

## ミトコンドリア膜融合反応の試験管内再構成とその分子解析



研究ノート

石原直忠\*

Reconstitution of mitochondrial inner membrane fusion using purified L-OPA1 protein

Key Words : mitochondria membrane fusion OPA1 cardiolipin

### 要旨

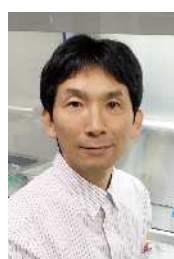
2重膜からなる細胞内小器官ミトコンドリアは、細胞内で活発に動き融合と分裂を繰り返している。ミトコンドリアの融合には種を超えて広く保存されたGTPaseタンパク質群が関与しており、ミトコンドリア内膜の融合には視神経形成異常病の原因遺伝子産物として同定されたOptic atrophy 1 (OPA1)が機能する。私達の研究グループでは、内膜を貫通して存在する「L-OPA1」タンパク質をカイコ幼虫を用いた異種発現系を利用して精製し、リン脂質からなる人工膜リポソームに組み込むことで、膜融合反応を試験管内で再構成することに成功した。このL-OPA1を内膜を模した脂質組成のリポソームに組み込むと、GTPの加水分解に伴って膜融合反応が進行すること、さらに融合する膜の一方にL-OPA1が、他方には、内膜に特異的に存在するリン脂質カルジオリピンがあれば融合が起きることを見出した。試験管内反応系で詳細解析を行うことで、ミトコンドリアの新たな特性を見出すことが可能となった。

### はじめに

ミトコンドリアは2重膜構造からなる細胞小器官であり、酸素呼吸を行うことにより真核細胞のエネルギー生産の中心的な機能を担っている。同時に、酸素呼吸の副産物である酸化ストレスの主要な発生

源でもあり、また細胞死や代謝など重要な細胞機能を持っている。これらのことから、ミトコンドリアの機能低下を抑制し持続的に維持し続けることで、パーキンソン病等の神経変性疾患や糖尿病・肥満等の代謝関連疾患を防ぎ健康維持・増進を進めることが期待されている。

このミトコンドリアの品質管理・機能維持には、ミトコンドリアのダイナミックな形態変化と大きく関連していることが知られている。哺乳動物細胞のミトコンドリアを生きのまま観察すると、細長いネットワーク状のミトコンドリアが活発に動き形を変化させる様子が見られる(図1)。複数のミトコンドリアが連続して一つになる「融合」反応や、逆に長く繋がったミトコンドリアが複数に小さくなる「分裂」反応が頻繁に観察される。このミトコンドリアの分裂と融合を制御する因子として、局在の異なる複数のGTPase (GTP加水分解酵素)群が見いだされている。融合因子を抑制すると、分裂のみが進行してミトコンドリアが小さく断片化し、逆に分裂因子を抑制すると、融合のみが進行して長く繋がった



\* Naotada ISHIHARA

1971年生まれ  
九州大学大学院医学系研究科  
博士(理学)取得(1998年)  
現在、大阪大学大学院理学研究科生物学専攻・教授、博士(理学)  
細胞生物学  
TEL: 06-6850-6706  
E-mail: naotada@bio.sci.osaka-u.ac.jp

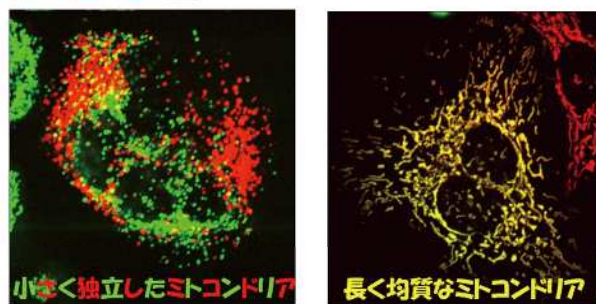


図1: L-OPA1によるミトコンドリア内膜融合モデル

ミトコンドリアとなる。融合と分裂の両方の因子を抑制すると、正常細胞と同様の形態に回復することから、ミトコンドリアの形態は融合と分裂によって制御されていることが明らかになった (図1)。そのため近年では、融合と分裂のバランスを適切に調整することで、ミトコンドリアの品質管理・機能維持することを目指した研究が進められている。

