

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

2022 年

渡辺 朗

目次

第1章 序論

1.1	ミトコンドリアにおける Ca^{2+} 取込機能	1
1.2	ミトコンドリアカルシウムユニポーター	2
1.3	ミトコンドリアの Ca^{2+} 取込機能に必要なサブユニット (コアサブユニット)	3
1.4	MCU-EMRE 複合体の立体構造解析	4
1.5	カルシウムユニポーターを構成する調節サブユニットの機能	5
1.6	イオンチャネルを構成するサブユニットの化学量論比	5
1.7	目的	6
1.8	参考文献	7

第2章 結果および考察

2.1	緒言	12
2.2	結果	13
2.2.1	抗 MCU 抗体および抗 EMRE 抗体の調製と特異性の評価	13
2.2.2	標準タンパク質としての MCU および EMRE の組み換えタンパク質の調製	24
2.2.3	組織および培養細胞から単離したミトコンドリアでの MCU, EMRE の定量解析	30
2.2.4	認識部位の異なる抗体を用いた各標準タンパク質に対する免疫反応性の確認	35
2.2.5	ミトコンドリア上における MCU, EMRE の化学量論比	37
2.3	考察	40
2.4	実験方法	44
2.4.1	実験に用いた試薬および材料、機器	44
2.4.2	マウス組織および HeLa 細胞からのミトコンドリア単離	45
2.4.3	CRISPR/Cas9 系による MCU ノックアウト細胞および EMRE ノックアウト細胞の樹立	45
2.4.4	MCU および EMRE の酵母発現ベクターの構築と酵母への導入	46
2.4.5	抗 MCU 抗体および抗 EMRE 抗体の調製	46
2.4.6	MCU の組み換えタンパク質の調製	47
2.4.7	MCU の組み換えタンパク質の精製	47
2.4.8	EMRE タンパク質の化学合成	48

2.4.9 ウェスタンブロッティングによるタンパク質の検出	48
2.4.10 MCU-EMRE 複合体における構成因子の割合とそれらを取りうる確率の導出	49
2.5 参考文献	50

謝辞

本稿で用いた省略形

AB: antibody

BCA: Bicinchoninic acid

Cas9: CRISPR-associated protein 9

CBB: coomassie brilliant blue

CC: coiled-coil domain

CDS: coding sequence

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat

ECL: enhanced chemiluminescence

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

EMRE: essential MCU regulatory element

MCU: mitochondrial calcium uniporter

MCUR1: mitochondrial calcium uniporter regulator 1

MICU1: mitochondrial calcium uptake 1

MTS: mitochondrial targeting signal

NTD: N-terminal domain

PAM: protospacer adjacent motif

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

sgRNA: single guide RNA

TM: transmembrane region

TS: Tween solution

第 1 章 序論

1.1 ミトコンドリアにおける Ca^{2+} 取込機能

Ca^{2+} は、生体内において様々な役割を果たす重要なシグナリングイオンである。その役割は筋肉の収縮や受精、細胞死など多方面に渡っており、“生と死を司るイオン”といえる。そのため、細胞内の Ca^{2+} 濃度は厳密な調節が行われている。この調節機構の一つに、ミトコンドリアによる Ca^{2+} 取込みがある。

ミトコンドリアの Ca^{2+} 取込機能は 1960 年代から知られており、マウスやラットの組織から精製されたミトコンドリアが Ca^{2+} をミトコンドリアマトリックスへ取り込む性質を持つことを複数の研究グループが報告したことから始まる[1]。この取込みはミトコンドリアの電子伝達系によって形成されたミトコンドリア内膜の膜電位を駆動力にして輸送を行い、他イオンとの交換が必要ないことが示され、この輸送を担う分子はカルシウムユニポーターと呼ばれるようになった (Fig. 1-1)[2,3]。2004 年に Kirichok らが行ったミトプラストに対するパッチクランプを用いた解析によって、このカルシウムユニポーターはチャネル性の輸送様式を持つことが明らかにされた[4]。また、カルシウムユニポーターは細胞質側の Ca^{2+} 濃度が低い場合は Ca^{2+} を取り込まず、 Ca^{2+} 濃度が高い場合に Ca^{2+} を取り込むという特徴から、複数のタンパク質で構成される複合体であると考えられていた。

