

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840026

研究課題名(和文)再構成OPA1を用いたミトコンドリア内膜融合機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion in mitochondria using OPA1 proteoliposome

研究代表者

伴 匡人(Tadato, Ban)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、外膜と内膜に囲まれた二重膜構造のオルガネラであり、融合と分裂を繰り返しながら、その形態や構造を変化させている。OPA1は、内膜融合、クリステ構造形成に中心的な役割を持つGTP加水分解蛋白質であるが、内膜融合に於ける挙動や作用機序については分かっていないことが多い。本研究では、カイコ・バキョロウイルス発現によるリコンビナントOPA1を使ったin vitro膜融合アッセイを確立し、詳細な解析を行った。その結果、OPA1はミトコンドリアに局在する脂質カルジオリピンとの相互作用を軸とする独自の分子機構で、ミトコンドリア内膜融合を制御することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are highly dynamic organelles that undergo frequent fusion and fission. OPA1 is an essential GTPase protein for both mitochondrial inner membrane fusion and cristae structure. OPA1 is proteolytically processed into inner membrane-bound long isoforms (L-OPA1) and soluble short isoforms (S-OPA1). However, little is understood about how OPA1 regulate the membrane morphology. We have developed methods to express and purify human OPA1 using the BmNPV bacmid-silkworm expression system, and found that L-OPA1 on one side of membrane, and CL on the other side are sufficient for the fusion. GTP-independent heterotypic membrane tethering through L-OPA1 and CL primes the subsequent GTP-hydrolysis-dependent fusion, which can be modulated by the presence of S-OPA1. These results unveil the unique intracellular membrane fusion machinery unlike other fusogenic proteins, such as large GTPases mitofusins on mitochondrial outer membrane, and atlastins on endoplasmic reticulum

研究分野：構造生物学

キーワード：ミトコンドリア 膜融合 GTPase プロテオリポソーム カルジオリピン

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、外膜と内膜に囲まれた二重膜構造のオルガネラであり、融合と分裂を繰り返しながら、その形態や構造を変化させている。この動的なミトコンドリアの形態変化は、ミトコンドリア膜に於ける蛋白質や脂質などの生体分子間の相互作用、複合体形成により、複雑かつ厳密に制御されている(引用文献)。これまでに融合・分裂因子として、さまざまなダイナミン様 GTPase 群が同定されている。外膜の Mfn1/2 が外膜融合を、内膜の OPA1 が内膜融合を促進、また細胞質の Drp1 が、外膜に集まり分裂を促進する。ミトコンドリア融合・分裂が、細胞機能と密接に関連することから、これらの GTPase の挙動や作用機序を分子レベルで理解することが幅広い研究領域で重要となっている。しかしながら、融合因子である Mfn や OPA1 は比較的大型の膜蛋白質であることから、蛋白質科学や構造生物学手法に基づく研究がほとんどなく、解決すべき課題として残されている。

OPA1 は、ミトコンドリア内膜に局在する 960 残基の蛋白質であり、膜貫通領域を持つ L-OPA1 と、膜貫通領域が酵素切断された S-OPA1 の両フォームが存在するダイナミン様 GTPase であることから、ダイナミンと同様に生体膜表面で会合体を形成し、膜構造変化を引き起こすことが予想された。しかし実際、その一次構造を比較すると、GTPase ドメイン以外の相同性は低く、ダイナミンの持つ膜結合ドメインが保存されていない。また L-OPA1 はダイナミンと異なり、N 末端に膜貫通領域を持つことや、OPA1 が内膜同士を繋留することで、内膜のくびれを形成することが報告されており(引用文献)、果たしてダイナミンと同様の挙動を示すか不明であった。研究代表者は、これまでに大腸菌で可溶性蛋白質として発現した S-OPA1 を使い、生体膜構造への影響及び内膜融合における役割を検討している。人工脂質二重膜であるリポソームを使った実験から、S-OPA1 はリポソーム上に結合し、その GTPase 活性を促進することが分かった。S-OPA1 が結合したリポソーム表面からチューブ状突起が伸長すること、さらに電子顕微鏡により、リポソーム表面で S-OPA1 が規則的な会合体を形成していることを示した。これらのことから、哺乳動物のミトコンドリア融合制御に関わる GTPase が、脂質膜の形態変化を誘起することを世界で初めて示すことができた(引用文献)。しかし同時に S-OPA1 のみでは膜融合自体を観察することができなかった。これまでに培養細胞を使った研究から、内膜融合には L-OPA1 のみが必要であるとの報告や(引用文献)、L-OPA1 と S-OPA1 の両者が必要だという報告(引用文献)などがあり、現在も内膜融合時の L-OPA1 と S-OPA1 の役割については統一的な見解が得られていなかった。また L-OPA1 の GTP 加水分解活性の

