

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18230

研究課題名(和文)再構成系により明らかにする膜間リン脂質輸送分子メカニズム

研究課題名(英文)Reconstitution approach to the molecular mechanisms of ERMES

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ERMES複合体の4つの主要構成因子のうち、Mmm1の可溶性ドメイン、Mdm12に関しては、すでに研究代表者が再構成系を確立し、報告済みである。そこで、残りの主要因子であるMdm10、Mdm34(Mmm2)の精製系および再構成系の確立を試みた。Mdm10は、種々の条件検討の結果、大腸菌で封入体として発現し、その後グアニジン塩酸や尿素などで変性後、イオン性界面活性剤存在下で巻き戻すことが可能であることを明らかにした。残念ながらMdm34については精製系を構築できなかったものの、Mmm1にFis1を融合することで、全ERMES構成因子の機能を代替できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではERMES構成因子4つをすべて精製し、再構成実験を行うことを試みた。その結果、残念ながらMdm34について発現、精製系を確立することはできなかったものの、Mdm10については巻き戻しを行うことで大量精製系の確立に成功した。今後Mdm34の発現、精製系が確立すれば、すぐにも再構成実験を進めることが可能である。また、Mmm1とFis1の融合タンパク質がERMES構成因子のすべての欠損を相補できるという遺伝的解析により、ヒトを始めとする高等真核生物ではまだ未確認の、ERMES相当因子、複合体を探索する上で、重要なヒントとなることが強く期待される。

研究成果の概要(英文)：ERMES predominantly consists of 4 proteins (Mmm1, Mdm10, Mdm12, and Mdm34) and we have already reported the reconstitution assay using Mmm1 soluble domain and Mdm12. Here, we tried the preparation and reconstitution of Mdm10 and Mdm34 for the complete understandings of the ERMES complex. Mdm10 is found to be reformed from inclusion body fraction in Mdm10 overexpressing *E. coli* cell. The inclusion body was washed, solubilized with Gdn-HCl and urea, and then regenerated in an ionic detergent. Mdm34, unfortunately, was failed to establish the purification system. However, genetic approach in which C-anchored protein in the mitochondrial outer membrane, i. e., Fis1 was fused to the C-terminus of Mmm1, indicated that the fusion protein can compensate for the deletion of 4 ERMES proteins in vivo. The architecture of Mmm1-Fis1 fusion protein will give a cornerstone for exploring the equivalent protein/complex in higher eukaryote such as a human.

研究分野：構造生物学

キーワード：リン脂質輸送 再構成 コンタクトサイト 出芽酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物において、オルガネラは互いにネットワークを形成し、物質や情報のやり取りを行っている。およそ 10 年前の細胞生物学において、オルガネラのネットワークは非接触型、つまり物質の自由拡散や、小胞輸送に限られると考えられていたが、近年その様相は大きく様変わりした。すなわち、出芽酵母において発見された ERMES (ER-mitochondria encounter structure) が、接触型ネットワークの実態であるコンタクトサイトであることが示された。ERMES の存在により、コンタクトサイトが蛍光顕微鏡などで観察されるのみの概念的なものではなく、細胞内に実在する構造体であるということが示された。そしてその後の生化学、細胞生物学的解析により、コンタクトサイトの重要な役割として、リン脂質などの可溶性の低い物質を膜間で直接やり取りできる場を提供するということが明らかになった。しかしながら、ERMES が膜間で輸送するリン脂質の特異性など、生体内における重要な役割を説明する事実についての情報は、ほとんど得られていなかった。その理由の一つとして、ERMES が膜タンパク質を含む複数のタンパク質で構成されており、すべてのタンパク質を含む複合体として解析することが難しいためであった。構成タンパク質の個別の役割について、遺伝学的、生化学的および細胞生物学的解析それぞれからの情報が錯綜しており、解析結果の解釈が複雑化していたためでもある。このような背景から、本研究開始当初において、ERMES 全体の精製もしくは再構成による完全な ERMES の分子基盤の解明が強く望まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母由来 ERMES について、このコア構成因子である 4 つのタンパク質 (Mmm1, Mdm10, Mdm12, Mdm34) を再構成することで、生体内で機能するコンタクトサイトとしての ERMES の実態を、生化学的に明らかにすることを目的とした。また、Mmm1 の variant を利用して ERMES の最小単位および最小機能の探索を、遺伝学的に明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、ミトコンドリア外膜タンパク質である Mdm10 の再構成を試みた。Mdm10 は バレル型膜タンパク質タンパク質であり、ポリリタンパク質と類似の構造を持っていると考えられていた。そこで、原核生物のポリリタンパク質が局在する大腸菌外膜へ輸送されるように、特異的なシグナル配列を付加した発現系を利用した。一方、原核生物と真核生物のポリリタンパク質は、ともに バレル型膜タンパク質であるが、バレルを構成するストランドの数が異なっており、同様の経路で生合成されない可能性が高いと考えたため、別の調製方法も試みた。すなわち、真核生物のポリリタンパク質で数例報告がされている、封入体からの巻き戻し系の確立も試みた。封入体とは、大腸菌が外来遺伝子タンパク質を、不溶性タンパク質として大量に生合成することが可能な形態であり、適切な条件において天然型タンパク質と同様の構造、機能を獲得できると知られている。ただし、その条件はタンパク質によって異なっており、既報の手法が必ずしも成功するわけではなく、条件検討を行う必要がある。本研究では、バレル型膜タンパク質である Mdm10 の巻き戻しについて、可溶化のための変性剤や、界面活性剤の条件検討を行った。

