

**哺乳類のミトコンドリアの輸送体を酵母に
機能発現させるために必要な因子の理解に向けて**

2016

山越亮平

目次

第1章 序論

1-1	ミトコンドリア	1
1-2	ミトコンドリア内膜における溶質輸送	2
1-3	Ca ²⁺ ユニポーター	4
1-4	リン酸キャリアー(phosphate carrier: PiC)	5
1-5	ミトコンドリア研究における出芽酵母の有用性	7
1-6	研究の目的	8
1-7	参考文献	9

第2章 出芽酵母のミトコンドリアにおけるCa²⁺ユニポーターの機能的発現

2-1	緒言	12
2-2	結果	13
2-2-1	mMCU 及び mEMRE の酵母への発現	13
2-2-2	mMCU 及び mEMRE の酵母への共発現	17
2-2-3	mMCU 及び mEMRE を発現した酵母ミトコンドリアのCa ²⁺ の取り込み	18
2-3	考察	19
2-4	実験方法	21
2-4-1	試薬	21
2-4-2	mMCU 及び mEMRE の酵母発現用ベクターの構築	21
2-4-3	最適化した mMCU の酵母発現ベクターの構築	22
2-4-4	酵母の培養条件	22
2-4-5	酵母の形質転換	22
2-4-6	酵母ミトコンドリアの調製	23
2-4-7	Western blotting	23
2-4-8	ミトコンドリアのCa ²⁺ 取り込みの測定	24
2-4-9	特異抗体の調製	24
2-5	参考文献	25

第3章 出芽酵母のミトコンドリアにおける哺乳類のリン酸キャリアーの機能的発現

3-1 緒言	27
3-2 結果	29
3-2-1 PiC を欠損した酵母株の樹立	29
3-2-2 rPiC 発現ベクターの Δ PiC への導入	31
3-2-3 Δ NrPiC の酵母における発現レベルの確認	33
3-2-4 酵母において機能的に発現する rPiC 変異体の探索	34
3-2-5 酵母において機能的に発現する Δ NrPiC 変異体の性質	36
3-2-6 酵母において機能的に発現する Δ NrPiC 変異体のリン酸輸送活性	38
3-2-7 F267S、F282S の変異が hPiC に与える影響	40
3-3 考察	41
3-4 実験方法	43
3-4-1 試薬	43
3-4-2 種々の生物種の PiC の酵母発現用ベクターの構築	43
3-4-3 酵母の培養条件	44
3-4-4 酵母の形質転換	44
3-4-5 酵母ミトコンドリアの調製	44
3-4-6 Western blotting	44
3-4-7 PCR-based random mutation 及び gap-repair cloning による変異体の探索	44
3-4-8 Swelling によるミトコンドリアのリン酸輸送活性の評価	45
3-4-9 ^{32}P で標識したリン酸を用いたミトコンドリアのリン酸輸送活性の測定	45
3-5 参考文献	46

第4章 総括

4-1 出芽酵母のミトコンドリアにおける Ca^{2+} ユニポーターの機能的発現(第2章)	48
4-2 出芽酵母のミトコンドリアにおける哺乳類のリン酸キャリアーの機能的発現(第3章)	49
4-3 参考文献	51

謝辞

本稿で用いた省略形

ADP; adenosine 5'-diphosphate

ATP; adenosine 5'-triphosphate

Pi; inorganic phosphate

CoA; coenzyme A

FAD; flavin-adenine dinucleotide

NAD⁺; nicotinamide adenine dinucleotide

DNA; deoxyribonucleic acid

RNA; ribonucleic acid

cDNA; complementary DNA

ORF; open reading frame

yA2P; yeast ADP/ATP carrier 2 promoter

tRNA; transfer ribonucleic acid

mRNA; messenger ribonucleic acid

SDS; sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

NCF; nitro cellulose filter

PCR; polymerase chain reaction

TS; tween solution

OD; optical density

BSA; bovine serum albumin

DTT; dithiothreitol

PEG; polyethylene glycol

G3PDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

TDH3p; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter

KLH; keyhole limpet hemocyanin

第1章 序論

1-1 ミトコンドリア

ミトコンドリアは全ての真核生物に存在する細胞内小器官であり、主としてエネルギー産生を担っている。また、構造的な特徴として外膜と内膜からなる脂質二重膜構造を有している(Fig.1-1)。ミトコンドリア外膜は、主として構造を維持させる役割を担い、電位依存性アニオンチャネル(voltage-dependant anion channel: VDAC)を介して分子量 6000 以下の物質を非選択的に透過させる。これに対し、内膜の物質透過性は著しく低く保たれており、ほとんどの低分子やイオンに関して非透過性である。そのため、ミトコンドリア内膜上における溶質輸送はそれぞれの溶質に特異的かつ選択的な輸送担体を介して輸送されており、これらのミトコンドリアへ溶質を輸送するタンパク質が効率的なエネルギー産生に寄与している[1-5]。

また、哺乳類においてミトコンドリアは ATP の合成に加え、 Ca^{2+} をそのマトリクス内部に取り込むことによって、細胞内の Ca^{2+} 濃度を低下させる役割を有していると考えられている[6,7]。この機構によって細胞内の Ca^{2+} 濃度を低下させ、 Ca^{2+} 濃度を一定に保つことによって細胞内の恒常性は維持されている。他にも、ミトコンドリアは制御された細胞死であるアポトーシスなどにも関与すると考えられており[8,9]、生体内においてミトコンドリアは多様な役割を有していると考えられている。

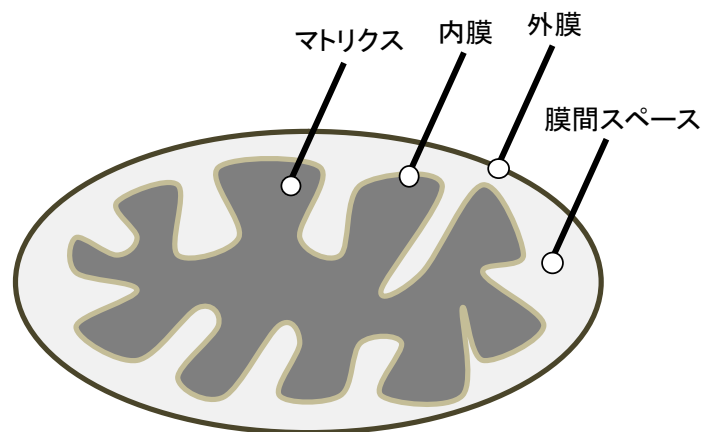


Fig.1-1 ミトコンドリアの構造

1-2 ミトコンドリア内膜における溶質輸送

1-1 で述べたように、内膜の物質透過性は極めて低く保たれており、内膜はほとんどの低分子やイオンに関して非透過性である。このため、ミトコンドリア内膜上における溶質輸送はそれぞれの溶質に特異的かつ選択的な輸送担体を介して輸送される(Fig1.-2)。これらの溶質輸送の大部分を担うタンパク質群としてミトコンドリア溶質輸送担体ファミリー(mitochondrial solute carrier family: slc25a)が知られている。このファミリーに属するタンパク質は、哺乳類では約 50 種類[10]、出芽酵母では約 40 種類[4,11]が存在する。これらは、約 30 kDa ほどの 6 回膜貫通型タンパク質であり、共通の構造的特徴として約 100 アミノ酸残基からなる 3 回繰り返し構造、プロリン、アスパラギン酸、アルギニン、リジンなどからなる PDKR モチーフと呼ばれる配列などを有することが知られている[5]。また、出芽酵母においてはいくつかのミトコンドリア溶質輸送担体破壊株は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化能が欠損することが知られている[12,13]。このように、ミトコンドリア溶質輸送担体は、生体内において極めて重要な役割を果たしているが、その輸送様式に関する解析は ADP/ATP carrier についてのものに限定されている[14]。そのため、これまでに解析された ADP/ATP carrier の輸送様式が ADP/ATP carrier に特有のものなのか、他の溶質輸送担体全般に共通したものなのかについての理解はあまり進んでいない。そのため、リン酸キャリアーなどのようにミトコンドリア溶質輸送担体に属するタンパク質の中で輸送する溶質が同定されているタンパク質について解析することが必要である。

また、近年ミトコンドリア溶質輸送担体に属していないタンパク質が生理的に重要な溶質である Ca^{2+} やピルビン酸などの輸送をミトコンドリア内膜で行っていることが明らかとなってきた[15,16]。これらのタンパク質は、ミトコンドリア溶質輸送担体と構造的な類似性を有さず、複数のタンパク質が複合体を形成することによってミトコンドリアへの溶質の輸送を担っていることが報告されている。このことは、ミトコンドリアにおける溶質輸送はこれまでに考えられていたものよりも多様な輸送様式を持っていることを示唆している。その中でも、 Ca^{2+} ユニポーターはこれまでの解析からチャネル様の輸送を行っていると考えられているが、その推定モデルはこれまでに同定されている Ca^{2+} チャネルと異なっており、その輸送様式について近年盛んに研究が行われている。

このように、ミトコンドリア内膜の輸送に関与するタンパク質は、近年同定されてきたタンパク質に限らず、古くから研究が行われているミトコンドリア溶質輸送担体についても輸送様式について十分な解析が行われていない。この原因として、1-1 で述べたようにミトコンドリアへの溶質輸送はミトコンドリアの酸化的リン酸化において重要な役割を果たしており、哺乳類においてはその輸送に関与するタンパク質の欠損体を作製することが困難なことが挙げられる。また、複雑な複合体を形成してミトコンドリアへの溶質輸送に関与するタンパク質も存在しており、このようなタンパク質については複合体の構成タンパク質がお互いの機能に密接に関与しており、構成タンパク質ごとの機能を明確に区別して解析できる実験系が存在しないことも解析が進んでいない一因となっている。これに加えて、近年 Ca^{2+} 、リン酸、CoA などの輸送体は、先天的な遺伝子変異によって筋異常を引き起こすことが報告されており[17-19]、哺乳類のミトコンドリアへ溶質を輸送するタンパ

ク質に対する注目は高まっている。これらのことから、ミトコンドリアへ溶質を輸送するタンパク質の機能解析を進めるため、機能解析に適した発現系の構築が期待されている。

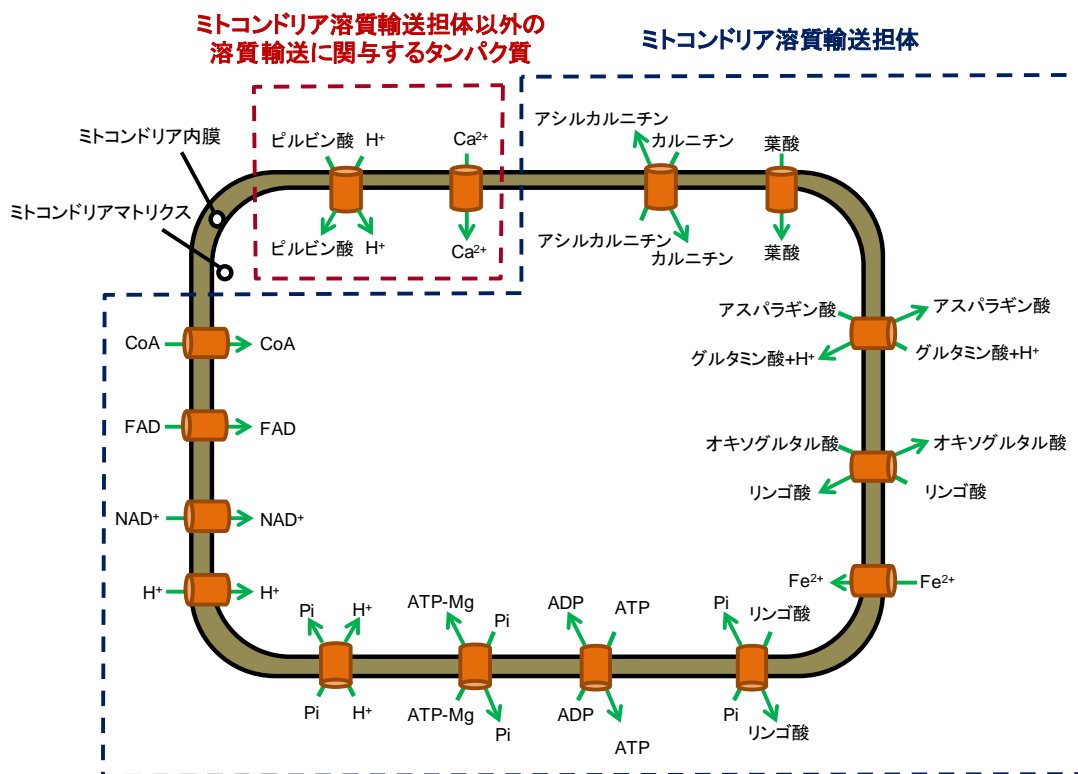


Fig.1-2 ミトコンドリア内膜における溶質輸送

1-3 Ca²⁺ユニポーター

1-1 で述べたようにミトコンドリアは Ca²⁺をマトリクス内部に取り込むことにより、細胞内の Ca²⁺濃度を低下させる役割を有していると考えられている。そのため、ミトコンドリアの内膜にはマトリクス内部に Ca²⁺を取り込むタンパク質である Ca²⁺ユニポーターと呼ばれるタンパク質が存在すると考えられていたがその分子実体は不明であった。近年、Ca²⁺ユニポーターの主要な構成タンパク質として mitochondrial calcium uniporter (MCU)が同定された[20,21]。この発見を皮切りに mitochondrial calcium uptake 1、2(MICU1、MICU2)[22,23]、essential MCU regulator (EMRE)[24]、MCUb[25]など Ca²⁺ユニポーターの構成タンパク質が複数同定され、Ca²⁺ユニポーターの分子実体は様々なタンパク質によって形成される複合体であることが明らかとなってきた (Fig.1-3)。このように、Ca²⁺ユニポーターを構成している分子が同定されたことによって、各構成タンパク質の機能について近年盛んに解析が行われている。これまでに脂質二重膜への再構成実験などから MCU のオリゴマーがチャンネルの孔の部分形成し、そのほかのサブユニットが機能の調節を担っていると考えられている[20,25]。この孔を形成している MCU は、推定構造から二回膜貫通型の膜タンパク質であると考えられている[20,21]が、これまでに二回膜貫通タンパク質がホモオリゴマーを形成して孔を形成する Ca²⁺チャンネルは報告されていない。このことから、Ca²⁺ユニポーターはこれまでの Ca²⁺チャンネルにない輸送様式を有していると考えられるが、構造と機能に関して十分な解析は未だ行われていない。Ca²⁺ユニポーターは複数のタンパク質の複合体であり、それらの構成タンパク質が相互作用することによってお互いの機能に密接に関与している。そのため、構成タンパク質を一つでも欠損させると他のタンパク質の機能にも影響を与えてしまい、構成タンパク質の機能を単独で評価することが困難なことが解析の進まない一因となっている。そのため、各構成タンパク質の機能を単独で評価できる実験系の構築が望まれている。

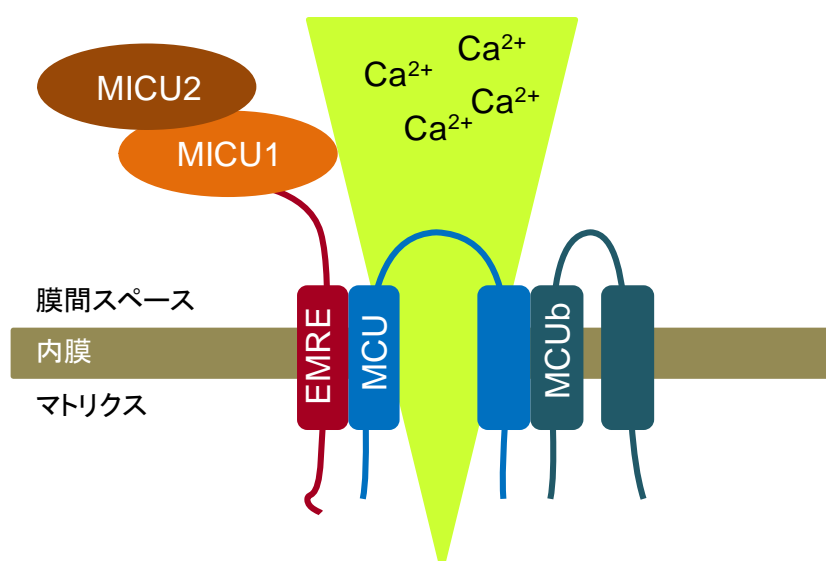


Fig.1-3 Ca²⁺ユニポーターの分子モデル

1-4 リン酸キャリアー(phosphate carrier: PiC)

