置に Cys 残基を導入し、相互作用パートナーである Mmm1 との複合体を調製後、光架橋形成を行うことで、Mdm12 と Mmm1 の相互作用界面の探索を試みた。

4 . 研究成果

Mdm12 の X 線結晶構造解析を試みた。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の Mdm12 に加えて、*Kluyveromyces lactis* 由来 Mdm12 に関しても、大腸菌を用いた組換えタンパク質の大量調製系を構築し、構造解析を試みた。その結果、*K. lactis* 由来 Mdm12 の結晶を得ることに成功し、セレン誘導体結晶を用いて、単波長異常分散法による構造決定に成功した。さらに、*K. lactis* 由来 Mdm12 を、ジメチルアミノボラン存在下でホルムアルデヒドを作用させることで、リジン残基をジメチル化修飾した結果、得られた結晶の分解能向上が見られ、最終的に 2.3 Å 分解能での構造決定に成功した。以下、*K. lactis* 由来 Mdm12 を Mdm12 と称する。Mdm12 は、バイオインフォマティクス解析より予測された通り、ある種のリン脂質結合タンパク質に見られる特徴的なトンネル構造を有していた。さらに、ジメチルリジン修飾を受けたタンパク質結晶の高分解能データセットから得られた構造では、そのトンネル構造にリン脂質が結合していることが観察された (図 1)。リン脂質を認識するトンネルは、全て疎水性のアミノ酸により構成されており、特にリン脂質のアシル基が認識されていた。一方で、親水性の頭部は完全に溶媒に露出していたことから、Mdm12 によるリン脂質認識において、頭部への特異性は低いと考えられる。事実、精製タンパク質に結合しているリン脂質を解析した結果、大腸菌由来の主要なリン脂質であるホスファチジルグリセロールと PE が検出されたことから、Mdm12 のリン脂質頭部の認識に厳密性が見られない結晶構造と一致した。これらの観察より、

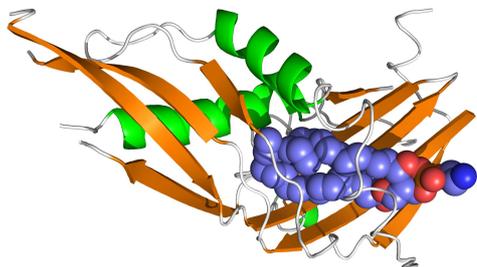


図 1 Mdm12 の結晶構造
Mdm12 に結合したリン脂質 (PE) をスペースフィルモデルで示す。

Mdm12 は、リン脂質結合タンパク質であること、そして Mdm12 を含む ERMES 複合体の機能は、小胞体とミトコンドリア間のリン脂質の輸送であることが強く示唆された。

次に、Mdm12 を用いた *in vitro* リン脂質輸送アッセイの確立を試みた。精製した Mdm12 および、Mmm1 の可溶性ドメインとの複合体を用いて、リポソームからの蛍光リン脂質の輸送および、リポソームへの蛍光リン脂質の受け渡し能力を確認した。タンパク質とリポソームを混合し、ショ糖密度勾配遠心を行い、反応後のタンパク質とリポソームを分離して解析したところ、Mdm12 および Mmm1 との複合体共に活性を示したが、複合体の活性の方が高かった (図 2)。これは、リポソームのみならず、単離ミトコンドリアを用いた輸送系においても同様の傾向が見られた。これらの観察より、ERMES 複合体において、Mmm1 と Mdm12 複合体がリン脂質輸送を担っている可能性が強く示唆された。

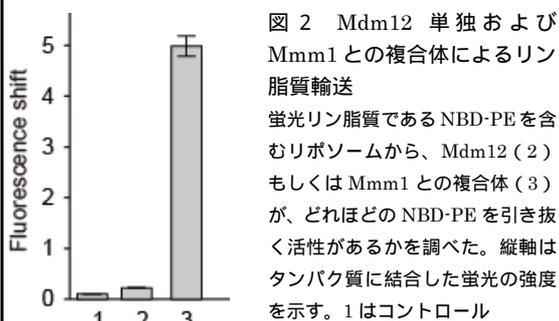


図 2 Mdm12 単独および Mmm1 との複合体によるリン脂質輸送
蛍光リン脂質である NBD-PE を含むリポソームから、Mdm12 (2) もしくは Mmm1 との複合体 (3) が、どれほどの NBD-PE を引き抜く活性があるかを調べた。縦軸はタンパク質に結合した蛍光の強度を示す。1 はコントロール

Mmm1 と Mdm12 の相互作用解析も行った。上述の *in vivo* 部位特異的光架橋実験は、Mdm12 の立体構造情報をもとに標的部位を決定することはできたものの、残念ながらタンパク質へ BPA の導入を効率よく行うことができず、*in vitro* の系に切り替えた。Mdm12 の立体構造情報から、可溶媒接触面積が大きい 21 残基を抽出し、Cys 変異を導入した。そしてそれぞれの Mdm12 変異体を、野生型と同様に Mmm1 との複合体として調製し、光架橋形成の確認を行った。現在も解析を進めている状況であるが、NMBP による修飾後、光照射依存的に Mmm1 と架橋を与える部位を同定した (図 3)。今後残りの変異体についても研究を継続することで、Mmm1 との相互作用地図の作成を行う。

次に、Mdm12 の結晶構造に基づき、リン脂質認識に関与する残基について変異体を作成したところ、そのほとんどが立体構造形成に異常を示し、組換えタンパク質として精製されなかった。これはおそらく、Mdm12 とリン脂質の結合は、機能発現のみならず、正常な構造維持に必須であるため、リン脂質認識部位への変異により構造が不安定化するためであると考えられた。そこで、Mdm12 と複合体を形成しかつ、Mdm12 と配列上相同性 (~ 20%) のみられる Mmm1 につい