次に、Mdm34 についての発現系の構築を試みた。Mdm34 は、SMP ドメインと呼ばれる可溶性の脂質結合性ドメインを持つことが知られている。SMP ドメイン以外のドメインは巨大 (~300 アミノ酸) で機能不明であるため、アプローチが難しいと考えた。そこで、可溶性タンパク質であり、機能の中心であると推定される、SMP ドメインを中心に発現領域や種の異なる Mdm34 のバリエーションを、他の ERMES 構成因子である Mmm1 や Mdm12 と共発現させることで大腸菌細胞内での複合体形成を試みた。

また、生化学的な再構成実験と並行して ERMES の遺伝学的アプローチを行った際に、Mmm1 に C 末端をミトコンドリア外膜に結合させるタンパク質である Fis1 を融合すると、ERMES の機能を完全に代替できることが分かった。Mmm1 は ERMES 複合体の構成因子の一つではあるが、Mmm1 単独では ERMES の機能を代替できないことはすでに明らかになっている。しかしながら、Mmm1 自身が持つ N 末端の小胞体膜貫通領域と、融合した Fis1 が持つ C 末端の持つミトコンドリア外膜貫通領域という、2 つの別々のオルガネラに局在することが可能な機能領域を持つことで、他の 3 つの構成因子の機能を完全に相補できる。この事実は、ERMES が二枚のオルガネラ膜を同時に結合させること、Mmm1 が持つ SMP ドメインが機能すれば必要充分であることを示している。さらに、Mmm1 の機能ドメインである SMP ドメインの構造はすでに明らかになっており、脂質輸送に重要な役割を担っているアミノ酸残基も同定されている。Mmm1-Fis1 融合タンパク質は、ERMES の機能を単純化していると考えられる上に、単一の SMP ドメインのみが機能に十分であることを示しているため、これまで難しかった構成因子間の影響を排除した ERMES の機能解析を進めることができる。特に SMP ドメインへの変異導入に伴う ERMES の機能、すなわちリン脂質の輸送への影響を調べることで、Mmm1-Fis1 融合タンパク質と、ERMES の遺伝学的、生化学的相違点を調べることで、ERMES の実像に関する知見を得ることを試みた。

### 4. 研究成果

Mdm10 は、シグナルを付加した発現系を構築し、発現量、発現したタンパク質のフォールディングについて検証を行ったが、大腸菌外膜に正しく折りたたまれたタンパク質を発現することはできなかった。一方で、もう一つのアプローチとして考えた封入体を利用する方法は良好な結果を与えた。つまり、大腸菌内で大量発現後、封入体のみを回収し、変性剤による可溶化を確認後イオン性界面活性剤存在下での巻き戻しを試みたところ、ミセル中に折りたたまれたタンパク質として得ることができた。一連の解析により十分なタンパク質量が得られる系を構築できたため、現在、リン脂質膜と類似の環境であると考えられるナノディスクへの導入を試みている。

Mdm34 は、一次構造および立体構造予測に基づき様々な発現系を構築したが、Mmm1 や Mdm12 と複合体を形成するタンパク質は得られなかった。残念ながら 4 つのコア構成因子を用いた再構成系は構築できなかった。

一方で、Mmm1-Fis1 融合タンパク質を用いた解析では、興味深い事実を明らかにできた。Mmm1-Fis1 を発現する酵母は、再構成を試みた 4 つのコア構成因子すべてを失っても正常に生育できることが初めて示された。これは一遺伝子により小胞体とミトコンドリア間のコンタクトサイトが形成される優れたモデルであることを示している。さらに Mmm1 の SMP ドメインへの変異導入により、酵母の生育遅延が示されたことから、やはり ERMES の機能において SMP ドメインのリン脂質輸送能が必須であることが明らかになった。また、Mmm1 の SMP ドメインの機能は、他の ERMES 構成因子の SMP ドメインでは代替できないことから、Mmm1 の SMP ドメインは ERMES の中心的な機能を担っている可能性が高い。今後の研究の展望として、Mmm1-Fis1 融合タンパク質は構成因子間の相互作用など考慮せずに ERMES の機能解析を進められると同時に、まだ ERMES に相当する因子が見つかっていない、ヒトなどの高等真核生物における counter part を探索する際の有力なクライテリアを提供することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shin Kawano and Toshiya Endo
2. 発表標題 Partial reconstitution analyses indicate the phospholipids transfer functions of the ERMES complex between membranes
3. 学会等名 Keystone Symposia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野慎、遠藤斗志也
2. 発表標題 ERMES 複合体によるリン脂質輸送
3. 学会等名 蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018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