リン酸は、ミトコンドリアにおいて ADP と共に ATP 合成の基質となり、酸化的リン酸化に必須の溶質の一つである。このリン酸は、ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーに属するタンパク質の一つであるリン酸キャリアー(PiC)によって H⁺と共に選択的にマトリクス内に輸送される[26]。そのため、この PiC は酸化的リン酸化において極めて重要であり、これは PiC を欠損した酵母(Δ PiC)がミトコンドリアの酸化的リン酸化能を欠損し、非発酵性炭素源培地で生育できなくなることから理解できる[23]。

酵母においては PiC をコードする遺伝子は一つのみであるが、哺乳類においては PiC には二種類のスプライズバリエーションが存在し、それぞれ isoform A(PiC-A)と isoform B(PiC-B)と呼ばれる[27](Fig.1-4)。PiC-A と PiC-B は、異なった組織分布を示す事が知られており、PiC-A は心臓、横隔膜、骨格筋などの組織特異的に、PiC-B は様々な組織に広範に発現している[28-30]。また、PiC-A と PiC-B のリン酸輸送活性は PiC-B の方が PiC-A と比較して 5 倍ほど高いことが再構成実験によって報告されている[29]。しかしながら、この PiC-A と PiC-B のリン酸輸送活性の違いはいずれのアミノ酸残基の違いによって生じているかは明らかにされておらず、酵母の PiC においては PiC-A 及び PiC-B それぞれに特徴的な領域はいずれも保存されていない。このように、酵母の PiC に保存されていない哺乳類の PiC に特徴的な領域がアイソフォーム間の活性の違いに関与していると考えられるが、哺乳類の PiC についてはいずれのアミノ酸残基がその機能発現及び構造形成において重要な役割を果たしているかについて十分な解析は行われていない。

また、PiC は ADP/ATP carrier と同様に古くから同定されているタンパク質であり、輸送する溶質が明確に同定されているミトコンドリア溶質輸送担体の一つとして知られている。そのため、これまでにミトコンドリア溶質輸送担体のモデルとして輸送様式の解析に用いられてきた ADP/ATP carrier と同様にモデルタンパク質として用いることが可能なのではないかと考えられている。このことから、PiC の輸送様式の解析を行うことは PiC 自体の輸送様式の理解に加えて、ミトコンドリア溶質輸送担体に全般的な輸送様式の特徴について理解することができると考えられる。しかしながら、上述したようにリン酸キャリアーは酸化的リン酸化に必須であるため、哺乳類においては欠損体の構築が困難なことから、解析に適した発現系が存在しないため解析は進んでいない。

```

rPiC-A 1:MFSSVAHLARANPFNAPHLQLVHDVSGPRSPGPPRRSRHLAAAAVEEQYSCEYGSGRFF 60
rPiC-B 1:MFSSVAHLARANPFNAPHLQLVHDVSGPRSPGPPRRSRHLAAAAVEE-YSCEFGSMKYY 59
***** **

rPiC-A 61:ILCGLGGIISCGTHTALVPLDLVKCRMQVDPQKY-KGIFNGFSITLKEDGVRGLAKGWA 119
rPiC-B 60:ALCGFGGVLSCGLTHTAVVPLDLVKCRMQVDPQKY-KGIFNGFSITLKEDGVRGLAKGWA 118
*** ** *****

rPiC-A 120:PTLIGYSMQGLCKFGFYEVFKALYSNILGEENTYLWRTSLYLAASASAEFFADIALAPME 179
rPiC-B 119:PTLIGYSMQGLCKFGFYEVFKALYSNILGEENTYLWRTSLYLAASASAEFFADIALAPME 178
*****

rPiC-A 180:AAKVRIQTQPGYANTLREAVPKMYKEEGLNAFYKGVAPLWMRQIPYTMKFCFERTVEA 239
rPiC-B 179:AAKVRIQTQPGYANTLREAVPKMYKEEGLNAFYKGVAPLWMRQIPYTMKFCFERTVEA 238
*****

rPiC-A 240:LYKFVVPKPRSECTKAEQLVVTFVAGYIAGVFCAIVSHPADSVVSVLNKEK---GSTASQ 296
rPiC-B 239:LYKFVVPKPRSECTKAEQLVVTFVAGYIAGVFCAIVSHPADSVVSVLNKEK---GSTASQ 295
*****

rPiC-A 297:VL---QRLGFRGVWKGFLFARIIMIGITLTALQWFIYDSVKVYFRLPRPPPEMPESLKKK 352
rPiC-B 296:VL---QRLGFRGVWKGFLFARIIMIGITLTALQWFIYDSVKVYFRLPRPPPEMPESLKKK 351
** *****

rPiC-A 353:LGLTE 357
rPiC-B 352:LGLTE 356
*****

```

Fig.1-4 ラット PiC-A と PiC-B の一次構造の比較

ラット PiC の 2 種類のスプライスバリエントのアミノ酸配列を比較した。rPiC-A、rPiC-B はそれぞれラット PiC の 2 種類のスプライスバリエントのアミノ酸配列を表す。*部分は、2 つのスプライスバリエント間で保存された領域を示している。

1-5 ミトコンドリア研究における出芽酵母の有用性

真菌の一種である出芽酵母は、ミトコンドリア研究に関して有用なモデル生物として知られており[27]、酸化的リン酸化に関与するタンパク質の研究において広く用いられている。出芽酵母の特徴として、遺伝子欠損体を容易に得られ、世代時間が短いことも相まって迅速かつ容易に分子生物学的な解析を行えることが挙げられる[31,32]。

また、醸造用酵母と近縁であるため解糖系からのエネルギー産生のみで生育可能な点も特徴である。そのため、ミトコンドリアの呼吸能が欠損しグリセロールなどの非発酵性炭素源培地で生育不可能な酵母株も、グルコースなどの発酵性炭素源培地では生育可能である。このことから、出芽酵母では哺乳細胞などの生育に必須であるミトコンドリアの酸化的リン酸化能に必須のタンパク質の欠損が可能である。そのため、哺乳類のリン酸キャリアーなどの酸化的リン酸化に必須のミトコンドリア溶質輸送担体についても欠損体に発現させて機能解析を行うことが可能である。

また、酵母のミトコンドリアは Ca^{2+} ユニポーターなど哺乳類に存在するいくつかの溶質輸送系が存在しないことが知られている。近年同定された Ca^{2+} ユニポーターは、タンパク質複合体として機能しており、哺乳細胞で構成タンパク質を欠損させて解析を行うと、相互作用している全ての構成タンパク質の機能に影響を与えてしまう。そのため、哺乳細胞を用いた系では個々の構成タンパク質の機能を単独で評価することは困難であるが、内在性の Ca^{2+} ユニポーターが存在しない出芽酵母では解析したいタンパク質のみを発現させて評価することが可能である。また、これまでにミトコンドリアに溶質を輸送するタンパク質の機能解析にはリポソームへの再構成実験[33,34]が広く用いられているが、この系と比較して溶質輸送の駆動力であるミトコンドリアの膜電位を簡便に再現できることも特徴である。

このように、出芽酵母はミトコンドリアへ溶質を輸送するタンパク質の解析に極めて有用である。しかしながら、哺乳類のミトコンドリアへ溶質を輸送するタンパク質を酵母に発現させて解析を行った例は多くない。その原因としてミトコンドリアへ輸送担体を発現させる時に酵母での発現条件を詳細に検討しなければいけないことが挙げられる。例として、哺乳類のADP/ATP carrierの場合、そのままでは酵母に発現せず、N末端側のアミノ酸配列を酵母のものと入れ替えたキメラ体にすることによって酵母に発現することが知られている[35,36]。このように、酵母発現系を用いるには異種生物のタンパク質の機能発現という課題の克服が必要である。

1-6 研究の目的

これまでに述べてきたように、ミトコンドリア内膜における溶質輸送は酸化的リン酸化、細胞内の Ca^{2+} 濃度の調節などミトコンドリアの様々な機能において極めて重要な役割を果たしている。また、近年ミトコンドリア内膜における溶質輸送はこれまでに考えられていたよりも多様な輸送様式を持つことが分かってきた。しかしながら、これらの輸送に関与するタンパク質は機能解析に適した発現系が構築されていないことから、輸送様式に関する解析は十分に進んでいない。1-5 で述べたようにこれらの輸送に関与するタンパク質の解析を行うために酵母の発現系は非常に有効な発現系であると考えられるが、哺乳類のタンパク質を酵母に発現させて機能解析をした報告は多くはない。その一因として、哺乳類のミトコンドリアへの溶質輸送に関与するタンパク質を酵母において発現させるためには発現条件を詳細に検討しなければいけないことが挙げられる。この技術的な課題さえ克服できれば、哺乳類のミトコンドリアの溶質輸送に関わるタンパク質に対して有効な発現系を構築できる。また、複数の発現系を構築する過程で、哺乳類のミトコンドリアの輸送に関与するタンパク質を酵母に発現させるために必要な条件を一般化することができればその解析は飛躍的に進むと考えられる。

そこで、本研究では酵母を用いた発現系が機能解析に有効であると考えられる 2 種類の哺乳類のミトコンドリアへの溶質輸送に関与するタンパク質の酵母発現系の構築を試みることにした。また、その発現系の構築を通して哺乳類のミトコンドリアへの溶質輸送に関与するタンパク質を酵母に発現させるために重要な因子の同定を試みた。まず、複雑な複合体を形成しているため哺乳細胞を用い発現系では構成タンパク質の機能を単独で評価することが困難である Ca^{2+} ユニポーターを酵母に機能的に発現させることを試みた(第 2 章)。続いて、酸化的リン酸化に必須であるため哺乳細胞では欠損させて解析を行うことが困難である哺乳類の PiC を酵母に機能的に発現させることを試みた(第 3 章)。最後に、これらの酵母への哺乳類のタンパク質の機能的発現を通して哺乳類のミトコンドリアに溶質を輸送するタンパク質を酵母に発現させるために重要な因子について考察する(第 4 章)。

1-7 参考文献

1. F. Palmieri, The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology, *Mol. Aspects Med.* 34 (2013)465-484.
2. M. Gutiérrez-Aguilar, Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers, *Biochem J.* 454(2013)371-386.
3. H. Wohlrab, Transport proteins (carriers) of mitochondria, *IUBMB Life* 61(2009)40-46.
4. A.D. Arco, New mitochondrial carriers: an overview, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005)2204-2227.
5. E.R. Kunji, The role and structure of mitochondrial carriers, *FEBS Lett.* 564 (2004)239-244.
6. J.G. McCormack, The role of mitochondrial Ca^{2+} transport and matrix Ca^{2+} in signal transduction in mammalian tissues, *Biochim. Biophys. Acta.* 1018 (1990)287-291.
7. P. Pizzo I. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities, *Pflugers Arch.* 464 (2012)3-17.
8. Y. Tsujimoto, Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death, *Apoptosis.* (2007)835-840.
9. Zamzami N, The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens, *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2001)67-71.
10. Palmieri F, Diseases caused by defects of mitochondrial carriers, *Biochim Biophys Acta.* 1777 (2008)564-578.
11. Roussel D, Does any yeast mitochondrial carrier have a native uncoupling protein function? *J Bioenerg Biomembran* 34(3) (2002)165-176.
12. Marobbio CM, Identification and functional reconstitution of yeast mitochondrial carrier for S-adenosylmethionine, *EMBO J.* 22(22) (2003)5975-5982.
13. Giancaspero TA, Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit expression in *Saccharomyces cerevisiae*-involvement of the mitochondrial FAD transporter, Flx1p. *FEBS J.* 275(6) (2008)1103-1117.
14. Klingenberg M, The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta* 1778(10) (2008)1978-2021.
15. Halestrap AP. The mitochondrial pyruvate carrier: has it been unearthed at last? *Cell Metab.* 16(2) (2012)141-143.
16. De Stefani D, Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochim Biophys Acta.* 1853(9) (2015)2006-2011.

17. Logan CV, Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat Genet.* 46(2) (2014)188-193.
18. Mayr JA, Deficiency of the mitochondrial phosphate carrier presenting as myopathy and cardiomyopathy in a family with three affected children. *Neuromuscul Disord.* 21(11) (2011)803-808.
19. Shamseldin HE, Mutation of the mitochondrial carrier SLC25A42 causes a novel form of mitochondrial myopathy in humans. *Hum Genet.* 135(1) (2016)21-30.
20. De Stefani D, A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476 (2011)336-340.
21. Baughman JM, Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476 (2011)341-345.
22. Perocchi F, MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake, *Nature* 467 (2010)291–296.
23. Plovanich M, MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling, *PLoS One* 8 (2013)e55785.
24. Sancak Y, EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex, *Science* 342 (2013)1379-1382.
25. Raffaello A, The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit, *EMBO J.* 32 (2013)2362-2376.
26. Phelps A, Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry.* 30(1) (1991)248-252.
27. Murakami H, Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor, *Nature.* 347(6292) (1990)488-491.
28. Dolce V, The sequences of human and bovine genes of the phosphate carrier from mitochondria contain evidence of alternatively spliced forms, *J Biol Chem.* 269(14) (1994)10451-10460.
29. Fiermonte G, Expression in *Escherichia coli*, functional characterization, and tissue distribution of isoforms A and B of the phosphate carrier from bovine mitochondria, *J Biol Chem.* 273(35) (1998)22782-22787.
30. Dolce V, Tissue-specific expression of the two isoforms of the mitochondrial phosphate carrier in bovine tissues, *FEBS Lett.* 399(1-2) (1996)95-98.
31. Partow S, Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast.* 27(11) (2010)955-964.

32. Brachmann CB, Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications, *Yeast*. 14(2) (1998)115-132.
33. Fiermonte G, A novel member of solute carrier family 25 (SLC25A42) is a transporter of coenzyme A and adenosine 3',5'-diphosphate in human mitochondria. *J Biol Chem*. 284(27) (2009)18152-18159
34. Di Noia MA, The human SLC25A33 and SLC25A36 genes of solute carrier family 25 encode two mitochondrial pyrimidine nucleotide transporters. *J Biol Chem*. 289(48) (2014)33137-33148.
35. M. Hashimoto, Expression of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria: significantly enhanced expression by replacement of the N-terminal region of the bovine carrier by the corresponding regions of the yeast carriers, *Biochim. Biophys. Acta* 1409 (1999)113-124.
36. T. Hatanaka, Significant expression of functional human type 1 mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001)595-599.