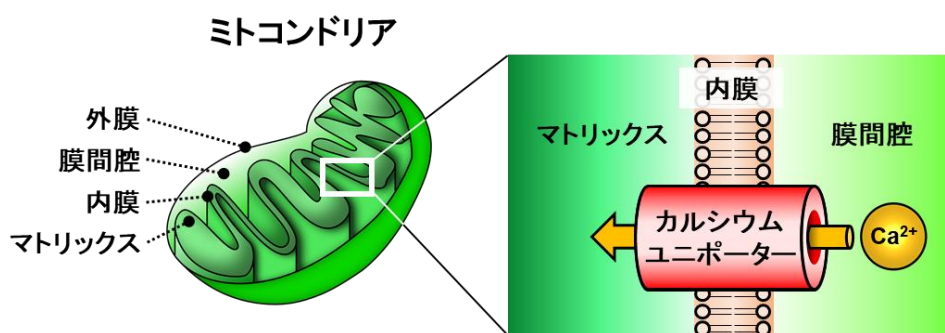


Fig. 1-1 ミトコンドリア内膜の Ca^{2+} 輸送体 (カルシウムユニポーター)

ミトコンドリアにおける Ca^{2+} 取込機能の発見以降、その輸送体であるカルシウムユニポーターの生理的役割について多くの報告がされている。1980 年代にはカルシウムユニポーターを介してミトコンドリアに取り込まれた Ca^{2+} がミトコンドリア内の代謝調節に関わる事が報告された[5]。また、ミトコンドリアへの過剰な Ca^{2+} の蓄積はミトコンドリア内膜の透過性の亢進を引き起こすことも

明らかとなっている[6–9]。この現象は透過性遷移と呼ばれ、アポトーシスやネクローシスといった細胞死の原因となり、この過程は種々の疾患に関与していることが知られている[10–13]。

1.2 ミトコンドリアカルシウムユニポーターのサブユニット

ミトコンドリアの Ca^{2+} 取込みは種々の疾患に関与していることから、カルシウムユニポーターはそれらの治療標的として注目されている。しかし一方で、カルシウムユニポーターを構成しているサブユニットはミトコンドリアの Ca^{2+} 取込機能が発見されてから長らくの間不明であった。

カルシウムユニポーターのサブユニットの同定が大きく進展したきっかけはミトコンドリアを構成するタンパク質のデータベースである MitoCarta の公開（2008 年）であった。この MitoCarta を基に、Mootha らはミトコンドリアに Ca^{2+} 取込機能を持たない酵母と Ca^{2+} 取込機能を持つトリパノソーマの間でミトコンドリアを構成するタンパク質群を比較することで、2010 年に初めて mitochondrial calcium uptake 1 (MICU1) をカルシウムユニポーターの構成因子として同定した [14]。これをきっかけに次々とサブユニットの同定が進められ、現在は MICU1 のほか、mitochondrial calcium uniporter (MCU)[15,16]、MICU2、MICU3[17]、mitochondrial calcium uniporter regulator 1 (MCUR1)[18]、MCUb[19]、essential MCU regulator (EMRE)[20] の 7 種類が同定されている (Fig. 1-2)。

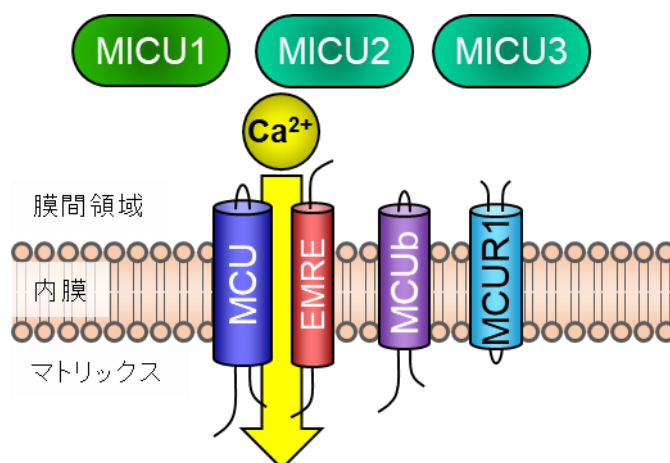


Fig. 1-2 ミトコンドリアカルシウムユニポーターの構成因子

1.3 ミトコンドリアの Ca²⁺取込機能に必要なサブユニット (コアサブユニット)

