

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06054

研究課題名（和文）膜融合のin vitro再構成によるミトコンドリア外膜融合機構の解明

研究課題名（英文）Elucidating the molecular mechanism of mitochondrial outer membrane fusion using
In vitro reconstruction of membrane fusion

研究代表者

伴 匡人（Ban, Tadato）

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

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、エネルギーや生体分子の代謝、細胞死の制御など多彩な機能を持つ細胞内小器官である。ミトコンドリア間の融合・分裂は、ミトコンドリアの機能発現と密接に結びついている。本研究では、精製タンパク質と人工脂質二重膜小胞を用いた解析から、ミトコンドリア膜融合の駆動力を明らかにし、分子メカニズムの理解を深めることを目的とした。期間内の研究から、ミトコンドリア膜融合を制御するGTP加水分解タンパク質Mfn2が、タンパク質として単独で膜融合活性を持ち、GTP加水分解がその駆動力になることを明らかにした。さらにミトコンドリアに局在する脂質カルジオリピンが、膜融合に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ミトコンドリアの機能発現の根幹の1つであるミトコンドリア膜融合の分子メカニズムの解明を目的としたものである。今回の研究から、膜融合におけるGTP加水分解タンパク質Mfn2の駆動メカニズム、脂質組成の寄与を明らかにすることができた。ミトコンドリア膜の融合・分裂によるミトコンドリアの動的制御は、エネルギー代謝、細胞死、自然免疫の制御などに関連する。さらに動的制御の破綻が、神経変性疾患、がん、糖尿病などに観察される。本研究から得られた結果は、ミトコンドリアの生理機能、病気の発症機構の理解につながり、広く社会に還元できるものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondria are essential organelles for ATP production, phospholipid metabolism, and apoptosis. In mammalian cells, mitochondria continuously move and undergo frequent fusion and fission. Mitochondrial fusion and fission are closely related to mitochondrial functions. In this study, we focused on the driving force of mitochondrial outer membrane fusion. To better understand how the mitochondrial fusion GTPase Mfn2 mediates membrane fusion, we developed assays to analyze the membrane fusion reaction using recombinant proteins and liposomes. We examined the biophysical properties of Mfn2 and found that Mfn2 has a membrane fusion-prone activity that is dependent on GTP hydrolysis. We also found that the mitochondria-localized lipid CL is essential for Mfn2-mediated membrane fusion.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：ミトコンドリア 膜融合 GTPase 再構成 バキュロウイルス発現 カイコ GTP カルジオリピン

様式 C-19、F-19-1 (共通)

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を持ち、細胞内エネルギー代謝やアポトーシスの制御を担う細胞内小器官（オルガネラ）である。近年、ミトコンドリアは融合・分裂を繰り返しながら、細胞内を移動するダイナミックなオルガネラであることが周知されつつある（図.1）。融合・分裂は、ダイナミンスーパーファミリーに属するGTP加水分解タンパク質（GTPase）により、制御されている。外膜融合は外膜に局在するmitofusin (Mfn)、内膜融合は内膜に局在するOPA1に制御され、分裂は細胞質に存在するDrp1により制御されている。これらのGTPaseの解析からミトコンドリアの形態は、融合・分裂のバランスにより制御されていることが明らかにされた。またGTPase群の遺伝子欠損マウスを用いた解析から、これらのGTPaseが初期発生や組織形成に関与することが分かり、融合・分裂は形態だけではなく、機能制御に必須の生命現象であることが示された。近年、ミトコンドリアの融合・分裂による膜動態システムの不全が、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患や、がん、糖尿病の発症に深く関連し、ミトコンドリアに着目した予防・治療法が注目されている（Mishra et al., Nat Rev Mol Rev 2014）。このような背景のもと、国内外の研究室で、遺伝学、分子生物学、構造生物学などを駆使した解析から、融合・分裂の分子メカニズムの解明を目指した研究が行われているが、融合・分裂に関わるGTPaseが、どのように駆動するのか？その分子メカニズムは十分に理解されておらず、解決すべき課題として残されている。