第2章 出芽酵母のミトコンドリアにおける Ca^{2+} ユニポーターの機能的発現

2-1 緒言

近年、ミトコンドリアに存在する Ca^{2+} ユニポーターは MCU[1,2]、MICU1[3]、MICU2[4]、EMRE[5]、MCUb[6]などの分子がチャンネル様の複合体を形成してミトコンドリアに Ca^{2+} を取り込んでいることが明らかとなってきた。これまでの解析から、 Ca^{2+} ユニポーターはこれまでに知られている Ca^{2+} チャンネルにない特徴的な輸送様式を有していると考えられており、盛んに研究が行われている。しかしながら、構成タンパク質の詳細な機能の解析は十分に行われていない。これまでに Ca^{2+} ユニポーターのミトコンドリアにおける Ca^{2+} 取り込み活性は MCU と EMRE の二種類の構成タンパク質が最低限必要なことが報告されている[1,2,5]。そして、その他の構成タンパク質が活性の促進や抑制などを担って機能の調節を行っている。しかしながら、MCU と EMRE の機能について詳細に解析する場合、哺乳細胞を用いたノックダウンなどの遺伝子発現を抑制するような解析や変異体を用いた解析では他の構成タンパク質との相互作用がなくなってしまう可能性が考えられる。そのため、MCU や EMRE の機能を評価しているのか、他の調節タンパク質との相互作用への影響なのかを区別することが困難である。

そこで、本研究ではこのような問題点を解決できる発現系として出芽酵母を用いた解析系に着目した。出芽酵母のミトコンドリアは、 Ca^{2+} 取り込み活性が存在しない生物として知られており[7]、 Ca^{2+} ユニポーターを構成するタンパク質のホモログが保存されていない[3]。そのため、出芽酵母に MCU と EMRE だけを発現させて解析を行えば、他の構成タンパク質の影響を考慮せずに解析を行えると考えられる。そこで、本研究では MCU と EMRE の酵母発現系の構築を試みた。

2-2 結果

2-2-1 mMCU 及び mEMRE の酵母への発現

初めに、ミトコンドリアが Ca^{2+} を取り込むのに最低限必要なタンパク質である MCU と EMRE の 2 種類のタンパク質を酵母に発現させることを試みた。

まず、マウス MCU(mMCU)とマウス EMRE(mEMRE)をコードする遺伝子を C 末端側に FLAG タグを融合させて発現させることが可能なマルチコピーベクター pYO326-TDH3p-FLAG に組み込んだ。この発現ベクターをそれぞれ野生型酵母(WT)に導入し、形質転換体の選択を行った。続いて、この形質転換体から単離したミトコンドリアを SDS-PAGE に供し、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting を行った(Fig.2-1)。その結果、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting では MCU-FLAG の発現ベクターを導入した株では mMCU の推定分子量である 39.7 kDa より低い位置に分解産物と考えられるバンドのみが検出された。一方、EMRE-FLAG の発現ベクターを導入した株は mEMRE の推定分子量である約 12 kDa 付近にバンドが確認された。また、推定分子量付近にバンドが確認された mEMRE は、細胞全タンパク質と比較してミトコンドリア画分でバンド強度が強くなっていることから、ミトコンドリアに移行していることが確認された。これらのことから、酵母ミトコンドリアにおいて mMCU-FLAG は発現しておらず、mEMRE-FLAG のみが発現していることが示唆された。

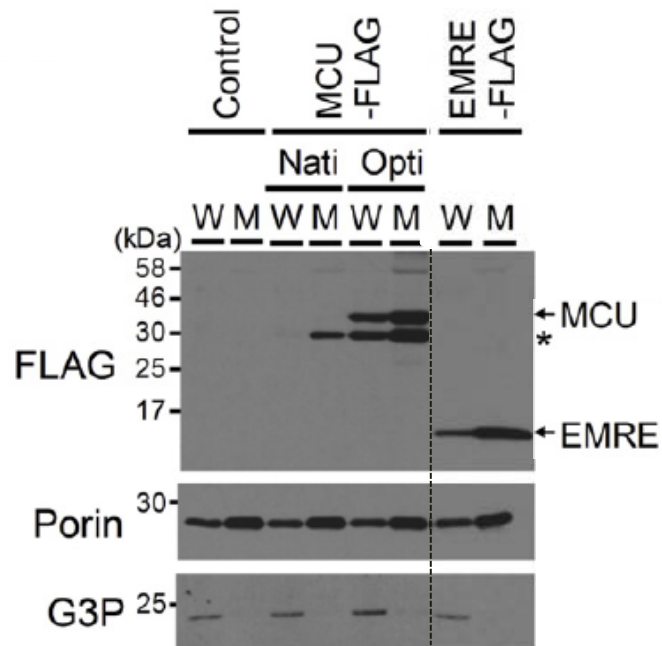


Fig.2-1 酵母における mMCU 及び mEMRE の発現

FLAG に対する特異抗体を用いた Western blotting によって mMCU-FLAG、mEMRE-FLAG の発現の確認を行った。コントロールとしてミトコンドリアに局在するタンパク質である Porin1(Porin)と細胞質のコントロールタンパク質である G3PDH(G3P)の抗体を用いた Western blotting も同時に行った。W は、細胞全タンパク質画分を、M はミトコンドリア画分をそれぞれ表す。また、control は空ベクターを導入した WT から単離したミトコンドリアを、MCU-FLAG 及び EMRE-FLAG はそれぞれ対応する発現ベクターを導入した WT から単離した酵母を表す、Nati 及び opti はそれぞれ酵母に対してコドン最適化していない mMCU をコードする遺伝子と最適化した mMCU をコードする遺伝子の発現ベクターを用いたことを表す。解析には FLAG、G3PDH に対する特異抗体を用いた場合には 20 μ g、PORIN 1 に対する特異抗体を用いた場合には 5 μ g 分のタンパク質量になるようサンプルを用いた。また、矢印部分は、それぞれのタンパク質と考えられるバンドの位置を、★は分解産物と考えられるバンドの位置を表す。

続いて、mMCU が発現しなかった理由の検討を行った。一般的に、酵母に異種生物のタンパク質を発現させる場合に塩基配列中に GC 含量が高い領域が存在すると発現しにくくなることが知られている。そこで、この点について mMCU をコードする遺伝子中の GC 含量を確認した (Fig.2-2)。その結果、mMCU をコードする遺伝子の 5' 側 100 bp の領域は、他の領域の GC 含量が 50%程度であるのに対し、その GC 含量が 80%以上と高かった。また、哺乳類の遺伝子を酵母に発現させる際に酵母での使用頻度が低いレアコドンが多く使われていることにより発現量が低下することが知られている。このレアコドンの量は、酵母の ADP/ATP carrier をコードする遺伝子では全体の 1%程度しか存在しない。また、当研究室でこれまでに酵母に発現させることに成功している哺乳類のミトコンドリア溶質輸送担体をコードする遺伝子 11 種類のレアコドンの量は平均で 18%、最も高いものでも 21%程度である。そこで、mMCU をコードする遺伝子についてレアコドンの存在量を確認したところ全体でも 23%と高く、5' 側 100 bp は 28%とさらに高かった。これらのことから、この MCU をコードする遺伝子の 5' 側 100 bp の領域が酵母への発現に影響を与えている可能性が考えられた。

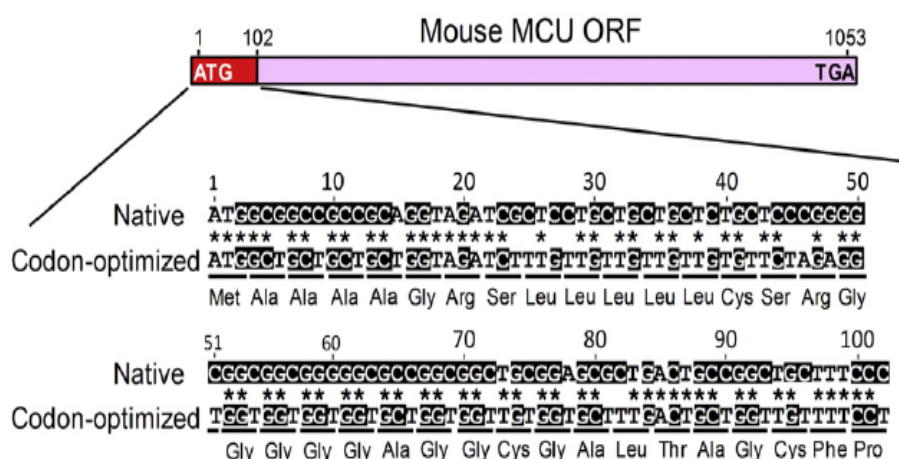


Fig.2-2 野生型 mMCU 及び酵母に対して最適化した mMCU の 5' 側の塩基配列の比較

酵母に対してコドンを最適化していない mMCU をコードする遺伝子と最適化した mMCU をコードする遺伝子の 5' 側の塩基配列を示した。Native は酵母に対してコドンを最適化していない mMCU をコードする遺伝子の塩基配列を、Codon-optimized は最適化した mMCU をコードする遺伝子の塩基配列を表す。黒いボックス部分は、2つの塩基配列間で一致している領域を表す。

そこで mMCU の発現ベクターから mMCU をコードする遺伝子の 5' 側 100 bp の塩基配列を制限酵素によって発現ベクターから切り出した。続いて、この領域に overlap-extension PCR[8] によって mMCU のアミノ酸配列を変えないよう GC 含量を低下させ、かつコドン酵母に最適化した配列を作製し、その配列を発現ベクターに組み込んだ。この作製した最適化 mMCU 発現ベクターを WT に導入し、形質転換体の選択を行った。続いて、この形質転換体から単離したミトコンドリアを SDS-PAGE に供し、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting を行った(Fig.2-1)。その結果、最適化 mMCU 発現ベクターを導入した WT ではコドンの最適化を行っていない mMCU の発現ベクターで観察されなかったバンドが観察された。このバンドは mMCU の推定分子量である 39.7 kDa 付近に検出されたことから、最適化 mMCU の発現ベクターを用いることによって mMCU が発現できていることが示唆された。

2-2-2 mMCU 及び mEMRE の酵母への共発現

ここまでの解析によって mMCU と mEMRE を酵母に発現させることに成功した。しかしながら、ここまでの解析では mMCU と mEMRE をそれぞれ単独で発現させている。そこで、mMCU と mEMRE を共発現させた場合でも単独で発現させた場合と同程度の発現量で発現させられるか検討した。まず、mMCU と mEMRE をコードする遺伝子をタグが付加されないマルチコピーベクターである pYO326-TDH3p と MYC タグが付加されるマルチコピーベクターである pYO326(LEU2)-TDH3p-MYC それぞれ組み込んだ。これらの発現ベクターを単独もしくは同時に WT に導入し、形質転換体の選択を行った。続いて、これらの形質転換体から単離したミトコンドリアを SDS-PAGE に供し、抗 MCU 抗体もしくは抗 MYC 抗体を用いた Western blotting を行った (Fig.2-3)。その結果、mMCU 及び mEMRE を単独で発現させた場合も共発現させた場合も発現量に大きな変化はなかった。このことから、mMCU と mEMRE を酵母に共発現させることが可能であることが確認された。

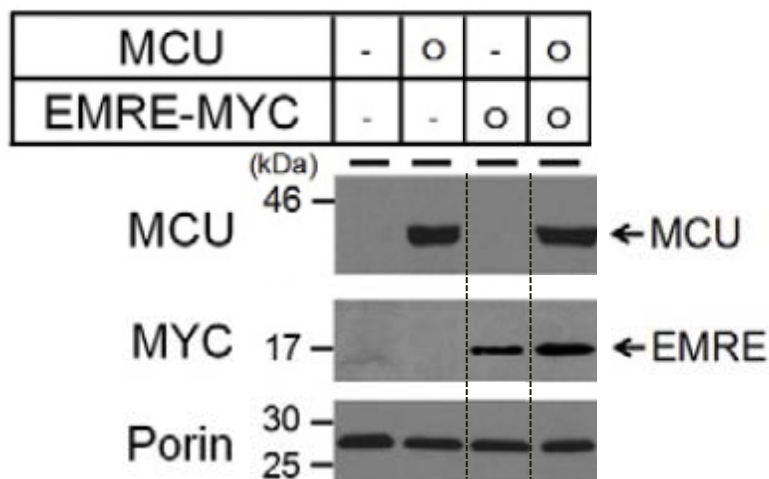


Fig.2-3 mMCU 及び mEMRE を単発現させた場合と共発現させた場合の発現量の比較

MCU、MYC に対する特異抗体を用いた Western blotting によって酵母に単発現させた場合と共発現させた場合の MCU と EMRE-MYC の発現量の変化を確認した。コントロールとしてミトコンドリアに局在するタンパク質である Porin1(Porin)の抗体を用いた Western blotting も同時に行った。解析には表に示すタンパク質をコードする遺伝子の発現ベクターを導入した酵母から単離したミトコンドリアを MCU 及び MYC に対する特異抗体を用いた場合には 20 μ g、PORIN 1 に対する特異抗体を用いた場合には 5 μ g 分のタンパク質量になるよう利用した。

2-2-3 mMCU 及び mEMRE を発現した酵母ミトコンドリアの Ca^{2+} の取り込み

これまでの解析によって mMCU と mEMRE を酵母に共発現させることに成功し、共発現が発現量に影響を与えないことが確認された。そこで、共発現させた mMCU と mEMRE が機能的に発現しているかを酵母ミトコンドリアが Ca^{2+} 取り込み能を獲得するかを調べることによって検討した。

まず、野生型酵母に空ベクター、もしくは mMCU と mEMRE-MYC の発現ベクターを同時に WT に導入し、形質転換体の選択を行った。続いて、これらの形質転換体からそれぞれミトコンドリアを単離し、ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み活性を測定した (Fig.2-4)。その結果、空ベクターを導入した WT から単離したミトコンドリアでは Ca^{2+} の添加に伴い Ca^{2+} 指示薬の蛍光強度の上昇は観察されたものの、ミトコンドリア内に Ca^{2+} が取り込まれたことによる蛍光強度の減少は観察されなかった。一方、mMCU と mEMRE-MYC を発現した変異体から単離したミトコンドリアは Ca^{2+} の添加に伴い Ca^{2+} 指示薬の蛍光強度の上昇が観察された後、ミトコンドリア内に Ca^{2+} が取り込まれたことによる蛍光強度の減少が観察された。このことから、酵母に Ca^{2+} ユニポーターが機能的に発現していることが示唆された。

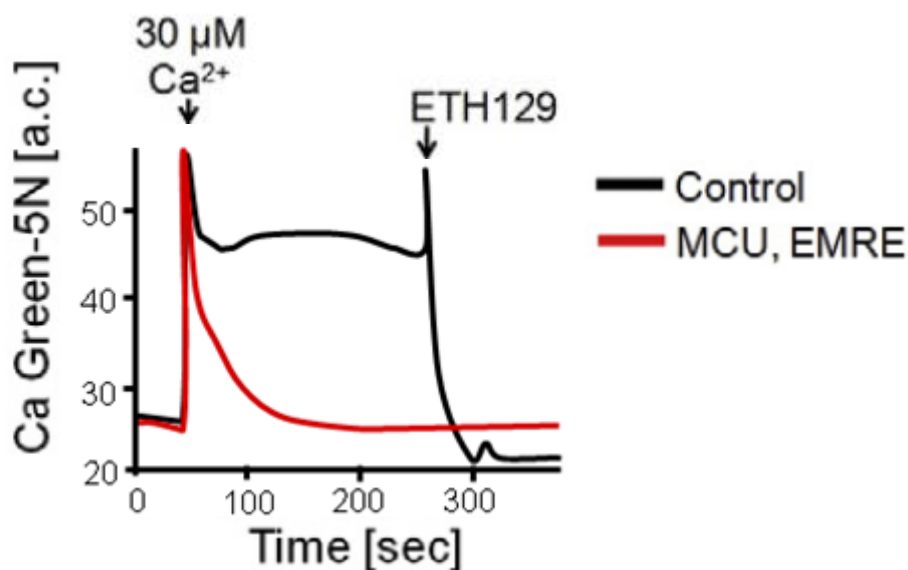


Fig.2-4 mMCU と mEMRE を発現させた酵母ミトコンドリアの Ca^{2+} の取り込み

mMCU 及び mEMRE を発現させたことによるミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み活性の変化を観察した。空ベクターを導入した酵母から単離したミトコンドリア (Control) もしくは、コドン最適化した mMCU 発現ベクターと mEMRE-MYC 発現ベクターを同時に形質転換した酵母から単離したミトコンドリア (MCU, EMRE) 140 μg を活性測定メディウムに懸濁し、30 μM になるよう Ca^{2+} を添加した後の Ca^{2+} 取り込み活性を測定した。詳細な実験手順は、2-4-8 に示す。

2-3 考察

近年、ミトコンドリアに Ca^{2+} を取り込む分子である Ca^{2+} ユニポーターの分子実体が明らかとなってきたが、構成タンパク質について十分な機能の解析は行われていない。この一因として、構成タンパク質が複雑に相互作用しているため、哺乳細胞を用いた系では、MCU や EMRE の機能を評価することが困難なことが挙げられる。この問題点を解決できる発現系として内在性の Ca^{2+} ユニポーターが存在しない出芽酵母を用いた発現系が有効であると考えられる。そこで、本研究では、ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みに最低限必要な構成タンパク質である MCU と EMRE の酵母発現系の構築を試みた。

