

研究テーマ

ミトコンドリア形態調節に関わるRho・GTPase蛋白質の機能的役割の解明

1). はじめに 緒言 目的 背景 序論

細胞内のエネルギー工場として知られているミトコンドリアは、真核細胞には不可欠のオルガネラであり、その形態は細胞質全体に管状の網様構造(tubular network)を形成・分布し、ダイナミックに分裂と融合を繰り返している(図1)。近年の研究から、細胞内におけるミトコンドリアの形態異常が細胞死(アポトーシス)や個体の発生段階における異常、またヒトでは神経変性疾患、老化及び発癌等のさまざまな現象に直結していることが明らかになってきた。ミトコンドリアの一連の形態変化は、すべてが核にコードされている蛋白質によって担われており、特に形態調節の機能を担っている蛋白質の多くは分子内にGTP加水分解(GTPase)ドメインを有している。興味深いことに、ミトコンドリアの形態異常は、主としてミトコンドリアGTPase蛋白質の突然変異による機能低下がその大きな原因と考えられている。

本研究は、細胞内におけるミトコンドリアの形態変化とその生理的意義を理解することを目的としており、その際にミトコンドリアGTPase蛋白質の分子基盤的な解析から、ミトコンドリア形態調節の作用機序を分子レベルで理解し、なぜミトコンドリアGTPase蛋白質の機能低下が形態異常を導くのか?を明らかにしていくことを目指していく。

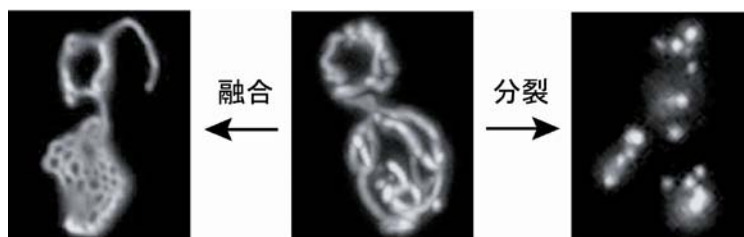


図1. 出芽酵母内のミトコンドリアの様子。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返し、その形態を維持している。図はModzyら(J. Cell Biol., 2000)より引用。

2. 方法

ミトコンドリアは、細胞内における *de novo* 創生が不可能なため、細胞分裂時の娘細胞へのミトコンドリア分配は母細胞内ミトコンドリアの形態変化、特に分裂と密接に関連している。ミトコンドリア分配機構に関しては、出芽酵母を用いた研究から *MMR1*、*YPT11*、及び *GEM1* の3つの遺伝子がそれぞれ関与していることが明らかになっている。なかでも

*Gem1p* は、酵母・植物からヒトまで広く保存された Rho

型ミトコンドリア GTPase 蛋白質であり、ミトコンドリアの形態調節と分配の両方に関与する重要な蛋白質である(図2)。*Gem1p* はC末端側に存在する膜貫通領域でミトコンドリアの外膜にアンカーされており、細胞質側にその機能ドメインとなる二箇所の GTPase ドメイン及びカルシウム結合ドメイン(EF ハンド)を向けて局在している。



図2. *Gem1p*の構造。ミトコンドリア外膜上に存在し、分子量約8万の内在水性蛋白質。分子内にそれぞれ二箇所のGTPaseドメインとEFハンドモチーフを持つミトコンドリアGTPase蛋白質。TMは膜貫通領域を示す。

本研究では、Gem1p の構造機能解析を進め、その実験的な知見から真核生物細胞内のミトコンドリアの動態の理解を目指した。具体的な実験方法として以下の事柄を行った。

- i). Gem1p 組換え蛋白質の調製
- ii). Gem1p の GTPase ドメインの機能解析
- iii). Gem1pのカルシウムイオンとの親和性解析

### 3. 結果 研究成果

#### i). Gem1p組換え蛋白質の調製法確立

まず初めに、Gem1p遺伝子をユタ大学のJanet Shaw教授より供与して頂き、PCR法によりGem1pの細胞質ドメイン(アミノ酸1~617)領域を大腸菌発現用ベクターにクローニングした。大腸菌をこのプラスミドにより形質転換し、組換え蛋白質の強制発現を行ったところ、目的の蛋白質を発現させることに成功し、その後の精製過程を経て、高純度の組換えGem1pを得ることが出来た。そこで、この組換え蛋白質を用いて以下のような生化学的な実験を進めた。

#### ii). Gem1pのカルシウムイオン結合能の確認

Gem1pはこれまでの分子遺伝学的実験により、その機能発現(ミトコンドリアの形態調節機能)において、カルシウムイオンとの親和性が重要であることが示されていたが、実際にカルシウムイオンが直接蛋白質と結合するかどうか不明であった。そこで、本研究ではこの事を調べるために、放射性ラベルされたカルシウムイオン(<sup>45</sup>Ca)を用い、ドットプロット法によりGem1pとの結合実験を行った。その結果、<sup>45</sup>Caが非常に特異的にGem1pに結合していることが示され、これまでの遺伝学的実験をサポートする結果を得ることが出来た。

#### iii). Gem1pによるGTP加水分解実験

以上のように、本研究ではGem1pをその組換え蛋白質として効率的に、さらに機能的な蛋白質として調製することに成功した。次に、この組換え蛋白質を利用してGem1pが本当にGTPase活性を示すかどうか、RIを用いたGTP加水分解実験により確認した。その結果、組換えGem1pは経時変化とともにGTPをGDPに加水分解しており、この酵素反応に伴う速度論的なパラメータは $K_{cat}$ が $0.24(\text{min}^{-1})$ 、 $K_m$ が $130(\mu\text{M})$ であった。また、Gem1pの二つのGTPaseドメインに点変異を導入した変異体では、その加水分解活性が著しく低下しており、このことからGem1pはGTPase蛋白質として機能していることが示唆された。さらには、実際の細胞内の機能におけるGem1pの役割に関しても、GTPase活性が必要であることがin vivoの実験で示すことが出来たので、これらの実験結果はGem1pがミトコンドリアの形態調節をそのGTPase活性によって制御していることが示された。

### 4. 考察 まとめ

本研究では、Gem1pを通じて、細胞内におけるミトコンドリアの形態調節がGTPaseの活性によっていかに制御・調節されているのかを調べた。今後は、他のミトコンドリア形態調節因子も含めた包括的な実験により、ミトコンドリアの動態の全貌に迫るとともに、これら蛋白質の異常と病態との関連を分子レベルで明らかにしていきたい。最後に、本研究に一年間御支援いただいた財団法人 病態代謝研究会には心から御礼を申し上げます。

5. 発表論文、参考文献

Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., Kawabata, S., and **Koshiba, T.**\* (2009). Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Science Signaling*, 2, ra47. (\*corresponding author)

**小柴琢己**\* (2010). ミトコンドリア外膜上でのウイルス免疫制御機構. *生化学*(日本生化学会), 印刷中.

**小柴琢己**\* (2010). ミトコンドリア外膜タンパク質 Mitofusin 2によるウイルス免疫制御機構. *実験医学*(羊土社), 印刷中.