カルシウムユニポーターを構成するサブユニットの同定が進んだ一方で、Ca²⁺取込機能に必要なサブユニットは当初不明であった。これまで、カルシウムユニポーターの研究は特定のサブユニットを欠損させた動物細胞を用いて進められてきた。しかしこの方法では複数の遺伝子の欠損が必要となり、欠損した遺伝子の機能が他のサブユニットで代替される可能性もあるため必要なサブユニットを絞ることが困難であった。この問題に対して、当研究室は出芽酵母 *Saccharomyces Cerevisiae* (以下、酵母)に着目し、ミトコンドリアの Ca²⁺取込みに必要なサブユニット (コアサブユニット)を特定することに成功した[21,22]。カルシウムユニポーターはヒトから線虫に至るまで高度に保存されているが、酵母ではミトコンドリアにおける Ca²⁺取込機能が欠損している。この性質を利用して、酵母に哺乳類のカルシウムユニポーターのサブユニットを発現させることで、特定のサブユニットのみを持ったミトコンドリアを調製できる。この方法は内在するサブユニットからの二次的影響を受けずに、それぞれのサブユニットの機能をミトコンドリア上で選択的に解析可能という点で有用である。この考えに基づき、哺乳類カルシウムユニポーターのサブユニットを様々な組み合わせで酵母ミトコンドリアに発現させた。その結果、各サブユニット単独ではミトコンドリア Ca²⁺取込活性に変化は無かったが、MCUとEMREを共発現させた場合にのみ酵母ミトコンドリアにおける Ca²⁺取込活性の再構成が確認された (Fig. 1-3)。この結果は、7つのサブユニットの中で MCU と EMRE がミトコンドリアにおける Ca²⁺取込機能に必要なコアサブユニットであることを示している。

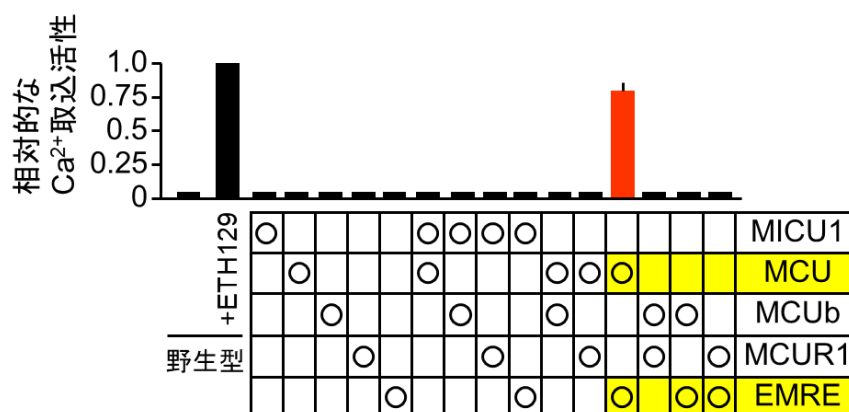


Fig. 1-3 酵母ミトコンドリアへ各サブユニットを発現させた際の Ca²⁺取込活性

T. Yamamoto, et al. (2016), BBA[21]より一部改変。

1.4 MCU-EMRE 複合体の立体構造解析

ミトコンドリアの Ca^{2+} 取込みに必須なコアサブユニットが MCU と EMRE に特定されたことで、その立体構造の解析が近年急速に進められている。2018 年には独立した複数のグループが真菌 MCU の立体構造を報告しており、カルシウムユニポーターの高度な Ca^{2+} 選択的輸送の分子メカニズムを明らかにした[23–26]。報告された構造において、MCU は四量体となりチャンネルの孔を形成しており、MCU の持つ DXXE モチーフがチャンネルの入り口で Ca^{2+} 選択的なフィルターの役割を果たしていることが分かった。更に、Wang らが近年ヒト MCU と EMRE を HEK293F 細胞で発現させ、精製した複合体について、脂質二重層を形成する nanodisc へ機能的に再構成させた[27]。nanodisc に対するクライオ電子顕微鏡を用いた解析によって、ヒト MCU の四量体が観察され、EMRE はそれに対して 1:1 の割合で結合していることが分かった。報告された MCU-EMRE 複合体の立体構造において、マトリックス側に配向した EMRE の N 末端領域は MCU 四量体の持つイオンの通過するゲート部分を開口状態で固定しており、過去に MCU、EMRE について行われたトポロジー解析や変異体を用いた研究から得られた生化学的な知見と一致していた[19,21,28–30]。