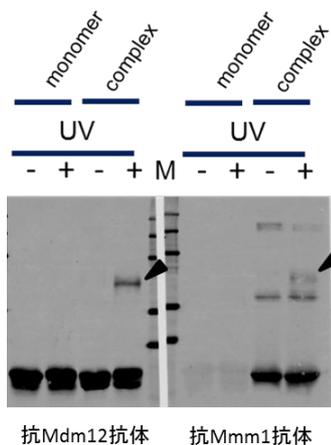


図3 *in vitro* 部位特異的光架橋

Mdm12 に Cys 残基を介して NMBP を導入し、単独 (monomer) および Mmm1 との複合体 (complex) における光架橋形成を、それぞれの抗体を用いて検出した。矢頭で示す部分に、紫外線照射 (UV) 依存的な架橋産物の形成が見られる。

て変異体解析を行った。Mdm12 の構造をもとに Mmm1 のモデル構造を構築し、リン脂質認識に関与すると推測される疎水性残基を、それぞれセリンに置換した変異体を作成した。そして、Mdm12 との複合体および Mmm1 単独のタンパク質を用いたリン脂質輸送実験を行った。その結果、Mmm1 変異体は、単独および Mdm12 との複合体において、野生型よりもリン脂質輸送能が低下することが明らかとなった。これらの観察より、SMP ドメインを有する Mmm1 および Mdm12 両タンパク質は、類似した機構、すなわち疎水性のトンネル構造でリン脂質を認識しており、さらにそれらのタンパク質によるリン脂質の認識は、輸送にも重要であることが明らかとなった (図4)。

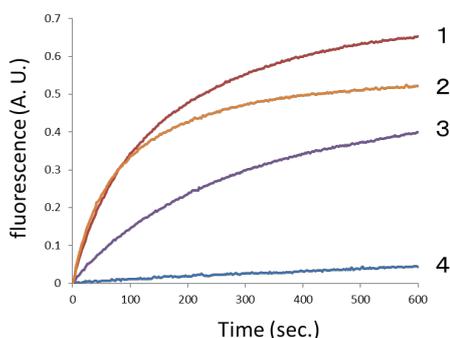


図4 Mmm1 変異体と Mdm12 複合体のリン脂質輸送モデル構造から推測した Mmm1 のリン脂質認識部位変異体 (2、3) を用いて、リン脂質輸送実験を行った。縦軸は移動したリン脂質の蛍光の量を、横軸は時間 (秒) を表す。1 は野生型の Mmm1 と Mdm12 複合体で、4 はコントロールのデータを示す。同様の傾向が、Mmm1 単独のタンパク質を用いた解析においても観察されている。

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2件)

渡邊 康紀、田村 康、河野 慎、遠藤 斗志也

Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria

Nature Commun. 6, Article No. 7922 (2015)
DOI: 10.1038/ncomms8922 (査読有)

バイトゥル ラーマン、河野 慎、柚木 芳、安西 高廣、遠藤 斗志也

NMR analyses on the interactions of the yeast Tim50 C-terminal region with the presequence and Tim50 core domain

FEBS Lett. 588, 678-84 (2014) DOI: 10.1016/j.febslet.2013.12.037 (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

河野 慎、遠藤 斗志也

Mdm12 と Mmm1 によるリン脂質輸送メカニズムの解明

BMB2015 2015年12月1日~2015年12月4日 神戸国際会議場(神戸市)

河野 慎、渡邊 康紀、田村 康、遠藤 斗志也

膜間リン脂質輸送の構造生物学

第67回細胞生物学会大会 2015年6月30日~2015年7月2日 タワーホール船堀(東京都)

河野 慎、遠藤 斗志也

ERMES 複合体によるリン脂質輸送の構造基盤

第15回蛋白質科学会年回 2015年6月24日~2015年6月27日 あわぎんホール(徳島市)

河野 慎、浅井 絵里、スチンバラ、遠藤 斗志也

ERMES 複合体構成因子 Mdm12 および Mmm1 によるリン脂質輸送メカニズムの解明

第87回日本生化学会大会 2014年10月15日~2014年10月18日 京都国際会館(京都市)

河野 慎、浅井 絵里、スチンバラ、遠藤 斗志也

小胞体 - ミトコンドリア繫留複合体 (ERMES 複合体) 構成因子 Mdm12 の構造機能相関

第14回蛋白質科学会年回 2014年6月25日~2014年6月27日 ワークピア横浜(横浜市)

河野 慎、スチンバラ、浅井 絵里、遠藤 斗志也

Structural analysis of Mdm12

DynaMito 2013 2013年10月28日~2013年11月1日 沖縄残波岬ロイヤルホテル(沖縄県中頭郡読谷村)

河野 慎、スチンバラ、遠藤 斗志也

ERMES 複合体構成タンパク質 Mdm12 の構造解析

第86回日本生化学会大会 2013年9月11日~2013年9月13日 パシフィコ横浜(横浜市)

河野慎、スチンバラ、遠藤斗志也
ERMES 複合体構成タンパク質 Mdm12 の構造解
析
第 13 回蛋白質科学会年回 2013 年 6 月 12 日
～ 2013 年 6 月 14 日 とりぎん文化会館（鳥
取市）

〔その他〕
ホームページ等
<http://endolab.jp/wp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河野 慎 (KAWANO, Shin)
京都産業大学・総合生命科学部・研究助教
研究者番号：9 0 4 3 1 6 7 6