まず、 Ca^{2+} ユニポーターの構成タンパク質である mMCU と mEMRE を酵母に機能的に発現させることを試みた結果、mEMRE は酵母に発現させることができたが、mMCU は発現させることができなかった (Fig.2-1)。一般的に、GC 含量が高い領域や酵母で使用頻度が低いコドンであるレアコドンが豊富に存在する領域が存在する配列は酵母への発現を妨げることが知られている。そこで、mMCU にこのような領域が存在するか確認したところ、mMCU をコードする遺伝子の 5' 側 100 bp の領域が GC 含量が高くかつレアコドンが豊富に存在する領域であった (Fig.2-2)。そこで、この領域を出芽酵母に最適化した mMCU をコードする遺伝子を作製し、発現ベクターに組み込んだ。この発現ベクターを用いて酵母への発現を試みた結果、酵母に対して最適化した mMCU の発現ベクターを用いることによって酵母において mMCU を発現させることに成功した (Fig.2-1)。続いて、それぞれ単独で発現させた mMCU と mEMRE を共発現させることが可能か検討した。その結果、共発現させた場合でも単独で発現させた場合と同程度の発現量で mMCU と mEMRE を酵母に発現させることに成功した (Fig.2-3)。そこで、mMCU と mEMRE を共発現させた酵母ミトコンドリアが Ca^{2+} 取り込み能を獲得するかどうかを検討した (Fig.2-4)。その結果、mMCU と mEMRE を共発現させた酵母ミトコンドリアでは Ca^{2+} の取り込みが観察された。

本研究によって、mMCU と mEMRE を酵母において機能的に発現させることに成功した。また、mMCU を酵母に発現させる際には mMCU をコードする遺伝子のコドンを酵母に対して最適化することが極めて重要であることを明らかとした。コドンは、生物種によって大きく異なることが知られており [9]、一般的にその生物種で使用頻度が低いコドンはレアコドンと呼ばれる。このレアコドンは、異種生物のタンパク質を発現させた際に発現量を低下させる一因となることが知られており、これまでもコドンを最適化することによって発現量を増加させた例が報告されている [10]。このコドンの最適化によって発現量が上昇する理由についてはいくつかの仮説が考えられている。まず、一つ目の仮説は、レアコドンに対しては対応する tRNA の量が少なく、それによって翻訳速度が低下するという仮説である [11]。二つ目の仮説は使用頻度が高いコドンが多いほど mRNA の安定性が上昇し、それが発現量に寄与しているという仮説である [12]。また、出芽酵母においては、レアコドンは GC 含量が多い塩基配列であるため、コドンの最適化によって GC 含量も低下する。そのため、コドンの最適化ではなく塩基配列の GC 含量が発現量を低下させる要因になっている可能性も考えられる。このように、コドンの最適化によって発現量が上昇する理由については

明確にはなっておらず、今回の解析においても発現量が増加した詳細なメカニズムは不明である。また、今回の解析ではmMCUをコードしている遺伝子の一部の領域のコドンのみを最適化しており、mMCU をコードしている遺伝子の全長においてはレアコドンが存在した状態である。このことは、レアコドンはその量だけではなく、存在する位置や密集度がタンパク質の発現に影響を与えている可能性を示唆している。今後、この点についてさらに理解が進めば様々なタンパク質について遺伝子をコードする全長の最適化ではなく、発現に影響を与える一部の領域のみの最適化で発現量を増加させることが可能であり、酵母への異種生物のタンパク質の発現をより効率的に行えると考えられる。

また、今回構築した発現系はMCUとEMREの機能解析に極めて有効であると考えられる。実際、この解析系を用いてEMREの詳細な解析が行われており、その解析ではEMREはMCUが形成する孔にとって構造的に重要な役割を担っていることが考察されている[13]。また、この系はMCUとEMRE以外の構成タンパク質に対しても有用であると考えられている。これらの構成タンパク質についてもMCUとEMREと同様に他のタンパク質との相互作用の影響が考えられる。そのため、今回構築したMCUとEMREの発現系に解析したい構成タンパク質をさらに発現させることによって有効に解析が行えると考えられる。この系は、特に機能について相反する報告がなされているMICU1[14,15]についての解析に有効であると考えられ、今後Ca²⁺ユニポーターの各構成タンパク質についてさらに解析を行っていく予定である。

2-4 実験方法

2-4-1 試薬

Zymolyase 20T: 生化学工業

X線フィルム: FUJI FILM

Bacto-Ager: Difco Laboratories

Yeast nitrogen base w/o amino acid: Difco Laboratories

Nitrocellulose filter: Schleicher and Schuel

Calcium Green-5N: Molecular Probes

ETH129: SIGMA

Anti-FLAG antibody (codeF7425-2MG): SIGMA

Anti-MYC antibody (code 2276S): SIGMA

Anti-mouse IgG HRP conjugated(A9044): SIGMA

制限酵素、修飾酵素: 宝酒造(株)、ニッポンジーン、TOYOBO

その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2-4-2 mMCU 及び mEMRE の酵母発現用ベクターの構築

mMCU, mEMRE をコードする cDNA は、Table2-1 に示したプライマーを用いて Table2-2 に示した条件によって PCR で増幅した。その後、得られた cDNA を pUC19 δ T に組み込み、塩基配列に変異がないことを確認した。その後、その cDNA を MCU については pYO326-TDH3p[15]、もしくは pYO326-TDH3p-FLAG に、EMRE については pYO326-TDH3p-FLAG、もしくは pYO326(LEU2)-TDH3p-MYC にサブクローニングした。

Table2-1 mMCU 及び mEMRE をコードする遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列

Primer name	Nucleotide sequence
GE2351	5'- GGGATTCACGGTCATCTCGGATCCTTCC
GE2356	5'- CAGCGCCGTTTCCAGTTGACATATG
GE3007	5'- AGGGGCGGAGCTGCATATGGCGTCC
GE3092	5'- GACCGGATCCATCGTCGTCGTCGTC

Table2-2 mMCU 及び mEMRE をコードする遺伝子の PCR の増幅条件

Gene	Accetion number	D primer	U primer	Template
mouse MCU	NM_001033259.4	GE2356	GE2351	mouse skeletal muscle cDNA
mouse EMRE	NM_026914.1	GE3007	GE3092	mouse skeletal muscle cDNA

D と U はそれぞれ下流(downstream)と上流(upstream)方向のプライマーとして用いたことを示す。

2-4-3 最適化した mMCU の酵母発現ベクターの構築

初めに、mMCU をコードする遺伝子の 5' 側 102 bp の塩基配列を Liらの論文をもとに[9]、最も酵母で使用頻度が高い塩基配列にコドンを変更した塩基配列を設計した。次に mMCU をコードする cDNA を組み込んだ酵母発現ベクターを *Nde*I、*Xba*I で消化し、mMCU をコードする遺伝子の 5' 側 102 bp を取り除いた。続いて、この領域に酵母に対してコドンを最適化するように設計した mMCU をコードする遺伝子の 5' 側 102 bp を overlap-extension PCR[10]によって作製し、組み込んだ。

2-4-4 酵母の培養条件

出芽酵母は W303-1B (*MAT α* , *ade2-1*, *his3-11,15*, *leu2-3112*, *trp1-1*, *ura3-1*, *can1-100*) を使用した[16]。この酵母株を、YP 培地(1% yeast extract, 2% polypeptone)に炭素源として 2% glucose、2% galactose もしくは 3% glycerol を添加した培地を用いて 30°C 定温条件下にて振とう培養した。また、変異株の選択には SD 培地(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 2% glucose)に必要な栄養源を所定濃度[17]添加したものをを用いた。これらを寒天培地として使用する際には、2% Bacto-Ager (Difco Laboratories) を添加して、液体培地を固形化した。

2-4-5 酵母の形質転換

酢酸リチウム法により形質転換を行った[18]。まず、酵母細胞を 2% glucose を含む YP 培地を用いて 30°C 定温条件下で OD₆₀₀ が 0.3-0.5 になるまで培養した後、遠心することにより集菌した。続いて、この酵母細胞を TE 溶液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)により洗浄後、酢酸リチウム溶液(0.1 M 酢酸リチウム、10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)に懸濁し、30°C 定温条件下で 1 時間インキュベートすることによりコンピテントセルを作製した。このコンピテントセルと形質転換する DNA 溶液を含む溶液(0.1 M 酢酸リチウム、4 mg/ml salmon testis DNA)と PEG 溶液(40% PEG 4000, 0.1 M 酢酸リチウム、10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)を混合し、1 分間ボルテックスを行った。続いて、この混合液を 30°C 定温条件下で 30 分インキュベートした後、42°C 定温条件下で 15 分熱処理を行った。この酵母細胞を TE 溶液で洗浄後、選択培地に塗布し 2 日間培養後、形質転換体を取得した。

2-4-6 酵母ミトコンドリアの調製

酵母ミトコンドリアは2% galactoseを含むYP培地を用いて30°C定温条件下でOD₆₀₀が2.0付近になるまで培養した酵母細胞から単離した[19]。まず、培養した酵母細胞液を遠心することにより集菌した。この酵母細胞を2回水で洗浄した後、10 mM DTTを含む0.1 M Tris-SO₄ (pH 8.0)に懸濁し、30 °C定温条件下100 rpmで15分インキュベートした。その後、この懸濁液を遠心し、集菌した後、再び水で洗浄した。この酵母細胞液を菌体量1 gに対して11.39 mgのZymolyase 20T を含むKPiメ ディウム(1.2 M sorbitol、20 mM NaPi、2 mM EDTA pH 7.4)に懸濁し30 °C定温条件下100 rpmで15分インキュベートすることによってスフェロプラスト化した。次に、これをKPiメ ディウムで2回洗浄した後、ミトコンドリア単離液(10 mM Tris-HCl、0.6 M mannitol、0.1% BSA、2 mM EDTA pH 7.4)に懸濁し、1150 rpmで7ストロークホモジナイズすることにより酵母細胞を破碎した。続いて、この破碎液を2500 rpmで5分遠心を2回行い、この上清画分をさらに7500 rpm、10分遠心した。最後に得られた沈殿をミトコンドリア単離液に懸濁することでミトコンドリア画分を得た。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準物質として、BCA protein assay kitを用いて決定した。

2-4-7 Western blotting

Western blotting は常法に準じて行った[18]。まず、10.0%、もしくは 20% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った[20]。SDS-PAGE 終了後のゲル中のタンパク質を NCF にセミドライ式 blotting 装置(BIO CRAFT)を用いて転写した。転写後、1%もしくは 3% スキムミルクを含む TS 溶液(150 mM NaCl、0.05% Tween20、20 mM NaPi pH7.4)中で、NCF を室温条件下で 1 時間振とうすることによって、NCF 上のタンパク質非吸着部分をブロッキングした。続いて、この NCF をスキムミルク及び 10000 倍に希釈した anti FLAG 抗体、もしくは anti PORIN I 抗体、5000 倍に希釈した anti MCU 抗体、3000 倍に希釈した anti MYC 抗体を含む TS 溶液中に移し、室温条件下で 1 時間振とうした。続いて、NCF を TS 溶液で洗浄し、anti FLAG 抗体、もしくは anti PORIN 1 抗体を用いた場合は 10000 倍、anti MCU 抗体を用いた場合は 5000 倍に希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギ IgG 抗体を、anti MYC 抗体を用いた場合は 3000 倍に希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギ IgG 抗体を含む TS 溶液中に移し、室温条件下で 1 時間振とうした。NCF を TS で洗浄後、ECL(Enhanced chemiluminescence)kit にてペルオキシダーゼ活性により生じた化学発光を X 線フィルムに感光させることで、それぞれのタンパク質を検出した。

2-4-8 ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みの測定

ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みの測定は Yamamoto らの方法に準じて行った[13]。まず、25°C に温めた 1 ml の incubation メディウム(0.3 M マンニトール、0.5 mg/ml BSA、10 mM KPi)に Ca^{2+} 指示薬として 1 μM になるよう Calcium Green-5N を添加した。その後、呼吸基質として 2 mM になるよう NADH を添加し、0.14 mg/ml になるよう単離したミトコンドリアを懸濁した。この懸濁液中の Ca^{2+} を蛍光光度計日立 F-2700(励起波長=506 nm, 蛍光波長=532 nm)で測定した。また、ポジティブコントロールには 10 μM ETH129 を用いた。

2-4-9 特異抗体の調製

MCU に特異的な配列のペプチド(KYNQLKDAIAQAEMDLKRLRC)をペプチド自動合成装置 PSSM-8(Shimadzu)により合成した。合成したペプチドに KLH(pierce, code 77606)を結合させ免疫原性を高めた後、Freund adjuvant と乳化させ、ウサギ背面部に皮下注射した。さらに追加免疫を施した後、ウサギの頸動脈から全血採血を行い、抗血清を得た。この得られた血清を特異抗体として用いた。

2-5 参考文献

1. D. De Stefani, A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476 (2011)336-340.
2. J.M. Baughman, Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476 (2011)341-345.
3. F. Perocchi, MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake, *Nature* 467(2010)291–296.
4. M. Plovanich, MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling, *PLoS One* 8 (2013)e55785.
5. Y. Sancak, EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex, *Science* 342 (2013)1379-1382.
6. A. Raffaello, The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit, *EMBO J.* 32 (2013)2362-2376.
7. Carafoli E, A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. *Biochem J.* 122(5) (1971)681-690.
8. R. Higuchi, A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 7351-7367.
9. Li H, The relation between codon usage, base correlation and gene expression level in *Escherichia coli* and yeast. *J Theor Biol.* 181(2) (1996)111-124.
10. Cormack BP, Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology.* 143(Pt 2) (1997)303-311.
11. Roche ED SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *EMBO J.* 18(16) (1998)4579-4589.
12. Presnyak V, Codon optimality is a major determinant of mRNA stability, *Cell.* 160(6) (2015)1111-1124.
13. Yamamoto T, Analysis of the structure and function of EMRE in a yeast expression system. *Biochim Biophys Acta.* 1857(6) (2016)831-839.
14. Mallilankaraman K, MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cell survival, *Cell.* 151(3) (2012)630-644.
15. Patron M, MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity, *Mol Cell.* 53(5) (2014)726-737.

16. M. Hashimoto, Expression of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria: significantly enhanced expression by replacement of the N-terminal region of the bovine carrier by the corresponding regions of the yeast carriers, *Biochim. Biophys. Acta* 1409 (1999)113-124.
17. Terco,D.A, *Current Protocol in Molecular Biology*(Ausubel,F.M> rt al. Eds), *John Wiley & Sons, Inc., New York, Chapt. 13* (1993)1
18. Ito H, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 153(1) (1983)163-168
19. Yamashita, M, Ca²⁺-induced permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009)1486-1491.
20. Laemmli UK, Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol.* 49(1) (1970)99-113.

