

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21413

研究課題名(和文)ミトコンドリア内膜のクリステ構造を形成する分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular basis for the formation of the mitochondrial crista structure

研究代表者

田村 康(Tamura, Yasushi)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：50631876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアクリステ形成因子としてわれわれが見出した酵母Mgm1, Mdm35, MICOSのヒトオルソログ(OPA1, PRELID1-TRIAP1, MICOS)のシングル, ダブルKO細胞を構築し, ミトコンドリアやクリステの蛍光顕微鏡や電子顕微鏡により解析した。その結果, OPA1-KO細胞では先行研究と同様に層状クリステが減少することを確認した。またOPA1とMic60を同時にノックアウトした細胞では, クリステが殆ど見られなくなる細胞が増加した。今後これらの細胞に, 欠損させた遺伝子を戻し, クリステが再形成される過程を観察することで, クリステ形成機構の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアのクリステ膜は, ミトコンドリアのATP生産の効率化に必須の構造である。このクリステ膜構造が見つかったから長い年月が経っているが, このような特徴的な膜構造が形成されるメカニズムはほとんどわかっていない。今回, わたしたちが出芽酵母を用いた研究によって独自に発見したミトコンドリアクリステ形成因子を, ヒトの細胞を用いて解析し, 出芽酵母で得られた知見を確認することができた。今後さらに研究をすすめることで, クリステ膜形成の謎が明らかにできれば, ミトコンドリアの機能が低下した疾患の治療法戦略などに貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanisms of mitochondrial cristae membrane formation, we focused on the human orthologs of yeast Mgm1, Mdm35, and MICOS (OPA1, PRELID1-TRIAP1, and MICOS), which were found to be factors in the formation of yeast Mgm1, Mdm35, and MICOS. Specifically, we constructed single and double KO cells of these factors, and analyzed mitochondria and cristae structures by fluorescence and electron microscopy. The results showed that laminar cristae was decreased in OPA1-KO cells as reported in previous studies. Furthermore, we noticed that crista structures were almost completely absent in OPA1-Mic60 double knockout cells. We will elucidate the crista formation mechanism by re-expressing the deleted genes to these cells and observing the process of crista remodeling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア クリステ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアでは外膜(MOM)と内膜(MIM)の2つの異なる脂質二重膜から構成されるオルガネラであり、内膜は外膜と平行に隣接した領域 (IBM: Inner Boundary Membrane) と内側に貫入したクリステ膜と呼ばれる領域の2つに分類できる。クリステ膜とIBMが物理的に結合する領域をクリステジャンクション (CJs) と呼び、CJs 特異的に局在する Mic60, Mic10・Mic12, Mic19, Mic25, Mic26, Mic27 からなる MICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system) と呼ばれる巨大なヘテロオリゴマー複合体によって形成されることが知られている。MICOS 複合体を構成するサブユニットのうち、Mic10 と Mic60 は CJs の形成に必須であり、その他の MICOS 構成因子も欠損により CJs が減少するかクリステ形態が変化する。クリステ膜の形態には層状のものとチューブ状のものが確認されており、生物種や細胞種によってミトコンドリアで確認されるクリステ形態の量比が異なることがわかっている。ATP 合成において、チューブ状クリステよりも層状クリステの方が優位に働くことが予想されている。一方、チューブ状クリステに独自の役割があるのかについて詳しいことはわかっていない。ミトコンドリア内膜のクリステ構造はミトコンドリアの機能と密接に関連し、クリステ形成に異常が生じることで、心筋症、神経変性疾患、代謝性疾患、ガンといった疾患の引き金になることが報告されている。このように、生理的に重要であるクリステ構造だが、発見から70年近くが経過した現在においても、どのような分子メカニズムで形成されるのかは謎に包まれていた。