意義や、膜上での会合体形成挙動も明らかになっていない。そこで研究代表者は、ミトコンドリア内膜融合の分子機構を本質的に理解するには、これまでリコンビナント蛋白質が報告されたことのない L-OPA1L を発現・精製し、ミトコンドリア内膜組成を模したリポソーム中に再構成し、さらに S-OPA1 を添加し、それらの活性を詳細に解析する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアは動的なオルガネラであり、融合と分裂によりその形態を制御している。融合因子としてダイナミン様 GTPase が同定されているが、その作用機序は長らく解析されてこなかった。本研究では、以下の2点を中心な目的とした。(1) これまでリコンビナント蛋白質の発現が報告されていない内膜融合因子 L-OPA1 をプロテオリポソーム中に再構成し、*in vitro* アッセイを構築すること。(2) 詳細な解析から「内膜融合因子 OPA1 が、どのように膜構造の変化に寄与するか？」を明らかにすることで、内膜融合の分子機構の理解を飛躍的に発展させること。

## 3. 研究の方法

「内膜融合因子 OPA1 が、どのように膜構造の変化に寄与するか？」を明らかにすることで、ミトコンドリア内膜融合の分子機構に迫った。

### (1) カイコ・バキュロウイルスによるリコンビナント L-OPA1 発現

OPA1 のように分子量 10 万を超える比較的大型の膜蛋白質は、発現・精製の問題から、*in vitro* アッセイに必要な大量かつ純度の高いリコンビナント蛋白質を調製することがしばしば困難である。そこでカイコ・バキュロウイルス発現系を用いて、L-OPA1 を得た。カイコ細胞に感染するバクミド DNA は、北海道大学薬学研究院 前仲 勝実教授の供与を受けた大腸菌コンピテントセル BmDH10Bac を使って用意した(引用文献)。バキュロウイルスに感染したカイコ幼虫から脂肪体を回収し、界面活性剤で可溶化後、各種クロマトグラフィーにより L-OPA1 を精製した。

### (2) プロテオリポソームへの再構成

リポソームへの再構成は、L-OPA1 とミトコンドリア膜を模倣したリポソームを混合し、界面活性剤を透析により除くことで行った。この L-OPA1L プロテオリポソームを使い、その挙動を詳細に解析した。

### (3) *in vitro* 膜融合アッセイ

*in vitro* 膜融合アッセイは、384 穴プレート中でプロテオリポソームを混合することによって行った。一方のプロテオリポソームには、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を生じる蛍光色素 NBD と Rhodamine (Rh) で修飾した。膜融合に伴うリポソーム膜の表面積増大により、NBD-Rh 間の FRET が消失する効果

を利用して、膜融合の指標とした。

#### (4) in vitro 膜結合アッセイ

in vitro 膜結合アッセイはビオチンが修飾された脂質を含む L-OPA1 プロテオリポソームとストレプトアビジン結合磁気ビーズを使って行った。磁気ビーズと L-OPA1 プロテオリポソームを結合し、そこに蛍光色素 NBD で標識されたリポソームを加え、30 分間インキュベートした。磁気ビーズを十分に洗浄したあと、NBD 蛍光を測定し、結合したリポソームの指標とした。

### 4. 研究成果

#### (1) カイコ・バキュロウイルス発現によるリコンビナント L-OPA1 の大量発現及び精製法の確立

L-OPA1 の遺伝子を導入したバクミド DNA をカイコ 5 齢幼虫に注射し、ウイルスの感染が確認された幼虫から脂肪体を回収した。脂肪体を超音波破砕機で破砕後、遠心操作により L-OPA を含む沈殿を回収し、界面活性剤ドデシルマルトシドで可溶化後、Ni-sepharose6 クロマトグラフィーにより、L-OPA1 を精製した (図.1)。この手法により、in vitro アッセイを行うに、十分かつ高純度の L-OPA1 を得ることが可能になった。S-OPA1 も同様の手法で発現精製を行った (図.1)。