第3章 出芽酵母のミトコンドリアにおける哺乳類のリン酸キャリアーの機能的発現

3-1 緒言

ミトコンドリアは、主として ATP の合成を担う細胞内小器官であり、内膜と外膜からなる二重膜構造を有している。外膜は、電位依存性アニオンチャンネルを介して分子量 6000 以下の物質を非選択的に透過させるが、内膜の物質透過性は極めて低く保たれており、ほとんどのイオンや低分子に対して非透過性である。そのため、ミトコンドリア内膜における溶質輸送の大部分は、内膜上に存在するミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーによって担われている[1-5]。このファミリーに属するほとんどのタンパク質は酵母と哺乳類で保存されている。また、酵母のゲノムの遺伝子改変は哺乳類よりも簡便に行えるため酵母は哺乳類の溶質輸送担体の構造及び機能的解析に極めて有効である。しかしながら、哺乳類のミトコンドリア輸送担体を酵母に機能的に発現させることができるかについては未だ十分な解析は行われていない。

ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーに属する ADP/ATP carrier の場合は、そのタンパク質をコードする遺伝子を欠損した酵母株は、ミトコンドリアの ATP 合成にこの輸送体が必須であることから非発酵性炭素源培地で生育できなくなる。また、この ADP/ATP carrier 欠損株にウシの ADP/ATP carrier の発現ベクターを導入しても機能的に発現しない[6,7]。この原因として、出芽酵母の ADP/ATP carrier はウシの ADP/ATP carrier と比較して N 末端側のアミノ酸残基が長いことが知られており、我々の研究室では過去にウシの ADP/ATP carrier の N 末端側をこの酵母の長い N 末端と入れ替えることによって酵母において機能的に発現させることに成功している。そのため、この発現系を用いてこの発現系を用いて哺乳類の ADP/ATP carrier についてその機能の解析は進んでいるが、他のミトコンドリア溶質担体についてはほとんど解析が進んでいない。

ミトコンドリア溶質輸送担体に共通する輸送様式を理解するためには ADP/ATP carrier 以外のミトコンドリア溶質輸送担体に属するタンパク質をモデルタンパク質として機能解析を行うことが有効である。このモデルタンパク質として PiC は極めて有用なモデルとなると考えられる。PiC は、ATP 合成の基質となるリン酸を H^+ と共に選択的にミトコンドリアマトリクス内に輸送する酸化的リン酸化に必須のタンパク質として知られており[8]、輸送する溶質が明確になっているタンパク質である。また、この PiC は哺乳類においては 2 種類のスプライズバリエント PiC-A と PiC-B が存在することが知られており[9-11]、PiC-A については先天的な遺伝子変異が筋異常を引き起こすことが知られており生理的にも重要なタンパク質として知られている。しかしながら、哺乳類細胞を用いた解析系では PiC が酸化的リン酸化に必須であるため欠損体の構築が難しいため解析があまり進んでいない。出芽酵母はミトコンドリアの呼吸能が欠損し非発酵性炭素源培地で生育不可能な酵母株も、発酵性炭素源培地で生育可能であり[12]、PiC の欠損体についても同様に発酵性炭素源培地を用いることによって樹立できることが知られている[13]。そのため、PiC を欠損した酵母(Δ PiC)を用いて哺乳類の PiC の発現系を構築することによって内在性の PiC の活性を考慮せずに哺乳類の PiC の機能解析が可能な発現系を構築できると考えられる。そこで、PiC を欠損し

た酵母に哺乳類の PIC を機能的に発現させるため解析を行った。

3-2 結果

3-2-1 PiC を欠損した酵母株の樹立

初めに、末端に酵母の PiC と相同領域を持つ *HIS3* の遺伝子断片を用いた相同組み換えによって WT から、 Δ PiC の樹立を試みた。

まず、酵母の PiC(yPiC)をコードする遺伝子を破壊するためのターゲット DNA を作製するため、ヒスチジンを合成するタンパク質の遺伝子である *HIS3* の DNA 断片の末端に yPiC と相同性のある領域を PCR によって付加した。次に、この DNA 断片を用いて WT の形質転換を行い、ヒスチジン欠損培地にて形質転換体の選択を行った。相同組み換えによってゲノム上の PiC をコードする遺伝子が *HIS3* の DNA 断片によって破壊された株のみが得られてくる。続いて、得られた変異株で実際に PiC をコードする遺伝子が破壊されているか生育レベルを評価することによって確認した。樹立した株の生育を確認した結果(Fig.3-1)、グルコースなどの発酵性炭素源培地で生育し、グリセロールなどの非発酵性炭素源培地では生育しなかった。この株に対してシングルコピー型の酵母発現用ベクターである pRS314 もしくはマルチコピー型の酵母発現ベクターである pYO326 に yPiC をコードする遺伝子を組み込んで導入したところ、非発酵性炭素源培地での生育を回復した。これはこれまでに報告されている Δ PiC の表現型と一致していることから、 Δ PiC が樹立できていることが示唆された。

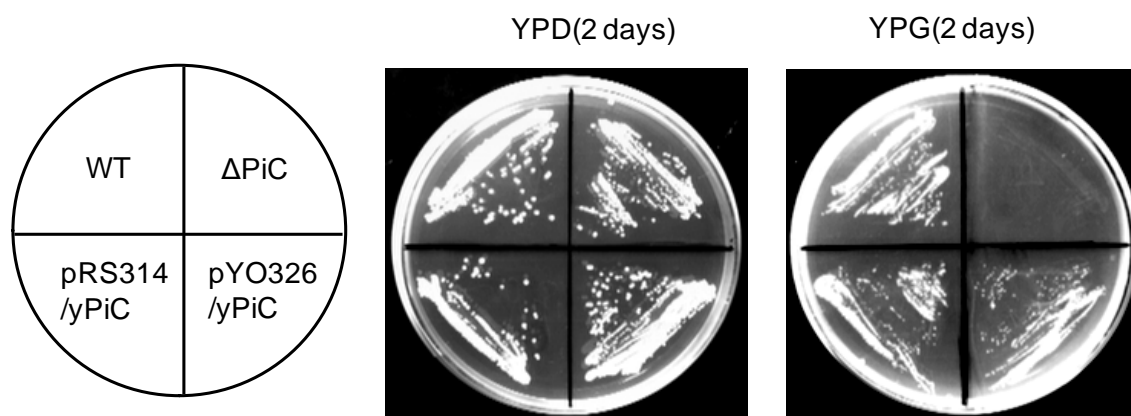


Fig.3-1 樹立した Δ PiC の生育レベルの確認

樹立した Δ PiC の生育レベルを確認した結果を示す。選択培地で前培養した酵母培養液を 2% グルコースを含む富栄養培地(YPD)または 3% グリセロールを含む富栄養培地(YPG)に塗布し、30°C定温条件下で 2 日間培養した結果を示す。なお、WT、 Δ PiC は WT の PiC 遺伝子を破壊した株、pRS314/yPiC は pRS314-yA2P/yPiC を用いて形質転換した Δ PiC、pYO326/yPiC は pYO326-yA2P/yPiC を用いて形質転換した Δ PiC をそれぞれ表す。

続いて、 Δ PiC が樹立できているかどうかをタンパク質レベルで確認した。まず、Western blotting によって WT 及び樹立した株の yPiC の発現量を確認した(Fig.3-2)。その結果、WT では検出された yPiC のバンドが樹立した株においては検出されなかった。これらのことから、遺伝子レベル及びタンパク質レベルにおいて Δ PiC が樹立できていることが確認された。

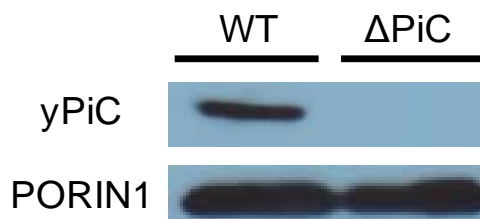


Fig.3-2 樹立した Δ PiC における yPiC の発現レベルの比較

yPiC に対する特異抗体を用いて Western blotting を行い、yPiC の発現レベルを確認した。また、コントロールとしてミトコンドリアに局在するタンパク質である Porin1 の抗体を用いた Western blotting も同時に行った。解析には野生型酵母から単離したミトコンドリア、 Δ PiC から単離したミトコンドリアを yPiC に対する特異抗体を用いた場合には 20 μ g、PORIN 1 に対する特異抗体を用いた場合には 5 μ g 分のタンパク質量になるようを用いた。

そこで、全長の rPiC に加えてプレ配列を欠損させた rPiC(Δ NrPiC)の酵母発現ベクターを Δ PiC に導入し、形質転換体の選択を行った。続いて、得られた形質転換体の生育を評価した(Fig.3-4)。その結果、全長及びプレ配列を欠損させた rPiC のいずれの酵母発現ベクターを導入した Δ PiC もグリセロール培地上において生育レベルは回復しなかった。このことから、この条件下では rPiC は Δ PiC に機能的に発現しないことが明らかとなった。

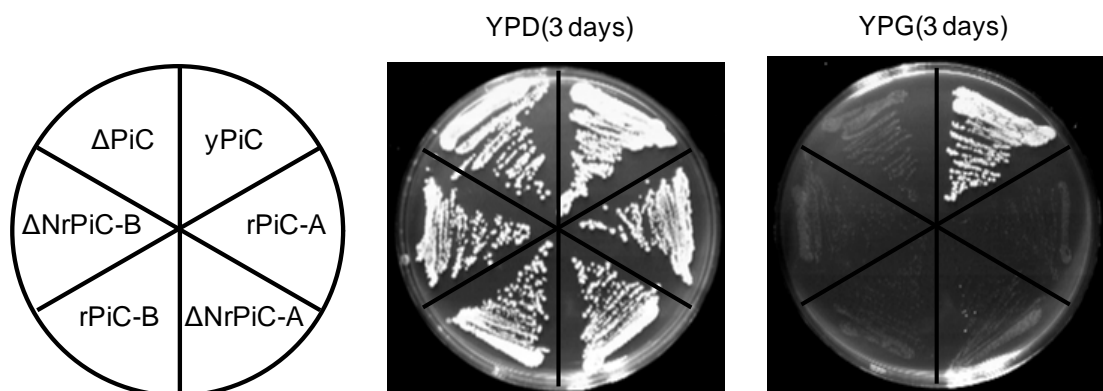


Fig.3-4 rPiC の発現ベクターを導入した Δ PiC の生育レベル

rPiC の発現ベクターを導入したことによる Δ PiC の生育レベルの変化を観察した。選択培地で前培養した酵母培養液を 2% グルコースを含む富栄養培地(YPD)または 3% グリセロールを含む富栄養培地(YPG)に塗布し、30°C定温条件下で3日間培養した結果を示す。なお、 Δ PiC は PiC 欠損株を、yPiC、rPiC-A、 Δ NrPiC-A、rPiC-B、 Δ NrPiC-B はそれぞれの発現ベクターを用いて形質転換した Δ PiC をそれぞれ表す。

3-2-3 Δ NrPiC の酵母における発現レベルの確認

ここまでの解析ではプレ配列を欠損させても rPiC を酵母において機能的に発現させることができなかった。この原因を明らかにするため、この条件下において rPiC は発現していないのか、発現しているが機能していないのか確認を行った。

まず、rPiC 及び Δ NrPiC をコードする遺伝子を C 末端側に FLAG タグを融合させた状態で発現させられるベクターである pYO326-yA2P-FLAG に組み込んだ。続いて、この発現ベクターを Δ PiC に導入し、この形質転換体からミトコンドリアを単離し、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting によって発現レベルを確認した(Fig.3-5)。その結果、全長の rPiC についてはわずかにしか発現していなかったものの、プレ配列を欠損させたものについては yPiC とほぼ同程度まで発現していた。このことは、rPiC はプレ配列の欠損によって酵母において発現するが、機能を有していないことを示唆している。

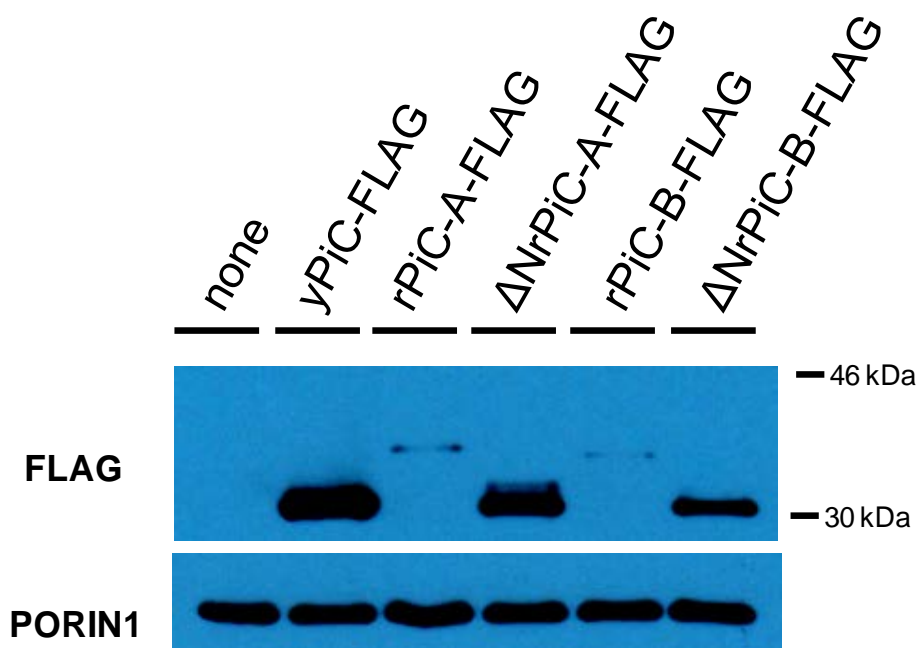


Fig.3-5 Δ PiC に発現させた rPiC の発現レベル

FLAG に対する特異抗体を用いて Western blotting を行い、rPiC の発現レベルの確認を行った。また、コントロールとしてミトコンドリアに局在するタンパク質である Porin1(PORIN1)の抗体を用いた Western blotting も同時に行った。解析には Δ PiC(none)及び yPiC-FLAG、rPiC-A-FLAG、 Δ NrPiC-A-FLAG、rPiC-B-FLAG、 Δ NrPiC-B-FLAG の発現ベクターを用いて形質転換した Δ PiC から単離したミトコンドリアを FLAG に対する特異抗体を用いた場合には 20 μ g、PORIN 1 に対する特異抗体を用いた場合には 5 μ g 分のタンパク質量になるよう用いた。

3-2-4 酵母において機能的に発現する rPiC 変異体の探索

ここまでの解析によって Δ PiC において発現させた rPiC は発現しているにも関わらず機能を有していないことが示唆された。そこで、酵母において機能的に発現する rPiC を得るために Δ NrPiC にランダムに変異を導入し、 Δ PiC の生育を回復する変異体を得ることを試みた。

今回は酵母において機能的に発現する rPiC 変異体を探索する手法として PCR-based random mutation と gap-repair cloning[18]を組み合わせた手法を用いた。まず、 Δ NrPiC をコードする遺伝子断片を比較的変異を起こしやすい酵素として知られている Taq DNA polymerase を用いて PCR によって増幅した。これによって様々な位置に変異が導入された Δ NrPiC をコードする遺伝子が得られ、これを線状にした pYO326-yA2P/ Δ NrPiC と同時に Δ PiC に導入し、形質転換体を最小グリセロール培地に塗布した。通常の Δ NrPiC はこの培地上で生育できないため、変異が導入され機能的に発現する Δ NrPiC を有したコロニーのみが得られる。その結果、二つのコロニーが得られ、これらのコロニーに発現している Δ NrPiC の変異の位置を確認したところそれぞれ F267S と F282S に変異が導入されていた(Fig.3-6)。

```

yPiC      1:-----MSVSAAPAIPQYVSDYM 18
rPiC-A   1:MFSSVAHLARANPFNAPHLQLVHDVSGPSPGGPPRRSRHLAAAAVEEQYSCEYSGRFF 60
rPiC-B   1:MFSSVAHLARANPFNAPHLQLVHDVSGPSPGGPPRRSRHLAAAAVEE-YSCFEGSMKY 59
          .....

yPiC     19:KF-ALAGAIGCGSTHSSMVPIDVVKTRIQLEPTVYNKGMVGSFKQIIAGEGAGALLTGF 77
rPiC-A   61:ILCGLGGIISCGTHTALVPLDLVKCRMQVDPQKY-KGIFNGFSITLKEDEGVRGLAKGWA 119
rPiC-B   60:ALCGFGGVLSCLGHTHTAVVPLDLVKCRMQVDPQKY-KGIFNGFSITLKEDEGVRGLAKGWA 118
          .....*.....

yPiC     78:PTLLGYSIQGAFKFGGYEVFKKFIDNLGYDTASRYKNSVYMGSAAAEFLADIALCPLE 137
rPiC-A  120:PTLLIGYSMQGLCKFGFYEVFKALYSNILGEENTYLWRTSLYLAAASASAEFADIALAPME 179
rPiC-B  119:PTLLIGYSMQGLCKFGFYEVFKALYSNILGEENTYLWRTSLYLAAASASAEFADIALAPME 178
          ***.....

yPiC    138:ATRIRLVSPQFANGLVGGFSRI LKE EGI GSFYSGFTP ILFKQI PYNIAKFLVFERASEF 197
rPiC-A  180:AAKVR IQTQPGYANTLR EAVPKMYKE EGLNAFYKGVAPLWMRQI PYTMMK FACFERTVEA 239
rPiC-B  179:AAKVR IQTQPGYANTLR EAVPKMYKE EGLNAFYKGVAPLWMRQI PYTMMK FACFERTVEA 238
          *.....

yPiC    198:YYGFAGPK EKLSSTSTT--LNLNLSGLTAGLAAAI VSQPADTLLSKVNKT KKA PGQSTVG 255
rPiC-A  240:LYKFVVPK PRSECTKAEQLVVTFVAGYIAGVF CAI VSHPADSVVSVLNKEK--GSTASQ 296
rPiC-B  239:LYKFVVPK PRSECTKAEQLVVTFVAGYIAGVF CAI VSHPADSVVSVLNKEK--GSTASQ 295
          *.....

yPiC    256:LLAQLAKQLGF FGSFAGLPTRLVMVGTLTSLQFGI YGSLKSTLGCPTTIE IGGGGH---- 311
rPiC-A  297:VL----QRLGFRGVWKG L FARIIMIGTLTALQWFI YDSVKVYFR LPRPPPPEMPESLKKK 352
rPiC-B  296:VL----QRLGFRGVWKG L FARIIMIGTLTALQWFI YDSVKVYFR LPRPPPPEMPESLKKK 351
          *.....

yPiC    311:----- 311
rPiC-A  353:LGLTE 357
rPiC-B  352:LGLTE 356
          .....