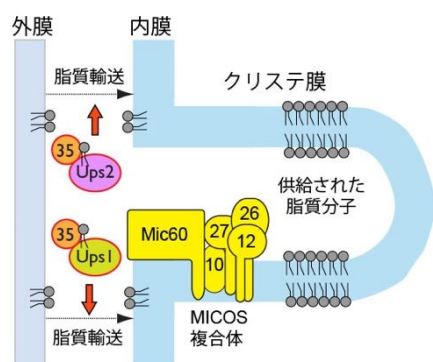


図1: リン脂質輸送と MICOS 複合体がクリステ膜形成を促進する。

代償性疾患、ガンといった疾患の引き金になることが報告されている。このように、生理的に重要であるクリステ構造だが、発見から70年近くが経過した現在においても、どのような分子メカニズムで形成されるのかは謎に包まれていた。

このような状況の中、出芽酵母を用いた研究により、層状のクリステとチューブ状のクリステを形成する2つ異なる経路: ①ミトコンドリアの内膜融合による層状クリステの形成と、②MICOS 複合体とMIMからMIMへのリン脂質輸送に依存するチューブ状クリステの形成である(図1)。MOMからMIMへリン脂質を輸送する因子は Ups1, Ups2-Mdm35 複合体であり、Mdm35 が欠損した株では Ups1 と Ups2 の両方が脂質輸送活性を示さなくなる。層状クリステが形成されない Mgm1 欠損時に Mdm35 または MICOS 複合体を同時に欠損すると、クリステ構造が完全に消失したミトコンドリアが現れることから、チューブ状クリステの形成には MICOS 複合体とミトコンドリア膜間のリン脂質輸送の両方が重要であると考えられた。

一方、ヒト培養細胞を用いた研究では酵母とは異なる結果も得られている。Mgm1 のヒトオルソログである OPA1 を欠損した細胞において野生型と比較して層状クリステが減少したものの消失はしなかった。この結果から、ヒト細胞では酵母とは異なる独自の層状クリステ形成経路が存在する可能性が示された。このようにヒト細胞のクリステ形成メカニズムに関しては未開拓の分野であり、不明な点が多い。

一方、ヒト培養細胞を用いた研究では酵母とは異なる結果も得られている。Mgm1 のヒトオルソログである OPA1 を欠損した細胞において野生型と比較して層状クリステが減少したものの消失はしなかった。この結果から、ヒト細胞では酵母とは異なる独自の層状クリステ形成経路が存在する可能性が示された。このようにヒト細胞のクリステ形成メカニズムに関しては未開拓の分野であり、不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究ではヒト細胞のクリステ形成メカニズムの解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

出芽酵母細胞を用いた研究によって見いだされていた、クリステ膜を消失する遺伝子欠損変異を、ヒトのオルソログ遺伝子に対して同様に導入する。具体的には HeLa 細胞に対し、CRISPR/Cas9 システムを用いて、遺伝子ノックアウト変異を導入し、ヒト培養細胞においても遺伝子欠損によりクリステ膜が消失し

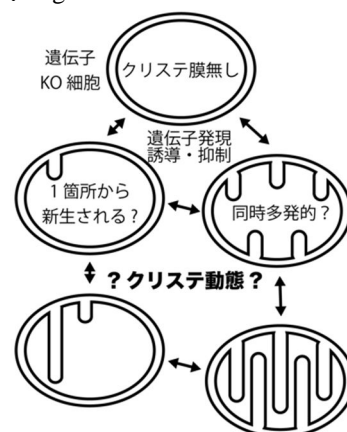


図2: クリステ膜の新生モデル

た状態を作り出せるのかを検討する(図 2)。このようなクリステロスの表現系が得られた場合は、その状態から欠損していた遺伝子の発現を回復させ、クリステが形成していく様子を時間依存的に観察し、クリステ形成メカニズムの解明につなげる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子ノックアウト細胞株の作製

まずは、酵母 Mgm1, Mic60 (MICOS 複合体構成因子), Mdm35 に対応するヒトの遺伝子, OPA1, MIC60, TRIAP のシングルノックアウト細胞の構築を行った。これらの遺伝子を認識する sgRNA