### ミトコンドリアの融合

ミトコンドリアの内膜融合を制御する因子として、酵母から哺乳動物まで種を超えて保存されたダイナミン様 GTPase、OPA1 が同定されている (1)。OPA1 は視神経形成異常となる遺伝病 (Optic Atrophy type-I) の原因遺伝子としても同定されており、ミトコンドリア融合が神経形成・機能維持に重要な役割を持っている。また OPA1 は内膜の融合 (2) のみならず、内膜が内側に陥入した「クリステ」構造の形成にも重要な機能を持つことも知られている (3)。しかし OPA1 がどのようにミトコンドリア内膜の形態変化に関わるか、その分子詳細は不明な点が多く残されている。

私達は OPA1 の機能解析を進める中で、ミトコンドリアが機能を失い内膜の膜電位が失われると、内膜で OPA1 がタンパク質切断を受けることで、融合活性を失うことを見出した (2)。その詳細解析から、内膜貫通型の「L-OPA1」がミトコンドリア融合を活性化すること、ミトコンドリアが膜電位を失うと、

OPA1 の内膜結合ドメインがタンパク質切断を受け「S-OPA1」となることで融合活性が低下することを見出した (2)。これらのことから、融合活性を失った不活性型のミトコンドリアが、健康なミトコンドリアと融合できなくなり独立することが明らかになった。その後ミトコンドリアの品質管理に関して活発な研究が進められ、L-OPA1 によるミトコンドリアの融合制御はミトコンドリアの品質管理を担っていること、失活ミトコンドリアが独立し、パーキンソン病の原因遺伝子産物である Parkin や Pink1 の働きにより標識され、オートファジーにより選択的に分解される、とのモデルが提案され広く認知されるようになった。

### OPA1 によるミトコンドリア内膜の融合反応

私達は、OPA1 によるミトコンドリア内膜の融合反応をさらに詳細に理解することを目指して、精製したタンパク質とリン脂質を用いて試験管内で膜融合反応を再構成して、その分子詳細を解析したいと考えた。しかし、融合活性を持つ L-OPA1 の発現・精製はこれまで成功例がなく、その解析は進められないままとなっていた。そこで我々は様々な発現系を試みたところ、カイコの幼虫を用いたタンパク質発現系によりヒト L-OPA1 の大量発現精製系の構築に成功した (図2) (4)。His タグを付加したヒト L-OPA1 の遺伝子を導入した組み換え型バキュロウイルスを構築し、カイコ幼虫に感染させ飼育したのち