更に、2020 年には Fan らが MCU-EMRE-MICU1 複合体の立体構造を報告した[31]。この論文では HEK293 細胞を組み換えバキュロウイルスを用いて MCU, EMRE, MICU1 を過剰発現させ、精製した複合体をカーボン製の支持膜へ塗布したものをクライオ電子顕微鏡によって解析している。その結果、得られた MCU-EMRE-MICU1 複合体の立体構造は MCU:EMRE:MICU1=4:4:1 の割合であった。また、MICU1 は MCU と EMRE 両方と相互作用しており、カルシウムユニポーターのチャンネル孔に蓋をするような立体構造を取っていることが示されている。この構造は Ca^{2+} 濃度の上昇に従い MICU1 の構造変化を起こし、相互作用が解消されることでチャンネル孔の蓋を開き、 Ca^{2+} を取り込ませることが示唆されている。

1.5 カルシウムユニポーターを構成する調節サブユニットの機能

Ca²⁺取込機能に必須なコアサブユニット (MCU, EMRE)以外の 5 種類のサブユニットは Ca²⁺取込みを制御する調節サブユニットとして、その機能が調べられている。MICU1, MICU2 は MCU による Ca²⁺取込みの制御因子として協調的に働くことが知られており[32–34]、MICU1 は Ca²⁺選択性にも関与している[35]。また、MICU3 は脳特異的に発現しているサブユニットとして知られており、神経機能に関わる Ca²⁺シグナリングに関与していることが示唆されている[17,34]。MCUR1 は MCU と EMRE が形成するオリゴマーの安定性に寄与しており、Ca²⁺取込みの閾値を制御していることが報告されている[36,37]。一方で、ミトコンドリアの Ca²⁺取込みは組織間によって異なること[38]、また病態や細胞の状態等によってもその取込活性が変化することが明らかにされている[39–42]。このことから、これまでに同定されたカルシウムユニポーターの関連分子の特性をさらに解析することによって、上述したミトコンドリア Ca²⁺取込機能が異なるメカニズムについて明らかにできると考えられる。しかしながら、現在明らかになっているこれらサブユニットの“個々の”活性調節機構だけでは組織間をはじめとする生体内におけるカルシウムユニポーターの活性の違いや変化といった Ca²⁺取込機能の調節メカニズムを完全に説明することは出来ない。

1.6 イオンチャネルを構成するサブユニットの化学量論比

複数のタンパク質種によって構成される複合体の場合、その機能がタンパク質の構成比(化学量論比)によって制御されている例が報告されている[43–45]。このことから、複雑なミトコンドリア Ca²⁺取込機能の調節メカニズムを理解するために、個々のサブユニットの調節機能だけでなく、複合体を構成するサブユニットの化学量論比が関与している可能性がある。

特に、イオンチャネルにおいて、構成要素となっているサブユニットの化学量論比によってチャネルの性質を変化させる例としては、細胞膜に存在するカリウムイオンチャネル Kv4.2 が報告されている。Kv4.2 四量体に結合する KChIP サブユニットの数はカリウムイオンチャネルの輸送活性に影響を与えることが知られている[43]。Kv4.2 と KChIP の化学量論比はイオンチャネルの不活性状態からの回復までの時間に影響を与える。そのような報告に基づくと、カルシウムユニポーターを構成している MCU と EMRE の化学量論比もまたミトコンドリアカルシウム取込みの性質に関与する可能性がある。しかし、ミトコンドリアにおける MCU と EMRE の化学量論比は未だ調べられてはいない。