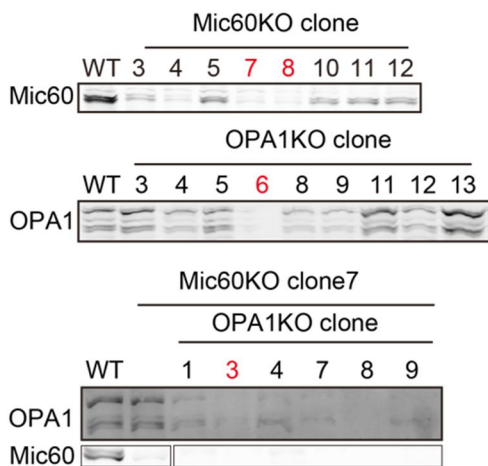


図 3 遺伝子 KO 細胞の作製

と Cas9 を発現するレンチウイルスを HeLa 細胞に感染させ、puromycin 耐性となった細胞をセレクションした。その後、シングルコロニーを複数単離し、それぞれのタンパク質を認識する抗体を用いたウェスタンブロットティングによって、遺伝子産物が検出されなくなることを確認した(図 3)。TRIAP に関してはウェスタンブロットティングに適した抗体が得られなかったため、パートナータンパク質である PRELI の発現量が減る細胞をまずセレクションし、その後、TRIAP 遺伝子のシーケンスを確認することで、遺伝子の KO を確認した。さらに Mic60-KO 細胞に対して OPA1-KO のためのレンチウイルスを感染させ、Mic60/OPA1 二重欠損細胞を構築した。

##### (2) 遺伝子ノックアウト細胞株のミトコンドリア形態の確認

次に、作製した OPA1-KO, Mic60-KO に OPA1, Mic60, TRIAP, PRELI に対する siRNA を導入し、これらの遺伝子を同時に抑制した際にミトコンドリア形態にどのような変化が生じるかを観察した。その結果、OPA-KO のミトコンドリアは報告通り断片化した一方で、Mic60-KO や PRELI-KO のミトコンドリアは伸長していた。Mic60-KO や PRELI-KO 細胞株に、Mic60, OPA1, TRIAP, PRELI に対する siRNA を導入すると、ミトコンドリア形態が大きく変化し、断片化することがわかった(図)。この結果から、出芽酵母だけでなく、ヒトにおいても Mic60 欠損時には PRELI や TRIAP によるリン脂質輸送がミトコンドリアの形態維持に重要であることが示唆された。