```

Fig.3-6 機能的に発現する Δ NrPiC に導入されていた変異の位置

酵母 PiC 及びラット PiC の 2 種類のプライスバリエントのアミノ酸配列上に、今回の解析で見出した変異の位置を示した。yPiC、rPiC-A、rPiC-B はそれぞれ酵母 PiC 及びラットの PiC の 2 つのプライスバリエントのアミノ酸配列を表し、*部分は、アミノ酸配列が保存された領域を示す。また、下線部分は推定膜貫通領域を表し、赤四角の部分は今回変異が導入されていた位置を表す。

続いて、これらの変異が本当に Δ NrPiC を機能的に発現させるかを確認するため、これらの変異体が導入された Δ NrPiC の発現ベクターを構築し、この発現ベクターを Δ PiC に改めて導入して生育を確認した(Fig.3-7)。その結果、変異を導入していない Δ NrPiC を発現した Δ PiC はグリセロール培地上で生育しないのに対し、 Δ NrPiC に F267S と F282S の変異を導入した変異体を発現させることによって顕著に生育が回復した。このことから、F267S と F282S の変異を導入することによって Δ NrPiC を酵母に機能的に発現させられることが示唆された。

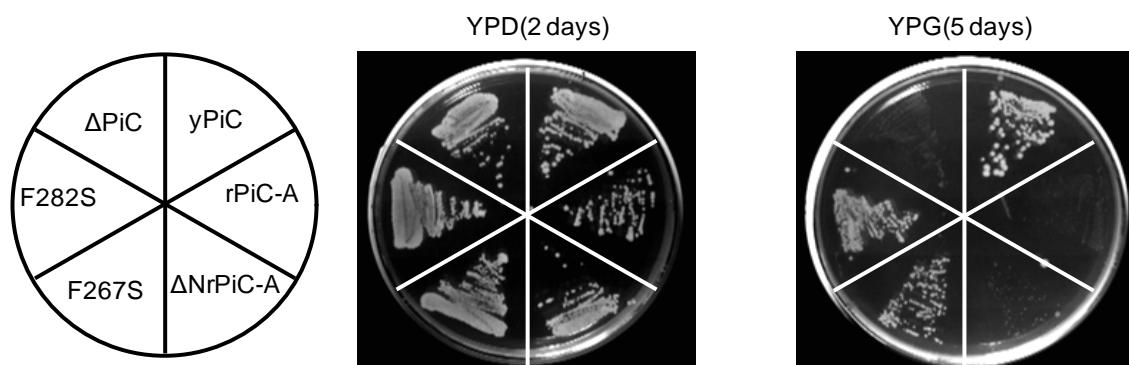


Fig.3-7 変異が導入された Δ NrPiC の発現による Δ PiC の生育レベルの変化

変異が導入された Δ NrPiC の発現ベクターを導入したことによる Δ PiC の生育レベルの変化を観察した。選択培地で前培養した酵母培養液を 2% グルコースを含む富栄養培地(YPD)または 3% グリセロールを含む富栄養培地(YPG)に塗布し、30°C定温条件下で 2 日もしくは 5 日間培養した結果を示す。なお、 Δ PiC は PiC 欠損株を、yPiC, rPiC-A, Δ NrPiC-A はそれぞれの発現ベクター、F267S, F282S はそれぞれの変異を導入した Δ NrPiC-A の発現ベクターを用いて形質転換した Δ PiC をそれぞれ表す。

3-2-5 酵母において機能的に発現する Δ NrPiC 変異体の性質

ここまでの解析によって Δ NrPiC を酵母において機能的に発現させられる二つの変異 F267S、F282S を同定した。続いて、この二つの変異を導入することによって Δ NrPiC は発現量が上昇しているのか、機能が亢進しているのかを検討した。

まず、F267S、F282S の変異が Δ NrPiC の発現量を変化させるか検討した。それぞれの変異体をコードする遺伝子を C 末端側に FLAG タグを融合させた状態で発現できるベクターである pYO326-yA2P-FLAG に組み込んだ。続いて、この発現ベクターを Δ PiC に導入し、形質転換体を選択した。得られた変異体からミトコンドリアを単離し、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting によって変異の導入による発現レベルの変化を確認した(Fig.3-8)。その結果、F267S、F282S の変異の導入によって Δ NrPiC の発現レベルは変化していなかった。

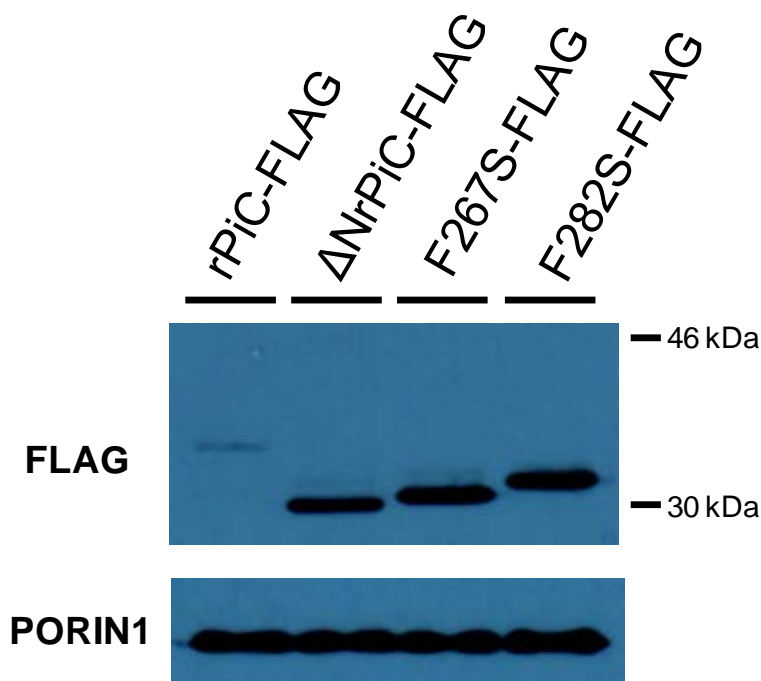


Fig.3-8 Δ PiC における変異の導入による Δ NrPiC の発現量の変化

FLAG に対する特異抗体を用いて Western blotting を行い、変異の導入による Δ NrPiC の発現レベルの変化を確認した。また、コントロールとしてミトコンドリアに局在するタンパク質である Porin1(PORIN1)の抗体を用いた Western blotting も同時に行った。解析には rPiC-FLAG、 Δ NrPiC-FLAG はそれぞれの発現ベクター、F267S-FLAG、F282S-FLAG はそれぞれの変異を導入した Δ NrPiC-FLAG の発現ベクターを用いて形質転換した Δ PiC からそれぞれ単離したミトコンドリアを FLAG に対する特異抗体を用いた場合には 20 μ g、PORIN 1 に対する特異抗体を用いた場合には 5 μ g 分のタンパク質量になるよう用いた。

続いて、F267S、F282S の変異の導入によって生育速度がどの程度回復するかを検討するため rPiC 及びその変異体を発現した酵母を段階的に希釈した後、グリセロール培地上にスポットし、生育速度の比較を行った(Fig.3-9)。その結果、yPiC と比較して F267S、F282S の変異が導入された Δ NrPiC を発現した酵母の生育速度は少し遅かった。また、F282S の変異が導入された変異体の生育速度は F267S の変異を導入した変異体の生育速度よりも早かった。このことから、yPiC > F282S 変異体 > F267S 変異体の順で活性が強いことが示唆された。また、このことから今回見出した変異は発現レベルではなく Δ NrPiC の機能に影響を与えており、それぞれの変異により機能の亢進の程度は異なることが示唆された。

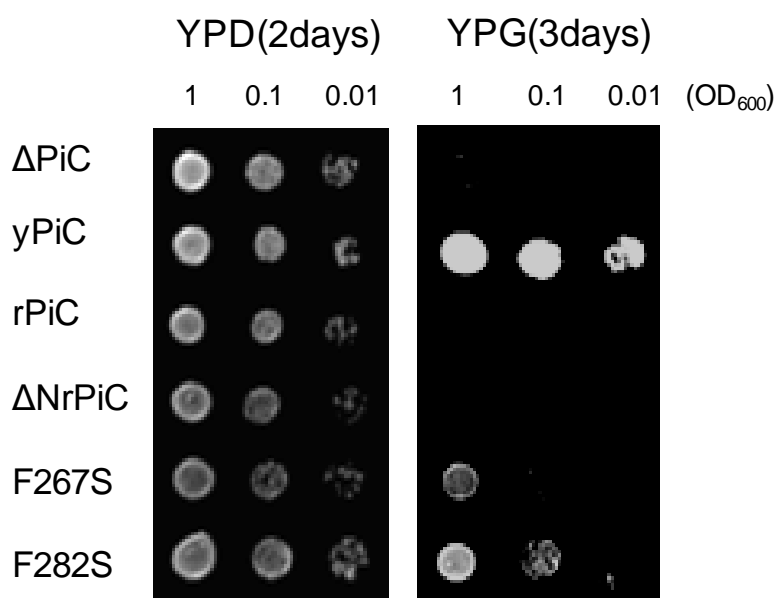


Fig.3-9 変異を導入した Δ NrPiC を発現した Δ PiC の生育速度の詳細な比較

変異が導入された Δ NrPiC の発現ベクターを導入したことによる Δ PiC の生育レベルの速度を詳細に比較した。選択培地で前培養した酵母培養液を 2% グルコースを含む富栄養培地(YPD)または 3% グリセロールを含む富栄養培地(YPG)に塗布し、30°C 定温条件下で 2 日もしくは 3 日間培養した結果を示す。なお、 Δ PiC は PiC 欠損株を、yPiC、rPiC、 Δ NrPiC はそれぞれの発現ベクター、F267S、F282S はそれぞれの変異を導入した Δ NrPiC の発現ベクターを用いて形質転換した Δ PiC をそれぞれ表す。

3-2-6 酵母において機能的に発現する Δ NrPiC 変異体のリン酸輸送活性

ここまでの解析によって F267S、F282S の変異は発現量ではなく機能に影響を与えていることが示唆された。しかしながら、酵母の生育速度は必ずしもタンパク質の機能を反映しているわけではない。そこで、実際に F267S、F282S が Δ NrPiC の機能に影響を与えているかを検討した。

ミトコンドリアはリン酸を取り込むことによって膨潤し、吸光度が減少することが知られている。この吸光度を測定することによってミトコンドリアがリン酸を取り込んでいるかを簡便に評価することができる[19]。まず、 Δ PiC から単離したミトコンドリアを NH_4Pi 溶液に添加したところ、コントロールである NH_4Cl 溶液の場合と比較してミトコンドリアの膨潤による吸光度の顕著な減少は観察されなかった(Fig.3-10)。一方、F267S、F282S の変異が導入された Δ NrPiC を発現したミトコンドリアは NH_4Pi 溶液中で、 NH_4Cl 溶液の場合と比較して顕著な吸光度の減少が観察された。このことから、F267S、F282S の変異は Δ NrPiC の機能に影響を与えていることが示唆された。

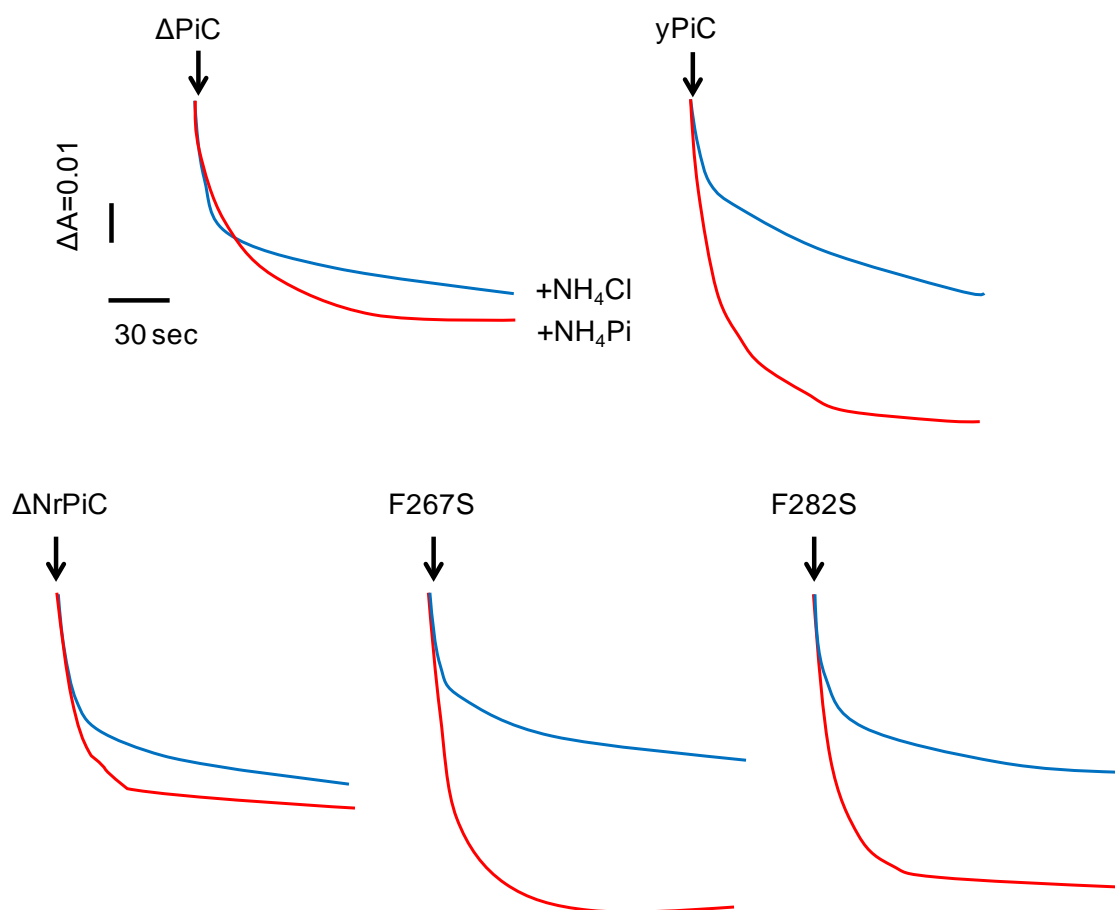


Fig.3-10 機能的に発現する Δ NrPiC の変異体を発現した酵母ミトコンドリアの swelling

Δ NrPiC の変異体を発現した酵母ミトコンドリアのリン酸取り込み能を swelling によって評価した。 Δ PiC 及び、yPiC、 Δ NrPiC はそれぞれの発現ベクター、F267S、F282S はそれぞれの変異を導入した Δ NrPiC の発現ベクターを用いて形質転換した Δ PiC から単離したミトコンドリアを NH_4Cl もしくは NH_4Pi 溶液に添加し、吸光度の変化を測定した。詳細な実験手順は、3-4-8 に示す。

続いて、ミトコンドリアにリン酸が輸送されているかを ^{32}P で標識したリン酸を用いて直接測定した(Fig.3-11)。その結果、変異を導入していない ΔNrPiC が発現したミトコンドリアはほとんどリン酸を取り込まれなかったのに対して F267S、F282S の変異が導入された ΔNrPiC が発現したミトコンドリアは顕著なリン酸の取り込みが観察された。また、観察されたリン酸取り込み能の強さは酵母の生育速度とよく相関していた。このことから、F267S、F282S が ΔNrPiC の機能に影響を与えていることがさらに強く示唆された。