1.7 目的

以上のような背景から、本研究では、ミトコンドリアにおける MCU と EMRE の化学量論比を明らかにすることを目的として、まず組織や細胞から単離したミトコンドリアにおける MCU と EMRE のタンパク質量を定量的に解析する手法を構築した。この手法を用いて、様々な組織から単離したミトコンドリアにおける MCU と EMRE のタンパク質量を定量し、この結果から生体内のミトコンドリアにおいて MCU-EMRE 複合体が実際にどのような化学量論比で存在しているのかを明らかにすることを試みた。さらに、得られた結果を基に、MCU-EMRE の化学量論比とミトコンドリア Ca^{2+} 取込活性との関係性について考察した。

1.8 参考文献

- [1] H.F. DeLuca, G.W. Engstrom, CALCIUM UPTAKE BY RAT KIDNEY MITOCHONDRIA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47 (1961) 1744–1750.
- [2] T.E. Gunter, D.R. Pfeiffer, Mechanisms by which mitochondria transport calcium, *Am. J. Physiol.* 258 (1990) C755-786.
- [3] J. Santo-Domingo, N. Demaurex, Calcium uptake mechanisms of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1797 (2010) 907–912.
- [4] Y. Kirichok, G. Krapivinsky, D.E. Clapham, The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel, *Nature* 427 (2004) 360–364.
- [5] R.M. DENTON, J.G. McCORMACK, The role of calcium in the regulation of mitochondrial metabolism, *Biochem. Soc. Trans.* 8 (1980) 266–268.
- [6] X. Liu, C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, X. Wang, Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c, *Cell* 86 (1996) 147–157.
- [7] P. Bernardi, Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 1127–1155.
- [8] V. Giorgio, S. von Stockum, M. Antoniel, A. Fabbro, F. Fogolari, M. Forte, G.D. Glick, V. Petronilli, M. Zoratti, I. Szabo, G. Lippe, P. Bernardi, Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 5887–5892.
- [9] V. Giorgio, V. Burchell, M. Schiavone, C. Bassot, G. Minervini, V. Petronilli, F. Argenton, M. Forte, S. Tosatto, G. Lippe, P. Bernardi, Ca²⁺ binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition, *EMBO Rep.* 18 (2017) 1065–1076.
- [10] C.P. Baines, R.A. Kaiser, N.H. Purcell, N.S. Blair, H. Osinska, M.A. Hambleton, E.W. Brunskill, M.R. Sayen, R.A. Gottlieb, G.W. Dorn, J. Bobbins, J.D. Molkentin, Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death, *Nature* 434 (2005) 658–662.
- [11] G.D.J. García-Rivas, A. Guerrero-Hernández, G. Guerrero-Serna, J.S. Rodríguez-Zavala, C. Zazueta, Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in postischemic rat

- heart, *FEBS J.* 272 (2005) 3477–3488.
- [12] H. Du, L. Guo, F. Fang, D. Chen, A. A Sosunov, G. M McKhann, Y. Yan, C. Wang, H. Zhang, J.D. Molkenin, F.J. Gunn-Moore, J.P. Vonsattel, O. Arancio, J.X. Chen, S. Du Yan, Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer’s disease, *Nat. Med.* 14 (2008) 1097–1105.
- [13] E. Palma, T. Tiepolo, A. Angelin, P. Sabatelli, N.M. Maraldi, E. Basso, M.A. Forte, P. Bernardip, P. Bonaldo, Genetic ablation of cyclophilin D rescues mitochondrial defects and prevents muscle apoptosis in collagen VI myopathic mice, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 2024–2031.
- [14] F. Perocchi, V.M. Gohil, H.S. Girgis, X.R. Bao, J.E. McCombs, A.E. Palmer, V.K. Mootha, MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake, *Nature* 467 (2010) 291–296.
- [15] J.M. Baughman, F. Perocchi, H.S. Girgis, M. Plovanich, C.A. Belcher-Timme, Y. Sancak, X.R. Bao, L. Strittmatter, O. Goldberger, R.L. Bogorad, V. Kotliansky, V.K. Mootha, Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476 (2011) 341–345.
- [16] D. De Stefani, A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabó, R. Rizzuto, A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476 (2011) 336–340.
- [17] M. Plovanich, R.L. Bogorad, Y. Sancak, K.J. Kamer, L. Strittmatter, A.A. Li, H.S. Girgis, S. Kuchimanchi, J. De Groot, L. Speciner, N. Taneja, J. OShea, V. Kotliansky, V.K. Mootha, MICU2, a Paralog of MICU1, Resides within the Mitochondrial Uniporter Complex to Regulate Calcium Handling, *PLoS One* 8 (2013) e55785.
- [18] K. Mallilankaraman, C. Cárdenas, P.J. Doonan, H.C. Chandramoorthy, K.M. Irrinki, T. Golenár, G. Csordás, P. Madireddi, J. Yang, M. Müller, R. Miller, J.E. Kolesar, J. Molgó, B. Kaufman, G. Hajnóczky, J.K. Foskett, M. Madesh, MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 1336–1343.
- [19] A. Raffaello, D. De Stefani, D. Sabbadin, E. Teardo, G. Merli, A. Picard, V. Checchetto, S. Moro, I. Szabò, R. Rizzuto, The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can