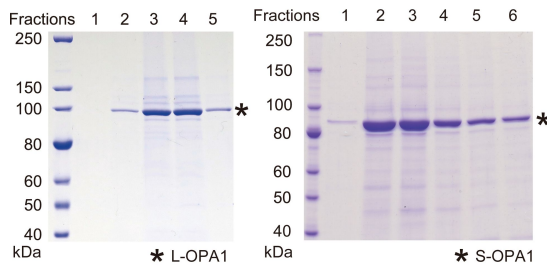


図.1: カイコ脂肪体から精製した L-OPA1 及び S-OPA1

#### (2) L-OPA1 プロテオリポソームによる in vitro 膜融合反応

リコンビナント L-OPA1 を再び Ni-sepharose6 に結合させ、界面活性剤をドデシルマルトシドから Mega8 に置換した。その後、ミトコンドリアに局在する脂質カルジオリピン (CL) を多く含むミトコンドリア内膜を模したリポソーム (CL25; 25% CL, 42% PC, 25% PE, 8% PI) と Mega8 存在下で混合し、透析することにより L-OPA1 プロテオリポソームを得た。L-OPA1 プロテオリポソームを使い、in vitro 膜融合アッセイを行ったところ、L-OPA1 及び GTP 加水分解依存的に膜融合が起こることを示すことができた (図.2a,b)。またカルジオリピンの含有量が少ない外膜を模したリポソーム (CL4; 4% CL, 60% PC, 27% PE, 9% PI) を使ったところ、融合が観察されなかった。このことから、L-OPA1 による膜融合には、カルジオリピンが重要な役割を持つことが示唆された (図.2c)。

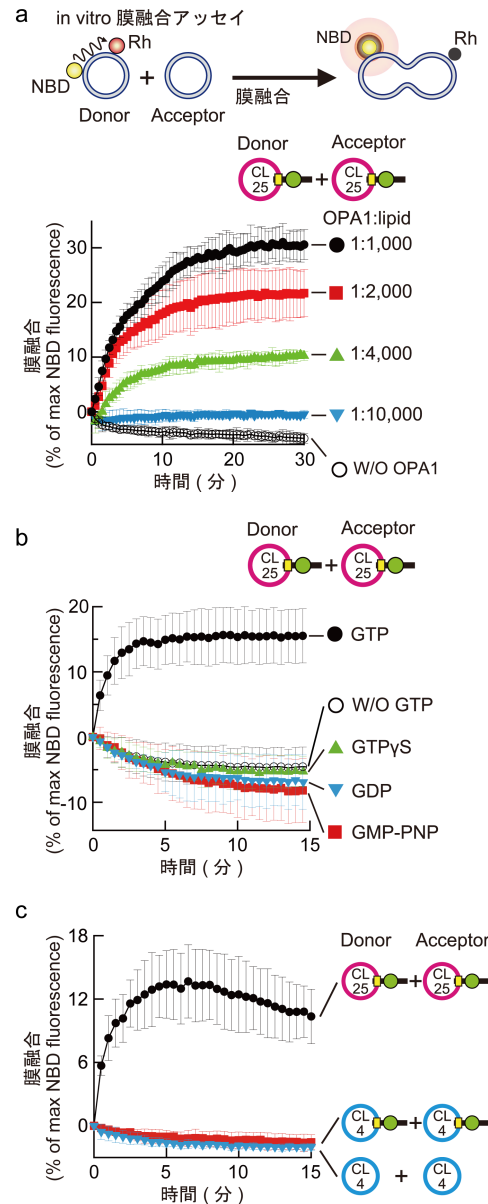


図.2: L-OPA1 プロテオリポソームによる in vitro 膜融合 (a,b) L-OPA1 の濃度と GTP 加水分解に依存して起こる膜融合 (c) ミトコンドリアに局在する脂質カルジオリピンが重要な役割を持つ

#### (3) ミトコンドリア内膜は独自の膜融合機構を持つ

様々な脂質組成を持つ L-OPA1 プロテオリポソーム、リポソーム間の融合反応を解析したところ、非常に興味深いことに、L-OPA1 プロテオリポソームと L-OPA1 を含まないリポソーム間でも膜融合が起こることが明らかになった (図.3a)。この反応は、L-OPA1 を含まないリポソームのカルジオリピンに依存したため、融合に於けるカルジオリピンの役割を in vitro 膜結合アッセイにより解析した。その結果、L-OPA1 プロテオリポソームとリポソーム間の結合にカルジオリピンが大きく寄与することが分かった (図.3b)。このことから、L-OPA1 は、融合する膜間でのオ