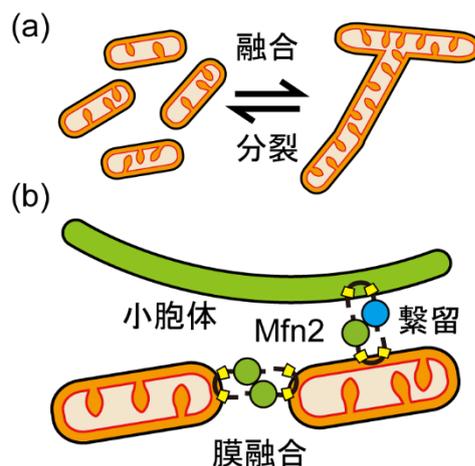


図.1: ミトコンドリア膜ダイナミクス

(a) 融合・分裂による形態制御

(b) 外膜融合 GTPase Mfn2

ミトコンドリアと小胞体に局在する

2. 研究の目的

Mfnはダイナミンスーパーファミリーに属するGTPaseであることから、GTP加水分解および脂質膜組成が、膜融合に大きく寄与すると考えられるが、全長の精製Mfnを用いた研究が報告されておらず、Mfnがどのように膜融合を駆動するのか？その分子メカニズムは十分に理解されていなかった。研究代表者は、これまでに内膜融合GTPase OPA1の精製タンパク質を用いた膜融合のin vitro再構成アッセイにより、OPA1と脂質カルジオリピンとの直接相互作用が、膜融合の駆動力として機能することを見出している(Ban et al., Nat Cell Biol 2017)。本研究では、研究代表者がこれまでに取り組んできた膜融合のin vitro再構成アッセイによる詳細解析を更に発展させ、「Mfnの膜融合の駆動力」を明らかにすることで、ミトコンドリア外膜融合の分子メカニズムの解明を目的とした。本研究では以下の研究計画から、目的の達成を目指した。

(1) Mfnによる膜融合反応の駆動力の解析

Mfnによる膜融合のin vitro膜融合アッセイを行い、駆動力の基盤を明らかにする

(2) 脂質膜組成のMfnによる膜融合反応への寄与

膜融合の重要な因子である脂質の寄与を明らかにする

3. 研究の方法

(1) Mfnによる膜融合反応の駆動力の解析

① 精製Mfn2の調製

膜融合は、融合する膜の繫留、融合を経て進むことから、各過程を解析できるin vitro再構成アッセイが、膜融合の分子メカニズムの解析に広く使われている。膜融合のin vitro再構成アッセイは、高度に精製した融合タンパク質を、モデル生体膜である人工脂質二重膜小胞（リポソーム）に挿入し、膜融合反応を直接解析する手法である。研究代表者は、これまでにカイコの幼虫とバキュロウイルス発現を用いたOPA1の大量発現・精製法を構築しており(Ban et al., Methods in Mol Biol 2021)を、これを基にMfnの調製を行った。Mfnには2つのホモログMfn1とMfn2が存在するが、本研究ではMfn2を用いた解析を行った。大腸菌BmDH10bacを用いて、Mfn2のcDNAを含む組換えバクミドDNAを調製した。バクミドDNAとDNA導入試薬DMRIE-Cを混

合し、カイコ 5 齢幼虫に接種し、Mfn2 の発現を誘導した。接種 6 日後に、カイコから Mfn2 を発現した脂肪体を単離し、ホモジナイザーおよび低速遠心処理により、粗分離分画を得た。粗分離分画を超音波処理で破碎し、高速遠心処理により、Mfn2 を含む分画を得た。この分画を界面活性剤で可溶化し、さらに高速遠心処理により、可溶化された Mfn2 を得た。Mfn2 には精製のために His-tag を付加しており、Ni-アフィニティクロマトグラフィーにより、Mfn2 の精製を行った。

② Mfn2 を含むリポソームの調製

ミトコンドリア外膜をモデルとした OM リポソームを調製した(Ban et al., Nat Cell Biol 2017)。ガラスチューブ内で各脂質を混合し、窒素ガス・真空乾燥により lipid フィルムを形成した。界面活性剤を含む緩衝溶液中で lipid フィルムを懸濁し、脂質溶液を得た。界面活性剤存在化で、脂質溶液と Mfn2 を混合し、透析により界面活性剤を除くことで、Mfn2 を含むリポソームを得た。Mfn2 を含むリポソーム間の膜融合反応は、広く用いられている蛍光色素間の FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を使った lipid mixing アッセイにより解析を行った(Weber et al., Cell 1998)。lipid mixing アッセイには、蛍光色素で標識された NBD-PE と Rho-PE を含む Donor リポソームと、蛍光色素を含まない acceptor リポソームを用いた。