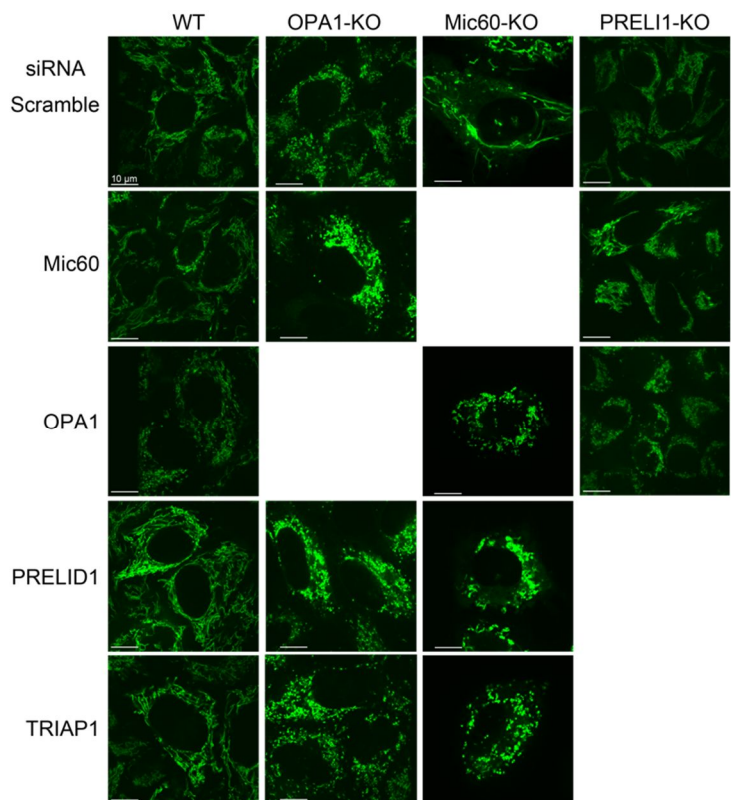


図 4 遺伝子欠損株のミトコンドリア形態



(3) 遺伝子ノックアウト細胞株のミトコンドリアクリステ形態の確認

最後に、作製した OPA1-KO, Mic60-KO, OPA1/Mic60-KO 細胞のミトコンドリアクリステ形態を透過型電子顕微鏡解析により観察した。WT のほぼすべてのミトコンドリア画像にクリステ膜が存在するのに対し、OPA1-KO 細胞では先行研究による報告通り、層状クリステを持つミトコンドリアが野生型に比べ 6 割程度減少した。一方、OPA1 と Mic60 を同時に KO した OPA1/Mic60-KO 細胞では、層状クリステが著しく減少し、クリステが存在しない細胞の割合が 25% 程度まで増加した(図 5)。これらの結果から、出芽酵母と同様に、ヒト細胞でも OPA1 によるミトコンドリア内膜融合を介して層状クリステがある程度形成されていることが示唆された。

現在、これらの細胞株にドキシサイクリンで Mic60, Opa1 を発現させる株を作製中である。今後、クリステ膜が著しく減少した状態から、クリステ膜形成を回復させることができるのか、またその様子を、STED 顕微鏡を用いてライブセルイメージング可能であるか等検証していく。クリステ構造が新たに形成される瞬間をライブセルイメージングで観察した例はまだない。今後、クリステ膜形成の瞬間を捉えることができれば、クリステ形成メカニズム解明の大きな一歩になるはずである。

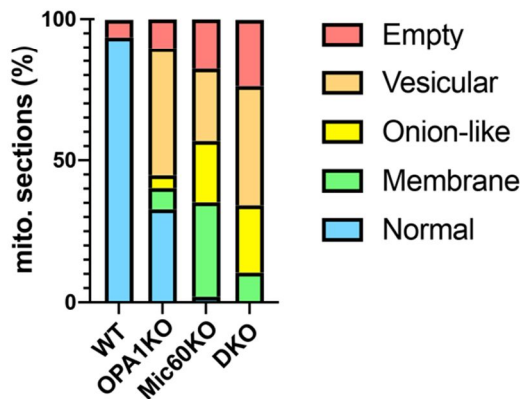
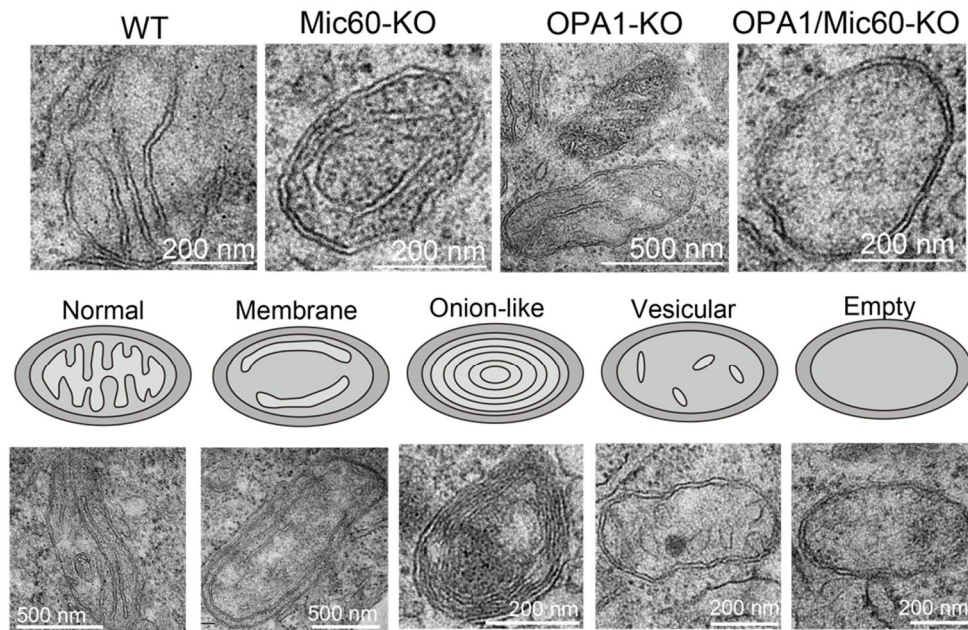