リゴマー形成ではなく、カルジオリピンとの結合により、融合する膜同士を繫留すること、繫留されたリポソームは、GTP加水分解に伴い融合することが明らかになった(図.3c)。小胞輸送のSNAREや、小胞体のAtlastinなどの既知の膜融合蛋白質では、膜同士の繫留に蛋白質間のオリゴマー形成が必要だと考えられている。それに対して、OPA1は蛋白質と脂質の結合が必須であることが分かり、ミトコンドリアの内膜融合は独自の融合機構を持つことが示唆された。

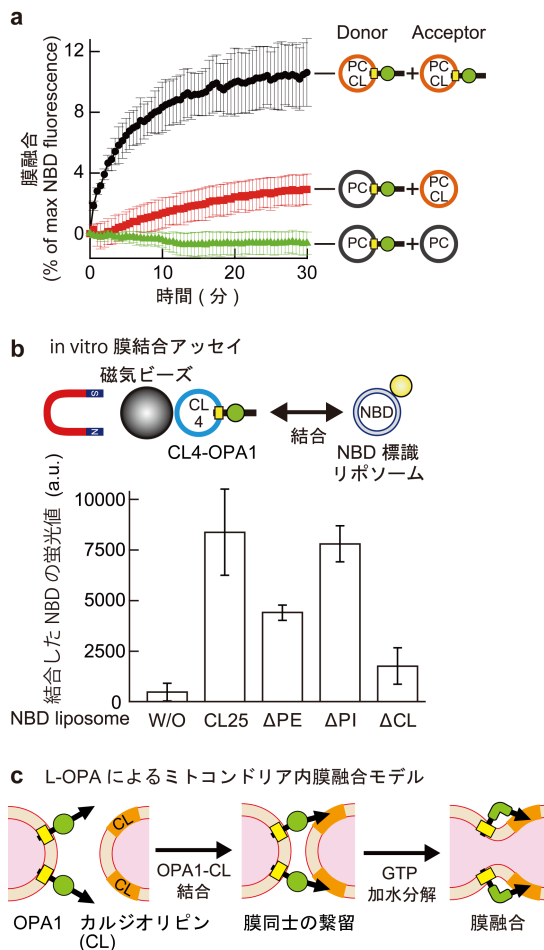


図.3：特徴的な L-OPA1 による膜融合

(a) 一方の膜に L-OPA1、もう片方にカルジオリピンが存在すれば融合が起こる (b) L-OPA1 とリポソームとの結合には、カルジオリピンが大きく寄与する (c) 研究から提唱された L-OPA1 によるミトコンドリア内膜融合モデル

#### (4) ミトコンドリア内膜融合に於ける S-OPA1 の役割

S-OPA1 存在下での in vitro 膜融合アッセイから、S-OPA1 は L-OPA1 による膜融合を促進することが分かった(図.4a)。一方、L-OPA1 と S-OPA1 の比率を変えて、測定したところ、S-OPA1 の比率が増加すると、融合活性が低下することが分かった(図.4b)。このことから、S-OPA1 は融合を促進するものの、ミトコンドリア内膜融合は、L-OPA1 主体で起こ