(2) 脂質膜組成の Mfn による膜融合反応への寄与

これまでの研究代表者の研究から、膜融合反応はタンパク質濃度以外にも、脂質組成に大きく影響を受けることが分かっている。そこで OM リポソームから、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、カルジオリピン (CL) の除いたリポソームを調製し、膜融合への各脂質の寄与を解析した。Mfn2 は小胞体とミトコンドリアの接触部位に存在し、融合ではなく両者の結合を担うことが報告されている (de Brito et al., Nature 2008) (図.1)。小胞体膜の脂質組成が、膜融合反応に与える影響を解析するために、小胞体をモデルとした ER リポソームを OM リポソームと同様に調製した。

4. 研究の結果

(1) Mfn による膜融合反応の駆動力の解析

本研究では、まずカイコの飼育法や精製の最適化を行い、発現量の安定化、収量の増加を目指した。その結果、これまで発現量の低下が見られた 11 月から 4 月の間でも、膜融合アッセイを行うに十分な Mfn2 を得ることができるようになった。Mfn2 を含まない OM リポソームに、GTP/MgCl₂ を加えても、NBD 蛍光の増加は観察されないが、Mfn2 を含む OM リポソームでは NBD 蛍光の増加が観察された。NBD 蛍光の増加は、Mfn2 の濃度に依存しており、Mfn2 が多く含まれる OM リポソームでは NBD 蛍光の増加速度および、最大蛍光値の上昇が観察された。さらに、GDP や GTP 非加水分解アナログを加えても、NBD 蛍光の増加が観察されないことから、Mfn2 はタンパク質として単独で膜融合を駆動し、その駆動力は GTP 加水分解に依存することが明らかになった。これまでの研究代表者の研究から、融合する膜の片側にのみ OPA1 が含まれており、もう一方の膜に OPA1 が含まれていない場合でも、有意な膜融合反応が観察されることから、ミトコンドリア内膜は独自の一方方向性の膜融合を示すことが分かっている(Ban et al., Nat Cell Biol 2017)。一方、Mfn2 の場合は、両側の膜に Mfn2 が含まれていない場合、有意な NBD 蛍光の増加が観察されなかった。この結果から、融合する両側の膜に Mfn2 が存在する場合に膜融合が駆動されることが分かった (図.2)。