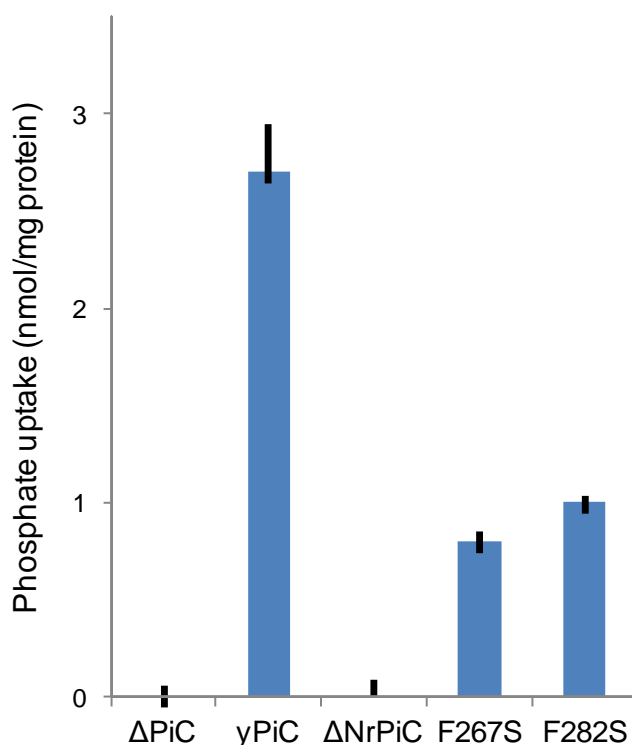


Fig.3-11 機能的に発現する ΔNrPiC の変異体を発現した酵母ミトコンドリアのリン酸取り込み

ΔNrPiC の変異体を発現した酵母ミトコンドリアのリン酸取り込み能を ^{32}P で標識したリン酸を用いて評価した。 ΔPiC 及び、yPiC、 ΔNrPiC はそれぞれの発現ベクター、F267S、F282S はそれぞれの変異を導入した ΔNrPiC の発現ベクターを用いて形質転換した ΔPiC から単離したミトコンドリアに ^{32}P で標識したリン酸を添加し、ミトコンドリアに取り込まれたリン酸の量を測定した。バックグラウンドとして ΔPiC から単離したミトコンドリアを用いて測定した値を差し引いて算出し、独立した実験を3回行った結果の平均値 \pm 標準偏差で示す。詳細な実験手順は、3-4-9に示す。

3-2-7 F267S、F282S の変異が hPiC に与える影響

ここまでの解析から F267S、F282S の変異を導入することによって酵母に Δ NrPiC を機能的に発現させることに成功した。そこで、この変異の導入が rPiC についてのみ有効なのか他の生物種においても有効であるかを検討した。

ヒト PiC(hPiC)についても F267S、F282S の変異を導入した変異体を Δ PiC に発現させ、その変異体の生育レベルを確認した(Fig.3-12)。その結果、ヒトについてはラットの場合とは異なりプレ配列を欠損させただけでも Δ PiC の生育をわずかに回復した。これに加えて F267S、F282S の変異を導入するとさらに強く生育が回復した。また、プレ配列を欠損させていない場合においては、F267S、F282S の変異を導入しても生育はあまり回復しなかった。これらのことから、hPiC においてもプレ配列の欠損及び F267S、F282S の変異の導入が酵母における機能的発現に重要であることが強く示唆された。

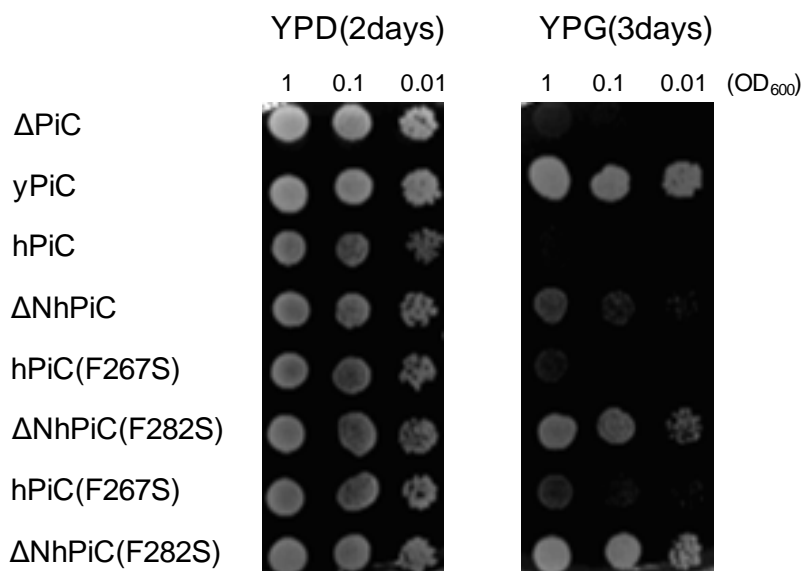


Fig.3-12 変異を導入した hPiC を発現した Δ PiC の生育速度の詳細な比較

変異が導入された hPiC の発現ベクターを導入したことによる Δ PiC の生育レベルを詳細に比較した。選択培地で前培養した酵母培養液を 2% グルコースを含む富栄養培地(YPD)または 3% グリセロールを含む富栄養培地(YPG)に段階的に希釈してから塗布し、30°C定温条件下で 2 日もしくは 3 日間培養した結果を示す。なお、 Δ PiC は PiC 欠損株を、yPiC、hPiC、 Δ NhPiC-A、hPiC(F267S)、 Δ NhPiC(F267S)、hPiC(F282S)、 Δ NhPiC(F282S)はそれぞれの発現ベクターを用いて形質転換した Δ PiC をそれぞれ表す。

3-3 考察

これまでに、哺乳類のミトコンドリア溶質輸送担体において ADP/ATP carrier 以外の輸送担体については輸送様式についてほとんど解析が行われていない。これは、ミトコンドリアにリン酸を輸送する酸化的リン酸化に必須のタンパク質である PiC についても同様であり、哺乳類の PiC においてはいずれのアミノ酸残基がその機能発現及び構造形成において重要な役割を果たしているかについて十分な解析は行われていなかった。出芽酵母はミトコンドリアの呼吸能が欠損し非発酵性炭素源培地で生育不可能な酵母株も発酵性炭素源培地では生育可能であることから、PiC を欠損させた酵母株を樹立することが可能である。この株を用いることによって哺乳類の PiC の酵母における発現条件の検討は必要になってくるものの、内在性の活性を考慮せずに哺乳類の PiC の機能解析が可能な発現系を構築できると考えられる。そこで、本研究では Δ PiC に哺乳類の PiC を機能的に発現させるため以下に続く解析を行った。

初めに、直鎖状 DNA を用いた相同組み換えによって WT の PiC をコードする遺伝子を欠損させ、 Δ PiC の樹立を試みた。この樹立した株で PiC が欠損しているかを酵母の表現型(Fig.3-1)及び Western blotting (Fig.3-2)によって確認した。その結果、樹立した株は PiC が欠損していることが確認された。続いて、樹立した Δ PiC を用いて rPiC の発現を試みた。これまでに、哺乳類の PiC は N 末端にプレ配列が存在し(Fig.3-3)、このプレ配列は酵母においては PiC のミトコンドリアへの移行効率を低下させることが報告されている。そこで、全長の rPiC に加えて、プレ配列を欠損させた rPiC の酵母発現ベクターを Δ PiC に導入し、その変異株の非発酵性炭素源培地であるグリセロール培地上における生育を観察した(Fig.3-4)。しかしながら、全長の場合に加えてプレ配列を欠損させた場合も生育は回復しなかった。そこで、rPiC が発現していないのか、発現しているにも関わらず機能していないのかを検討するため、Western blotting によってタンパク質の発現を確認した(Fig.3-5)。その結果、全長の rPiC については発現していなかったがプレ配列を欠損させた rPiC は酵母において発現していた。このことから、酵母において発現させた rPiC は発現しているにも関わらず機能を有していないことが示唆された。そこで、酵母において機能的に発現する rPiC を得るために rPiC にランダムに変異を導入し、 Δ PiC の生育を回復する変異体を得ることを試みた。その結果、酵母に機能的に発現する変異体として F267S、F282S の変異体を得られた(Fig.3-6,7)。続いて、この変異は rPiC の発現量を上昇させているのか、機能を亢進させているのかを検討するため、これらの変異体の発現量を Western blotting によって確認した(Fig.3-8)。その結果、F267S、F282S の変異の導入によって発現量は変化しなかったことから、今回見出した変異は発現量ではなく機能に影響を与えていることが示唆された。そこで、これらの変異体が発現したミトコンドリアのリン酸輸送能を評価した(Fig.3-10,11)。その結果、変異を導入していない Δ NrPiC を発現したミトコンドリアはほとんどリン酸を取り込まなかったのに対して、F267S、F282S の変異を導入することによって顕著にリン酸取り込み能が亢進した。最後に、F267S、F282S の変異は rPiC だけではなく hPiC の機能も亢進するのか検討した(Fig.3-12)。その結果、rPiC と同様に hPiC についても同様に機能を亢進した。

今回の解析において哺乳類の PiC を機能的に発現させるためにプレ配列の欠損及び特定のアミノ酸残基への変異が重要な因子であることを同定した。プレ配列の欠損については過去に酵母のミトコンドリアへの移行を阻害することが報告されており[17]、今回得られた知見はそれと一致するものであった。また、今回見出した rPiC を酵母において機能的に発現させるために必要な変異である F267S 及び F282S の変異がなぜ機能を亢進するのかについては今回の解析では明確な知見は得られていない。これらの変異はいずれも第 6 膜貫通領域中に存在するアミノ酸残基であり(Fig.3-6)、予測される推定構造から膜貫通領域の外腔側に[20]、つまり脂質と相互作用している領域に存在していると考えられる。これまでにミトコンドリア溶質輸送担体は脂質との相互作用がその機能発現に重要であることが報告されており[21,22]、生物種ごとに異なるミトコンドリア内膜の脂質組成[23,24]がその機能発現に影響を与えているのではないかと推測される実験結果も報告されている[25]。今後、この仮説を検証するために実験を行っていきたいと考えている。

また、今回の解析では一般的によく用いられる手法である ethyl methane sulfonate を用いた手法[24]ではなく PCR-based random mutation と gap-repair cloning[18]を組み合わせた手法を用いて機能的に発現する変異株を得た。Ethyl methane sulfonate を用いた手法はゲノム上の他の遺伝子にもランダムに変異を導入してしまうため、目的のクローンに加えて擬陽性のクローンが数多く得られてしまうという欠点がある。一方、今回用いた手法は変異を導入したい遺伝子上にのみ変異を導入することができるため擬陽性が得られる確率が低くなる。実際に、今回の解析では陽性の 2 つのクローンのみが得られ、擬陽性のクローンは得られなかった。このことから、今回用いた手法は酵母を用いたミトコンドリア輸送担体の機能復帰変異体を得るために極めて有用な手法であると考えられる。

3-4 実験方法

3-4-1 試薬

主な試薬は 2-4-1 に準じる。

3-4-2 種々の生物種の PiC の酵母発現用ベクターの構築

酵母、ラット、ヒトの PiC をコードする cDNA は、Table3-1 に示したプライマーを用いて Table3-2 に示した条件によって PCR で増幅した。その後、得られた cDNA を pUC19 δ T に組み込み、塩基配列に変異がないことを確認した。その後、その cDNA を pYO326-yA2P、もしくは pYO326-yA2P-FLAG にサブクローニングした。

Table3-1 種々の生物種の PiC コードする遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列

Primer name	Nucleotide sequence
GE2595	5'- GGGAACATATGTTCTCGTCCGTGGC
GE2596	5'- CTTGGATCCA ACTACTGAGTTAACCCAAG
GE2660	5'- CTCATCTCCATATGTCTGTGTCTGC
GE2661	5'- GAGGATCCCTAATGACCACCACCACC
GE2666	5'- ACCTGGCACATATGGCCGTGGAAGAG
GE2670	5'- AGGCATATGTTCTCGTCCGTAGCGC
GE2671	5'- GGATCCCTACTCAGTTAACCCAAGC

Table3-2 種々の生物種の PiC をコードする遺伝子の PCR の増幅条件

Gene	Accetion number	D primer	U primer	Template
yPiC	NM_001181735.1	GE2660	GE2661	yeast genome
rPiC-A	NM_001270788.1	GE2670	GE2671	rat heart cDNA
rPiC-B	NM_139100.2	GE2670	GE2671	rat brain cDNA
Δ NrPiC-A	NM_001270788.1	GE2666	GE2671	rPiC-A cDNA
Δ NrPiC-B	NM_139100.2	GE2666	GE2671	rPiC-B cDNA
hPiC-A	NM_005888.3	GE2595	GE2596	human heart cDNA
Δ NhPiC-A	NM_005888.3	GE2666	GE2596	hPiC-A cDNA

D と U はそれぞれ下流(downstream)と上流(upstream)方向のプライマーとして用いたことを示す。

3-4-3 酵母の培養条件

手法は第2章の方法に準じて行った。

3-4-4 酵母の形質転換

手法は第2章の方法に準じて行った。

3-4-5 酵母ミトコンドリアの調製

手法は第2章の方法に準じて行った。

3-4-6 Western blotting

手法は第2章の方法に準じて行った。

3-4-7 PCR-based random mutation 及び gap-repair cloning による変異体の探索

実験の流れは Fig.3-13 に従って行った。初めに、 Δ NrPiC-A の酵母発現ベクターを鋳型に、変異を起こしやすい酵素である Taq DNA polymerase を用いて Δ NrPiC-A をコードする遺伝子を PCR によって増幅し、 Δ NrPiC-A をコードする遺伝子に変異を導入した。この変異が導入された Δ NrPiC-A をコードする遺伝子を *Bgl*II 及び *Bam*HI によって消化した pYO326-yA2P/ Δ NrPiC-A の酵母発現ベクターと同時に Δ PiC に形質転換し、SG 寒天培地上に塗布した。この SG 寒天培地上で形質転換体を 30°C で 10 日培養したところ、2 つのコロニーが得られた。

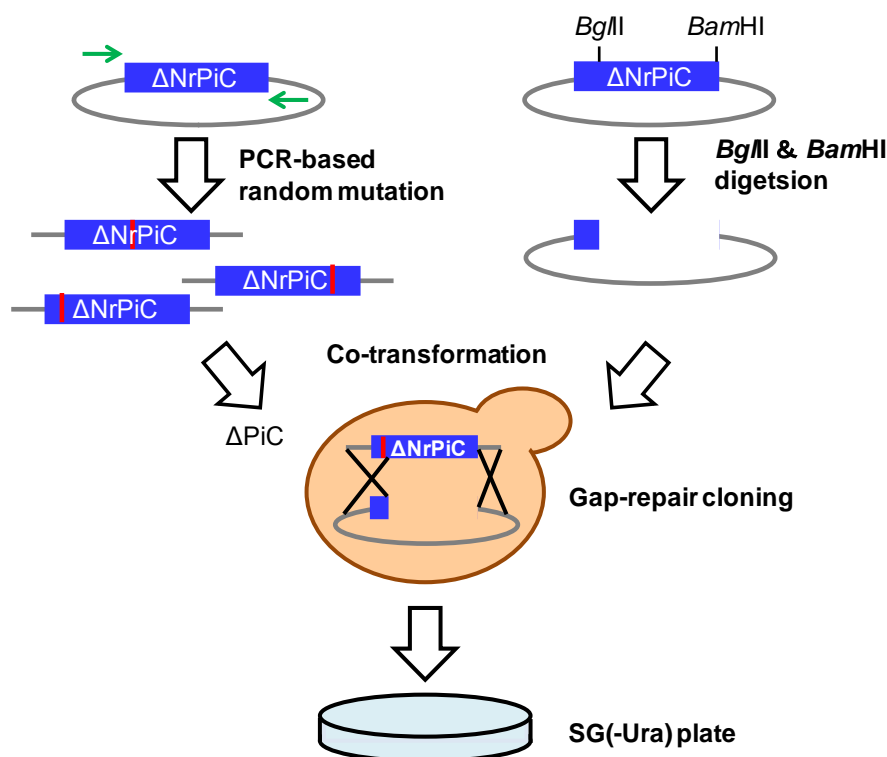


Fig.3-13 PCR-based random mutation 及び gap-repair cloning の実験フロー

3-4-8 Swelling によるミトコンドリアのリン酸輸送活性の評価

手法は Zara らの方法に準じて行った[19]。単離したミトコンドリアを 1 ml の NH_4Cl buffer(120 mM ammonium chloride, 20 mM Tris, 5 mM rotenone pH7.4) もしくは、 NH_4Pi buffer(120 mM ammonium phosphate, 20 mM Tris, 5 mM rotenone pH7.4)に 0.1 mg/ml になるよう懸濁し、その時の 546 nm の吸光度を測定した。