- include a dominant-negative pore-forming subunit, *EMBO J.* 32 (2013) 2362–2376.
- [20] Y. Sancak, A.L. Markhard, T. Kitami, E. Kovács-Bogdán, K.J. Kamer, N.D. Udeshi, S.A. Carr, D. Chaudhuri, D.E. Clapham, A.A. Li, S.E. Calvo, O. Goldberger, V.K. Mootha, EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex, *Science*. 342 (2013) 1379–1382.
- [21] T. Yamamoto, R. Yamagoshi, K. Harada, M. Kawano, N. Minami, Y. Ido, K. Kuwahara, A. Fujita, M. Ozono, A. Watanabe, A. Yamada, H. Terada, Y. Shinohara, Analysis of the structure and function of EMRE in a yeast expression system, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857 (2016) 831–839.
- [22] T. Yamamoto, M. Ozono, A. Watanabe, A. Yamada, The function of EMRE in mitochondrial calcium uptake system, *Seikagaku* 89 (2017) 453–457.
- [23] R. Baradaran, C. Wang, A.F. Siliciano, S.B. Long, Cryo-EM structures of fungal and metazoan mitochondrial calcium uniporters, *Nature* 559 (2018) 580–584.
- [24] C. Fan, M. Fan, B.J. Orlando, N.M. Fastman, J. Zhang, Y. Xu, M.G. Chambers, X. Xu, K. Perry, M. Liao, L. Feng, X-ray and cryo-EM structures of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 559 (2018) 575–579.
- [25] N.X. Nguyen, J.P. Armache, C. Lee, Y. Yang, W. Zeng, V.K. Mootha, Y. Cheng, X. chen Bai, Y. Jiang, Cryo-EM structure of a fungal mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 559 (2018) 570–574.
- [26] J. Yoo, M. Wu, Y. Yin, M.A. Herzik, G.C. Lander, S.-Y. Lee, Cryo-EM structure of a mitochondrial calcium uniporter, *Science*. 361 (2018) 506–511.
- [27] Y. Wang, N.X. Nguyen, J. She, W. Zeng, Y. Yang, X. Bai, Y. Jiang, Structural Mechanism of EMRE-Dependent Gating of the Human Mitochondrial Calcium Uniporter, *Cell* 177 (2019) 1252-1261.e13.
- [28] M.F. Tsai, C.B. Phillips, M. Ranaghan, C.W. Tsai, Y. Wu, C. Williams, C. Miller, Dual functions of a small regulatory subunit in the mitochondrial calcium uniporter complex, *Elife* 5 (2016) e15545.
- [29] T. Yamamoto, M. Ozono, A. Watanabe, K. Maeda, A. Nara, M. Hashida, Y. Ido, Y. Hiroshima, A. Yamada, H. Terada, Y. Shinohara, Functional analysis of coiled-coil domains of MCU in mitochondrial calcium uptake, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*