図 5 ミトコンドリア  
クリステ構造の観察と定量

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasushi Tamura, Shin Kawano, Toshiya Endo	4. 巻 401
2. 論文標題 Lipid homeostasis in mitochondria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological chemistry	6. 最初と最後の頁 821-833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/hsz-2020-0121	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 Michiko Shirane, Mariko Wada, Keiko Morita, Nahoki Hayashi, Reina Kunimatsu, Yuki Matsumoto, Fumiko Matsuzaki, Hirokazu Nakatsumi, Keisuke Ohta, Yasushi Tamura, Keiichi I Nakayama	4. 巻 11
2. 論文標題 Protrudin and PDZD8 contribute to neuronal integrity by promoting lipid extraction required for endosome maturation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 4576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18413-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomonori Tamura, Alma Fujisawa, Masaki Tsuchiya, Yuying Shen, Kohjiro Nagao, Shin Kawano, Yasushi Tamura, Toshiya Endo, Masato Umeda, Itaru Hamachi	4. 巻 16
2. 論文標題 Organelle membrane-specific chemical labeling and dynamic imaging in living cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature chemical biology	6. 最初と最後の頁 1361-1367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-020-00651-z	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 Hiroya Shiino, Shiina Furuta, Rieko Kojima, Keisuke Kimura, Toshiya Endo, Yasushi Tamura	4. 巻 -
2. 論文標題 Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted Escherichia coli phosphatidylserine synthase PssA.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15657	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tashiro S., Kakimoto Y., Shinmyo M., Fujimoto S. and Tamura Y.*	4. 巻 8
2. 論文標題 Improved Split-GFP Systems for Visualizing Organelle Contact Sites in Yeast and Human Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 571388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.571388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田村康
2. 発表標題 オルガネラ間リン脂質輸送制御を介したERストレス応答
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 ミトコンドリア-小胞体間におけるリン脂質合成酵素及び輸送因子阻害剤の探索
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村啓介, 河合文啓, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 Firmicutes bacterium 由来のCDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明
3. 学会等名 第28回山形分子生物学セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎野浩也, 工藤真之祐, 古田詩唯奈, 田村康
2. 発表標題 酵母形質転換ストレスとPah1の欠損はIN04遺伝子へのTy1レトロトランスポゾン挿入を引き起こす
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 ミトコンドリア・小胞体間におけるリン脂質合成輸送阻害剤の単離
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿元百合子, 小島理恵子, 新名真夏, 黒川量雄, 中野明彦, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 トコンドリア-小胞体間結合因子ERMES複合体クラスターの解離がERストレス軽減に寄与する
3. 学会等名 第72回細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎淳平, 田代晋也, 新田莉彩子, 尾野雅哉, 吉丸哲郎, 片桐豊雅, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 Split-APEX2-GFP を用いたヒトミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイト局在タンパク質の同定
3. 学会等名 第72回細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村啓介, 河合文啓, 平田邦生, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 Firmicutes bacterium由来のCDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康
2. 発表標題 ミトコンドリア-小胞体間リン脂質輸送阻害剤の単離
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関