3-4-9 ^{32}P で標識したリン酸を用いたミトコンドリアのリン酸輸送活性の測定

手法は Zara らの方法に準じて行った[19]。単離したミトコンドリア 0.25 mg 分を 300 ul の活性測定メディウム(10 mM KCl, 20 mM Tris, 1 $\mu\text{g/ml}$ rotenone, 20 mM butylmalonate pH6.5)に懸濁し、 $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ を含むリン酸を 1.35 mM になるよう添加した後、10 秒間反応させた。その後、1.5 mM meralyI を添加し反応を停止させた後、遠心し上清を除去した。その後、沈殿を 10 mM K-PI を含む溶液に再懸濁した後、遠心し上清を除去した。最後に、沈殿を 1% SDS 溶液 100 ul で溶解し、この溶液 50 ul 中に含まれる $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ の放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。

3-5 参考文献

1. F. Palmieri, The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology, *Mol. Aspects Med.* 34 (2013)465-484.
2. M. Gutiérrez-Aguilar, Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers, *Biochem J.* 454 (2013)371-386.
3. H. Wohlrab, Transport proteins (carriers) of mitochondria, *IUBMB Life* 61 (2009)40-46.
4. A.D. Arco, New mitochondrial carriers: an overview, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005)2204-2227.
5. E.R. Kunji, The role and structure of mitochondrial carriers, *FEBS Lett.* 564 (2004)239-244.
6. M. Hashimoto, Expression of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria: significantly enhanced expression by replacement of the N-terminal region of the bovine carrier by the corresponding regions of the yeast carriers, *Biochim. Biophys. Acta* 1409 (1999)113-124.
7. T. Hatanaka, Significant expression of functional human type 1 mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001)595-599.
8. Phelps A, Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry.* 30(1) (1991)248-252.
9. Dolce V, The sequences of human and bovine genes of the phosphate carrier from mitochondria contain evidence of alternatively spliced forms, *J Biol Chem.* 269(14) (1994)10451-10460.
10. Fiermonte G, Expression in *Escherichia coli*, functional characterization, and tissue distribution of isoforms A and B of the phosphate carrier from bovine mitochondria, *J Biol Chem.* 273(35) (1998)22782-22787.
11. Dolce V, Tissue-specific expression of the two isoforms of the mitochondrial phosphate carrier in bovine tissues, *FEBS Lett.* 399(1-2) (1996)95-98.
12. Whittaker PA. The petite mutation in yeast, *Subcell Biochem.* 6(1979)175-232
13. Murakami H, Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor, *Nature.* 347(6292) (1990)488-491.
14. M.J. Runswick, Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein, *EMBO J.* 6 (1987)1367-1373.
15. G.C. Ferreira, Energy-linked anion transport. Cloning, sequencing, and characterization of a full length cDNA encoding the rat liver mitochondrial proton/phosphate symporter, *J. Biol. Chem.* 264 (1989)15628-15633.

16. V. Dolce, The sequences of human and bovine genes of the phosphate carrier from mitochondria contain evidence of alternatively spliced forms, *J. Biol. Chem.* 269 (1994)10451-10460.
17. V. Zara, The cleavable presequence is not essential for import and assembly of the phosphate carrier of mammalian mitochondria but enhances the specificity and efficiency of import, *J. Biol. Chem.* 267 (1992)12077-12081.
18. H. Ma, Plasmid construction by homologous recombination in yeast, *Gene* 58 (1987)201-216.
19. V. Zara, Yeast mitochondria lacking the phosphate carrier/p32 are blocked in phosphate transport but can import preproteins after regeneration of a membrane potential, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996)6524-6531.
20. E.R. Kunji, The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006)1237-1248.
21. M. Klingenberg, Cardiolipin and mitochondrial carriers, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009)2048-2058.
22. S.M. Claypool, Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009)2059-2068.
23. Daum, G. Lipids of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.* 822 (1985)1-42.
24. Zinser, E., and Daum, G. (1995) Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast.* 11 (1995)493-536.
25. Hamazaki T, Functional expression of human adenine nucleotide translocase 4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 6(4) (2011)e19250.
26. Zeman I, Four mutations in transmembrane domains of the mitochondrial ADP/ATP carrier increase resistance to bongkreikic acid, *J Bioenerg Biomembr.* 35(3) (2003)243-256.

第4章 総括

ミトコンドリア内膜における溶質輸送は、それぞれの物質に特異的かつ選択的な輸送担体を介して輸送されており、これらの輸送担体における輸送が効率的なエネルギー産生に寄与している[1-5]。また、哺乳類においては Ca^{2+} ユニポーターがそのマトリクス内部に Ca^{2+} を輸送することによって、細胞内の Ca^{2+} 濃度を減少させる役割を有していると考えられており[6,7]、生体内においてミトコンドリアに存在する輸送体は多様な生理機能に関与していると考えられている。しかしながら、ミトコンドリア内膜の溶質輸送に関与するタンパク質の輸送様式の解析は、近年同定されてきたタンパク質に限らず、古くから研究が行われているミトコンドリア溶質輸送担体についても十分な解析が行われていない。この原因として、機能がミトコンドリアの酸化的リン酸化と直結しており、哺乳類においてその輸送機能の欠損体を作製することが困難なことや複雑な複合体を形成するものに関しては構成タンパク質ごとの機能を明確に区別して解析を行える実験系が存在しないことが挙げられる。出芽酵母はこれらの輸送担体の解析を行うために非常に有効な発現系であると考えられているが、その発現系の構築には発現条件の詳細な検討が必要である。そこで、本研究では2種類の哺乳類の輸送に関与するタンパク質について、そのタンパク質を酵母に発現させるために重要な因子を同定し、機能解析に適した酵母発現系の確立を目的として研究に取り組んだ。以下に本研究から得られた結果を要約し、その内容について考察する。

4-1 出芽酵母のミトコンドリアにおける Ca^{2+} ユニポーターの機能的発現(第2章)

近年、ミトコンドリア内膜上に存在する Ca^{2+} ユニポーターの分子実体が明らかとなってきた。しかしながら、 Ca^{2+} ユニポーターの各構成タンパク質を解析するのに適した発現系が存在しないことから、構成タンパク質の詳細な解析は未だ行われていない。酵母は、 Ca^{2+} ユニポーターが存在しないことが知られており[8]、哺乳類の Ca^{2+} ユニポーターを酵母で発現させることができれば内在性の Ca^{2+} ユニポーターの構成タンパク質が存在しない状態で解析を行うことができると考えられる。そこで、本研究では Ca^{2+} ユニポーターの酵母発現系の構築を試みた。

本研究において、ミトコンドリアが Ca^{2+} を取り込むのに最低限必要なタンパク質である MCU と EMRE を酵母に機能的に発現させることに成功し、MCU を酵母に発現させる際には MCU をコードする遺伝子の 5' 側の塩基配列を最適化することが重要であることを明らかとした。この領域は GC 含量が極めて高く、レアコドンが豊富に存在する領域である。この領域のコドンの最適化によって発現量が上昇した理由は、GC 含量が高くその領域が立体構造をとり転写、翻訳を阻害していたのが改善された、コドンの最適化によって対応する tRNA の量が多くなった[9]、mRNA の安定性が上昇した[10]ことなどが考えられる。これらの要因はいずれも主に転写及び翻訳を阻害する要因であり、哺乳類の MCU が酵母に発現しない理由は、主に塩基配列にあると考えられるが詳細なメカニズムについては不明である。これに加えて、本解析では一部の領域のコドンの最適化のみで発現量が増加したことから、レアコドンの位置や密集度もタンパク質の発現に影響を与

えていることが示唆された。今後、コドンの最適化が発現量を増加させる詳細なメカニズムが解明されれば、より効率的に異種生物のタンパク質を酵母に機能発現させることが可能であると考えられる。また、レアコドンの量は、酵母の ADP/ATP carrier をコードする遺伝子では全体の 1 % 程度しか存在しない。また、当研究室でこれまでに酵母に発現させることに成功している哺乳類のミトコンドリア溶質輸送担体をコードする遺伝子 11 種類のレアコドンの量は平均で 18%、最も高いものでも 21% 程度である。これらの哺乳類のミトコンドリア溶質輸送担体のレアコドンの量は mMCU をコードする遺伝子よりは少ないが、酵母の ADP/ATP carrier よりは多い。このことから、mMCU に限らず他の哺乳類のミトコンドリア溶質輸送担体についてもコドンの最適化は有効である可能性が考えられる。今後、他のタンパク質についても有効な手法であるか検討して行きたいと考えている。

4-2 出芽酵母のミトコンドリアにおける哺乳類の

リン酸キャリアーの機能的発現(第 3 章)

哺乳類の PiC は、ADP/ATP carrier に続くミトコンドリア溶質輸送担体のモデルタンパク質としてその輸送様式の解明が期待されている。哺乳類の PiC の機能解析に適した発現系は構築されておらず、哺乳類の PiC においてはいずれのアミノ酸残基がその機能発現及び構造形成において重要な役割を果たしているかについて十分な解析は行われていなかった。出芽酵母は PiC を欠損させた株を樹立することが可能である。このことから、この株を用いることによって哺乳類の PiC の酵母における発現条件の検討は必要であるものの、内在性の活性を考慮せずに哺乳類の PiC の機能解析が可能な発現系を構築できると考えられる。そこで、本研究では、 Δ PiC に哺乳類の PiC を機能的に発現させることを試みた。

本研究において哺乳類の PiC を酵母において機能的に発現させ、その発現に重要な因子としてプレ配列の欠損及び特定のアミノ酸残基への変異が重要な因子であることを同定した。哺乳類の PiC に特徴的なプレ配列は、過去に酵母においてミトコンドリアへの移行を阻害することが報告されており[11]、今回得られた知見はそれと一致するものであった。このプレ配列は哺乳類のミトコンドリアでは逆に移行を促進することが知られており[11]、生物種ごとにミトコンドリアへのタンパク質の輸送メカニズムが異なっていることを示唆している。また、ミトコンドリア内膜に存在するタンパク質の移行は、N 末端側のアミノ酸配列ではなく膜貫通領域中のアミノ酸配列によって規定されていると考えられている[12]。このことから、ミトコンドリア内膜へのタンパク質の移行は現在考えられているよりも複雑であることが示唆されており、哺乳類の輸送担体を酵母で機能的に発現させるために考慮しなければいけない点である

また、今回の解析では F267S もしくは F282S の変異を導入することによって哺乳類の PiC を酵母に発現させることに成功した。しかしながら、これらの変異がなぜ哺乳類の PiC の機能を亢進するのかについては今回の解析では明確な知見は得られていない。これらの変異はいずれも第 6 膜貫通領域中に存在する外腔側のアミノ酸残基であると推測される[13]。また、これまでにミ

トコンドリア溶質輸送担体は脂質との相互作用がその機能発現に重要であることが報告されていることから[14,15]、今回見出したアミノ酸残基は脂質と相互作用に重要な領域な可能性が考えられる。ミトコンドリアの内膜の脂質組成は、生物種ごとに異なることが知られており[16,17]、それが異種生物での発現に影響を与えることが考えられる。今後、このアミノ酸変異が脂質との相互作用に影響を与えているか詳細な解析を行っていきたいと考えている。

以上、本研究から、哺乳類のミトコンドリアを酵母で機能的に発現させるためには、コドンの最適化やプレ配列の除去、点変異の導入が有効であることが示唆された。今回の解析では、哺乳類のタンパク質を酵母に発現させるためにはタンパク質の発現における特定の段階が関与しているわけではなく、転写、翻訳、移行、移行した場所での活性など機能的発現に関わる様々な段階が関与していることが明らかとなった。このことから、これらの各段階において酵母のミトコンドリアへ溶質を輸送するタンパク質とどの程度異なるかを値として規格化することができれば、哺乳類のミトコンドリアへ溶質を輸送するタンパク質を発現させる際にその規格を用いて効率的な検討が行えると考えられる。そのためには、今後さらに複数のタンパク質について解析を行っていく必要がある。今後、画一的に哺乳類の輸送体を酵母のミトコンドリアに機能的に発現させられることが可能になり、哺乳類のミトコンドリアにおける溶質輸送の全貌が解明されていくことを期待する。

4-3 参考文献

1. F. Palmieri, The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology, *Mol. Aspects Med.* 34 (2013)465-484.
2. M. Gutiérrez-Aguilar, Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers, *Biochem J.* 454 (2013)371-386.
3. H. Wohlrab, Transport proteins (carriers) of mitochondria, *IUBMB Life* 61(2009)40-46.
4. A.D. Arco, New mitochondrial carriers: an overview, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005)2204-2227.
5. E.R. Kunji, The role and structure of mitochondrial carriers, *FEBS Lett.* 564 (2004)239-244.
6. J.G. McCormack, The role of mitochondrial Ca^{2+} transport and matrix Ca^{2+} in signal transduction in mammalian tissues, *Biochim. Biophys. Acta.* 1018 (1990)287-291.
7. P. Pizzo I. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities, *Pflugers Arch.* 464 (2012)3-17.
8. Carafoli E, A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. *Biochem J.* 122(5) (1971)681-690.
9. Roche ED SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *EMBO J.* 18(16) (1998)4579-4589.
10. Presnyak V, Codon optimality is a major determinant of mRNA stability, *Cell.* 160(6) (2015)1111-1124.
11. V. Zara, The cleavable presequence is not essential for import and assembly of the phosphate carrier of mammalian mitochondria but enhances the specificity and efficiency of import, *J. Biol. Chem.* 267 (1992)12077-12081.
12. Phelps A, Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry.* 30(1) (1991)248-252.
13. S.M. Claypool, Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009)2059-2068.
14. Daum, G. Lipids of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.* 822 (1985)1-42.
15. Zinser, E., and Daum, G. (1995) Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast.* 11 (1995)493-536.
16. Hamazaki T, Functional expression of human adenine nucleotide translocase 4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 6(4) (2011)e19250.
17. Zeman I, Four mutations in transmembrane domains of the mitochondrial ADP/ATP carrier increase resistance to bongkreikic acid, *J Bioenerg Biomembr.* 35(3) (2003)243-256.

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を賜り、更に終始ご指導、ご鞭撻を頂きました、先端酵素学研究所 プロテオゲノム研究領域 篠原 康雄 教授に心より感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたりご指導、ご討論をいただき、研究活動に深いご理解とご協力をいただきました、徳島大学 先端酵素学研究所 プロテオゲノム研究領域 山本 武範 講師に心より感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始暖かく見守り続け、ご協力いただきました、先端酵素学研究所 プロテオゲノム研究領域 廣島佑香 特任助教に心より感謝の意を表します。

また、研究生生活の苦楽を共にし、支えて頂きました、猪谷 祐貴 修士、榎本 麻里子 修士、加藤 弓子 学士、藤原 健吾 学士に心から感謝致しますと共に、諸氏の今後のご活躍をお祈り申し上げます。

また、研究を通じてお世話になりました、南 尚希 修士、藤田 敦 学士に心から感謝致しますと共に、諸氏の今後のご活躍をお祈り申し上げます。

また、研究に際し、終始暖かく見守り続け、ご協力いただきました徳島大学薬学部 生物薬品化学教室の皆様には感謝いたします。

最後に、これまで深い愛情と理解をもって温かく見守り、励まし、心身ともに支え続けてくれた家族に心から感謝致します。

2016 年 9 月

山越亮平