ることが示唆された。

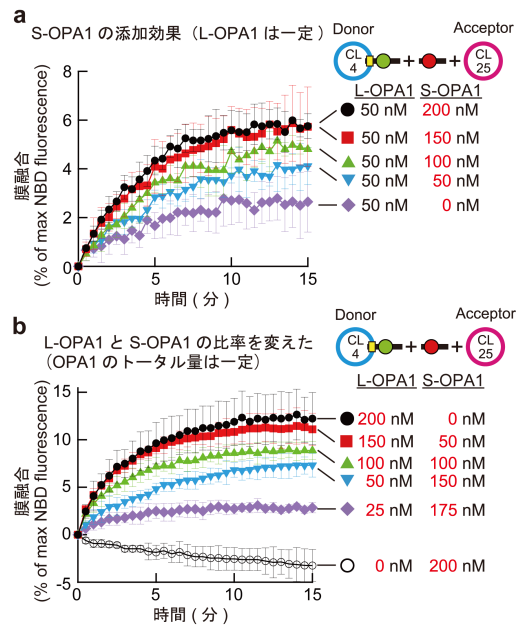


図.4：S-OPA1 の役割

(a) S-OPA1 による融合促進効果 (b) OPA1 のトータル量が一定の場合、S-OPA1 が増加すると融合活性が低下する

上記で示したとおり、これまで報告されていなかったリコンビナント L-OPA1 による in vitro アッセイによる解析から、分からないことが多かった OPA1 によるミトコンドリアの内膜融合機構を明らかにすることができた。本研究で用いたカイコ・バキュロウイルス発現によるリコンビナント蛋白質の大量発現・精製は、ミトコンドリア外膜融合を制御する GTPase : mitofusin にも応用できると考えられるので、内膜のみならず外膜融合の分子機構を詳細に解析することで、ミトコンドリア膜融合の全容理解につながることを期待できる。

#### <引用文献>

Ishihara et al., *Antioxid Redox Signal* 19, 389-399 (2013).  
 Frezza et al., *Cell*, 126, 177-189 (2006).  
 Ban et al., *Hum Mol Genet*, 19, 2113-2122 (2010).  
 Ishihara et al., *EMBO J.* 25, 2966-2977 (2006).  
 Song et al., *J. Cell Biol.* 178, 749-755 (2007)  
 Kajikawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 385, 375-379 (2009).

#### 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)

査読あり

Naotada Ishihara, Maki Maeda, Tadato Ban

and Katsuyoshi Mihara Cell-free mitochondrial fusion assay detected by specific protease reaction revealed  $Ca^{2+}$  as regular of mitofusin-dependent mitochondrial fusion *J. Biochem* in press. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvx029>

〔学会発表〕(計 8 件)

\_\_\_ 伴 匡人、石原 直忠 「リコンビナント OPA1L によるミトコンドリア内膜融合機構の解明」 第 15 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 25 日、ワークピア横浜、神奈川県横浜市

\_\_\_ 伴 匡人、石原 直忠 「OPA1 プロテオリポソームによるミトコンドリア内膜融合機構の解明」 第 87 回生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、京都国際会館、京都府京都市

\_\_\_ 伴 匡人、石原 直忠 「リコンビナント OPA1L によるミトコンドリア内膜融合機構の解明」 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014 年 12 月 3 日、九州大学百年講堂、福岡県福岡市

\_\_\_ 伴 匡人 「蛋白質の挙動解析-アミロイド線維からミトコンドリア膜融合まで-」 第 28 回九州分析化学若手の会 春の講演会、2015 年 5 月 16 日、九州大学筑紫キャンパス筑紫ホール、福岡県春日市

\_\_\_ 伴 匡人、石原 直忠 「ミトコンドリア内膜融合因子 OPA1 による膜融合に於けるカルジオリピンの効果」 第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 26 日、あわぎんホール、徳島県徳島市

\_\_\_ 伴 匡人、石原 直忠 「リコンビナント OPA1L によるミトコンドリア内膜融合機構の解明」 第 15 回日本ミトコンドリア学会年会、2015 年 11 月 19 日、福井県国際交流会館、福井県福井市

\_\_\_ 伴 匡人、石原 直忠 「ミトコンドリア内膜融合因子 L-OPA1 による膜融合に於ける S-OPA1 の効果」 第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 9 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

\_\_\_ 伴 匡人、石原 直忠 「OPA1 プロテオリポソームによるミトコンドリア内膜融合機構の解明」 第 89 回生化学会大会、2016 年 9 月 27 日、仙台国際センター、宮城県仙台市

〔図書〕(計 2 件)

\_\_\_ 伴 匡人、尾上 健太、石原 直忠  
ミトコンドリア形態変化の生理的意義  
医学のあゆみ 260, 18-23 (2017)

太田 あずさ、伴 匡人、石原 直忠  
ミトコンドリアのダイナミクスとその生理機能 脳研究 21 19, 11-16 (2016)

〔産業財産権〕

該当なし

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伴 匡人 (Tadato Ban)

久留米大学・分子生命科学研究所・講師

研究者番号：00579667

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

石原 直忠 (Naotada Ishihara)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号：10325516