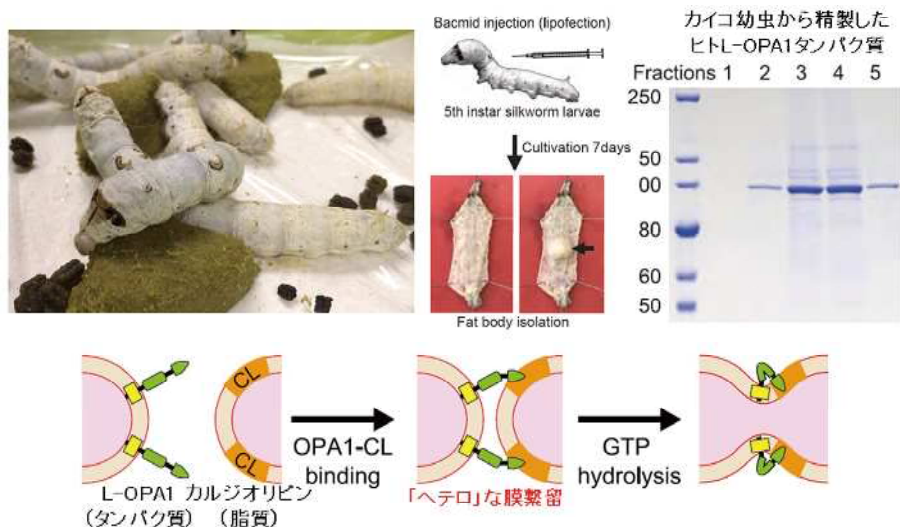


図2：機能の低いミトコンドリアを優性的に選択して排除する仕組み

に解剖し脂肪体を回収した。破碎した脂肪体を遠心分離操作により沈殿を回収し、界面活性剤により可溶化したのちに、Ni アフィニティークロマトグラフィーにより L-OPA1 を精製したところ、60 頭のサイコロから約 2 mg の L-OPA1 タンパク質が得られた (図 2)。

内膜の脂質組成を模したリポソームに精製した L-OPA1 を組み込んだ「OPA1 プロテオリポソーム」を調製し、蛍光色素 NBD とローダミン間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用した方法で膜融合反応を測定したところ、GTP 存在下に時間と共に NBD の蛍光強度の増加が観察された。このように、ミトコンドリア内膜融合反応系を試験管内で再構築することができた (4)。

#### リン脂質によるミトコンドリア融合の制御

この反応系を用いて、OPA1 による膜融合反応の詳細解析を進めた。融合する 2 つのリポソーム膜のうち、両方に L-OPA1 があると膜融合が起きた。さらに一方にのみ L-OPA1 があり、もう一方はタンパク質を含まない膜を用いても、膜融合が起きることが分かった。次に脂質に注目して解析を進めた。ミトコンドリア内膜に豊富に含まれるリン脂質であるカルジオリピンを除いた膜では融合は全く観察されなくなった (4)。さらに、L-OPA1 とカルジオリピンの様々な組み合わせで解析したところ、一方の膜に L-OPA1 が、もう一方の膜にカルジオリピンがあれば膜融合が起きることが分かった。この時、一方の膜の L-OPA1 がもう一方の膜のカルジオリピンと 2 つの膜を介して結合し、その後 GTP の加水分解に伴って膜融合が起きること (後期の膜融合反応) が分かった。さらに L-OPA1 の C 末端ドメインを欠失させると、カルジオリピンとの結合ができなくなり、その結果膜融合も起きないことが分かった。これまでに報告されている細胞内での膜融合 (分泌・エンドサイトーシス等) では、融合する両方の膜に融合を促進するタンパク質 (SNARE など) が必要であることがわかっている (5)。しかし OPA1 によるミトコンドリア内膜融合はそれらとは異なる独特な膜融合機構であることが明らかになった (図 1)。

#### おわりに

試験管内の膜融合反応を構築し詳細に解析することで、哺乳動物のミトコンドリア内膜は独特の一方向性の膜融合機構を持つことを見出した。今回構築した実験手法は、ミトコンドリア外膜の融合機構の解析、融合の制御に関わる関連因子の探索など、様々なミトコンドリア研究への応用が期待できる。これらの手法は膜融合以外でも、解析が十分には進んでいないミトコンドリア膜タンパク質の解析への応用も期待できる。一方で、GTP 加水分解の意義についてはまだ多くは理解が不十分なまま残されている。この疑問を解くには、コンフォメーション変化の解析や、構造解析による研究が必要になる。今後、ミトコンドリア内膜融合の全貌を知るために更なる詳細解析を進めていく必要があると考えている。

#### 参考文献

1. Ishihara N., Otera H., Oka, T. et al.: Regulation and physiologic function of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxid. Redox. Signal*, 19, 389-399 (2013)
2. Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. et al.: Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.*, 25, 2966-2977 (2006)
3. Ardail, D. Privat, J. P. Egret-Charlier, M. et al.: Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.*, 265, 18797-18802 (1990)
4. T. Ban, T. Ishihara, H. Kohno, S. Saita, A. Ichimura, K. Maenaka, T. Oka, K. Mihara, N. Ishihara. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nature Cell Biol.* 19: 856-863 (2017)
5. Weber, T. Zemelman B. V., McNew, J. A. et al.: SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92, 759-772 (1998)