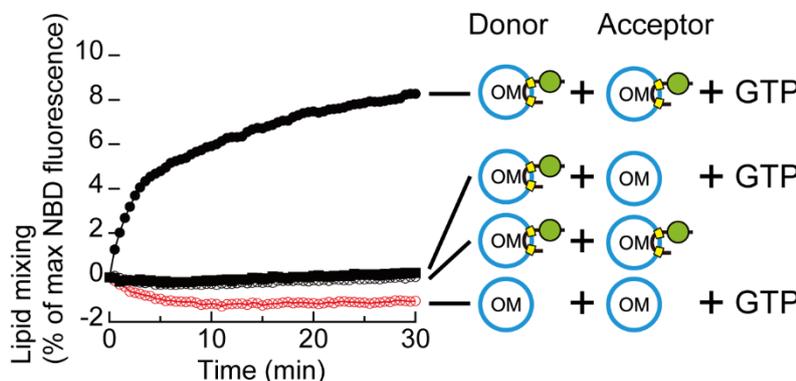


図.2: Mfn2 による膜融合
融合する両側の膜に、Mfn2 が必要

(2) 脂質膜組成の Mfn による膜融合反応への寄与

PE 及び PI の除いた OM リポソームでは、OM リポソームと比較すると、NBD 蛍光の減少が

観察された。またミトコンドリアに局在する CL を除いた OM リポソームでは、NBD 蛍光の著しい減少が観察されたことから、Mfn2 による膜融合は、脂質膜の組成に大きく影響を受けることが分かった。続いて、ER リポソームに Mfn2 を挿入したところ、NBD 蛍光の著しい減少が観察された (図.3)。また Mfn2 を含む OM リポソームと、Mfn2 を含む ER リポソームの間では、NBD 蛍光の著しい減少が観察された。これらの結果から、Mfn2 はミトコンドリア外膜型の脂質膜間の融合を駆動することが示された。CL の膜融合への寄与を調べるために、ER リポソームのホスファチジルセリンを CL に置換された ER-CL リポソームを調製し、Mfn2 を組み込んだところ、OM リポソームに組み込んだ Mfn2 と同様の NBD 蛍光が観察できた。一般的なリン脂質は、2本の脂肪酸鎖を持つが、ミトコンドリアに局在する CL は4本の脂肪酸鎖を持つ。研究代表者は、OPA1 の研究から CL の脂肪酸鎖の長さや不飽和度が、膜融合に影響することを明らかにしている。OM に含まれる CL を不飽和度の低い CL に置換したところ、NBD 蛍光の低下が観察された。これらの結果から、Mfn2 による膜融合 CL に依存することが明らかになった。また PE を除いた場合や、不飽和度の低い CL では NBD 蛍光の減少が観察されたことから、Mfn2 の膜融合の駆動力は、脂質膜の曲率や流動性に影響を受けることが示された。

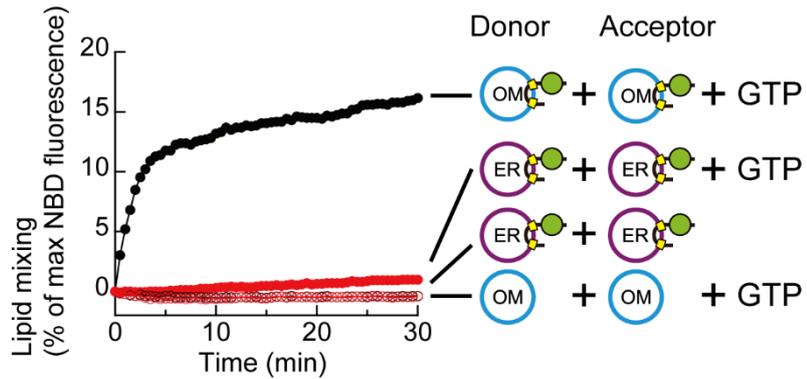


図.3: 脂質膜組成に依存した Mfn2 による膜融合
CL を多く含むミトコンドリア外膜モデルリポソーム
では有意な NBD 蛍光の増加が観察される

本研究から GTP 加水分解及び脂質 CL が、Mfn2 による膜融合の駆動力に必須であることが明らかになった。さらに内膜融合 GTPase とは異なり、融合する両側の膜に Mfn2 が必要であることが明らかになった。Mfn2 は GTPase であることから、Mfn2 の会合状態が GTPase 活性の制御に関わることが予想されるが、本研究の期間内に十分な解析を行うことができなかった。引き続き解析を行い、Mfn2 のトランス会合体またはヘテロ会合体形成への脂質膜組成の寄与、GTPase 活性の相関を明らかにすることで、Mfn2 による膜融合の分子メカニズムの理解を進める予定である。カイコの幼虫とバキュロウイルス発現を用いた発現系により、OPA1 および Mfn2 の大量発現・精製に成功した。今後、この発現系を他のミトコンドリア膜タンパク質の発現・精製に応用することで、ミトコンドリア膜融合および形態制御の分子メカニズムの更なる理解に、貢献したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伴 匡人、石原 直忠
2. 発表標題 ミトコンドリア外膜融合の分子機構解明に向けた膜融合の試験管内再構成
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tadato Ban, Naotada Ishihara
2. 発表標題 Elucidating the molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion using in vitro reconstitution
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伴 匡人、石原 直忠
2. 発表標題 試験管内再構成によるミトコンドリア膜融合機構の解明
3. 学会等名 第21回 日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伴匡人、石原直忠
2. 発表標題 in vitro 膜融合解析によるミトコンドリア膜融合機構の解明
3. 学会等名 2021年度生化学九州支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴匡人、石原直忠
2. 発表標題 in vitro 膜融合解析によるミトコンドリア膜融合機構の解明
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴匡人、石原直忠
2. 発表標題 再構成実験によるミトコンドリア外膜融合機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴匡人、石原直忠
2. 発表標題 ミトコンドリア膜融合反応の試験管内再構成
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴匡人、石原直忠
2. 発表標題 試験管内再構成実験による ミトコンドリア膜融合機構の解明
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 伴匡人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 7
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス	

1. 著者名 伴匡人、今井綾、石原直忠	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカルレビュー	5. 総ページ数 7
3. 書名 The Lipid	

〔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
研究協力者	石原 直忠 (Ishihara Naotada) (10325516)	大阪大学・理学研究科・教授 (14401)	

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
---------	---------