

論文内容要旨

報 告 番 号	甲 創 第 号	氏 名	渡辺 朗
学位論文題目	ミトコンドリアのカルシウムユニポーターを構成するコアサブユニットの定量的解析		
<p>ミトコンドリアはカルシウム取り込み機能を有する細胞内小器官の1つであり、細胞内のカルシウムシグナルを制御することで様々な生理機能に関与している。一方、ミトコンドリアへのカルシウムの過剰な流入は細胞死を引き起こし、虚血再灌流障害といった疾患の原因になることが知られている。ミトコンドリアへのカルシウム取り込みはカルシウムユニポーターと呼ばれる複数のサブユニットで構成されるイオンチャネルが担っており、そのチャネル孔はMCU (mitochondrial calcium uniporter)およびEMRE (essential MCU regulator)と呼ばれる2つのコアサブユニットによって構成される。しかし、これらの両サブユニットがカルシウム取り込みを制御する分子機構に関しては不明な点が多い。近年、人工脂質二重膜におけるMCUとEMREの立体構造がクライオ電子顕微鏡を用いて解析され、MCUとEMREは4:4で複合体を形成していることが明らかになった。しかしながら、実際のミトコンドリア膜において両タンパク質がどのような構成比でイオンチャネルを形成しているのかは不明である。そこで本研究では、哺乳類の種々の組織から単離したミトコンドリアのMCUおよびEMREに対するタンパク質量系を構築し、カルシウムユニポーターにおける両タンパク質の構成比を解析した。</p> <p>まず、MCUおよびEMREに対する複数の抗体を調製し、定量的解析に適した特性を有する抗体を選出した。次に、マウスのMCUおよびEMREの両タンパク質を大腸菌発現系等によって調製後、逆相HPLCで精製し、これらをMCUおよびEMREの標準タンパク質とした。続いて、既知量の標準タンパク質とマウスの各組織（脳、心臓、肝臓、腎臓）から単離したミトコンドリアに対して、ウェスタンブロッティングを行った。得られた標準タンパク質に由来するバンドのシグナル強度から検量線を作成し、この検量線に単離ミトコンドリアから得られるシグナル強度を当てはめることによって、ミトコンドリア中のMCUおよびEMREのタンパク質量を算出した。その結果、解析した全ての組織のミトコンドリアにおいて、EMREのタンパク質量はMCUに比べて顕著に少ないことが示された。さらに、両サブユニットのタンパク質量を基に、カルシウムユニポーターにおけるMCUとEMREの構成比を推定した。その結果、1) 過去に人工脂質膜上で観察されたMCUとEMREが4:4の割合で含まれる複合体はミトコンドリア膜上にほとんど存在しないこと、2) MCU四量体に結合するEMREは0~2分子であること、3) MCU四量体に結合しているEMREの数は組織によって異なっていること、が明らかになった。</p> <p>本研究において、哺乳類のミトコンドリアにおけるMCUとEMREのタンパク質量が初めて定量的に解析され、カルシウムユニポーターにおけるMCUとEMREの構成比は組織によって多様性があることが明らかになった。ミトコンドリアのカルシウム取り込み活性は組織によって異なることが報告されており、MCUとEMREの構成比がカルシウム取り込み機能を制御するメカニズムの一つである可能性が考えられる。</p>			