- 1860 (2019) 148061.
- [30] T. Yamamoto, A. Yamada, Y. Shinohara, A. Watanabe, The Molecular Mechanisms of Mitochondrial Calcium Ion Channel, Calcium Uniporter, *Seibutsu Butsuri* 61 (2021) 157–161.
- [31] M. Fan, J. Zhang, C.-W. Tsai, B.J. Orlando, M. Rodriguez, Y. Xu, M. Liao, M. Tsai, L. Feng, Structure and mechanism of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter holocomplex, *Nature* (2020).
- [32] M. Patron, V. Checchetto, A. Raffaello, E. Teardo, D. Vecellio Reane, M. Mantoan, V. Granatiero, I. Szabò, D. De Stefani, R. Rizzuto, MICU1 and MICU2 Finely Tune the Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter by Exerting Opposite Effects on MCU Activity, *Mol. Cell* 53 (2014) 726–737.
- [33] G. Pallafacchina, S. Zanin, R. Rizzuto, Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake, *F1000Research* 7 (2018) 1858.
- [34] M. Patron, V. Granatiero, J. Espino, R. Rizzuto, D. De Stefani, MICU3 is a tissue-specific enhancer of mitochondrial calcium uptake, *Cell Death Differ.* 26 (2019) 179–195.
- [35] K.J. Kamer, Y. Sancak, Y. Fomina, J.D. Meisel, D. Chaudhuri, Z. Grabarek, V.K. Mootha, MICU1 imparts the mitochondrial uniporter with the ability to discriminate between Ca^{2+} and Mn^{2+} , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E7960–E7969.
- [36] D. Chaudhuri, D.J. Artiga, S.A. Abiria, D.E. Clapham, Mitochondrial calcium uniporter regulator 1 (MCUR1) regulates the calcium threshold for the mitochondrial permeability transition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E1872–E1880.
- [37] D. Tomar, Z. Dong, S. Shanmughapriya, D.A. Koch, T. Thomas, N.E. Hoffman, S.A. Timbalia, S.J. Goldman, S.L. Breves, D.P. Corbally, N. Nemani, J.P. Fairweather, A.R. Cutri, X. Zhang, J. Song, F. Jaña, J. Huang, C. Barrero, J.E. Rabinowitz, T.S. Luongo, et al., MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics, *Cell Rep.* 15 (2016) 1673–1685.
- [38] F. Fieni, S. Bae Lee, Y.N. Jan, Y. Kirichok, Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1317.
- [39] A. Andreyev, P. Tamrakar, R.E. Rosenthal, G. Fiskum, Calcium uptake and cytochrome c release from normal and ischemic brain mitochondria, *Neurochem. Int.* 117 (2018) 15–

22.

- [40] A.J. Kowaltowski, S.L. Menezes-Filho, E.A. Assali, I.G. Gonçalves, J.V. Cabral-Costa, P. Abreu, N. Miller, P. Nolasco, F.R.M. Laurindo, A. Bruni-Cardoso, O.S. Shirihai, Mitochondrial morphology regulates organellar Ca^{2+} uptake and changes cellular Ca^{2+} homeostasis, *FASEB J.* 33 (2019) 13176–13188.
- [41] Belosludtsev, Talanov, Starinets, Agafonov, Dubinin, Belosludtseva, Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+} -Dependent Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria under the Streptozotocin-Induced Type I Diabetes, *Cells* 8 (2019) 1014.
- [42] M. V. Dubinin, E.Y. Talanov, K.S. Tenkov, V.S. Starinets, I.B. Mikheeva, K.N. Belosludtsev, Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent permeability transition in heart mitochondria in the early stages of Duchenne muscular dystrophy, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1861 (2020) 148250.
- [43] M. Kitazawa, Y. Kubo, K. Nakajo, The stoichiometry and biophysical properties of the Kv4 potassium channel complex with K^+ channel-interacting protein (KChIP) subunits are variable, depending on the relative expression level, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 17597–17609.
- [44] S. Pervaiz, A. Kopp, L. von Kleist, T. Stauber, Absolute protein amounts and relative abundance of volume-regulated anion channel (VRAC) LRRC8 subunits in cells and tissues revealed by quantitative immunoblotting, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019).
- [45] L. Solé, D. Sastre, M. Colomer-Molera, A. Vallejo-Gracia, S.R. Roig, M. Pérez-Verdaguer, P. Lillo, M.M. Tamkun, A. Felipe, Functional Consequences of the Variable Stoichiometry of the Kv13-KCNE4 Complex, *Cells* 9 (2020) 1–17.

第2章 結果および考察

2.1 緒言

カルシウムユニポーターはミトコンドリアの Ca^{2+} 取込みを担う、複数のサブユニットから構成されるイオンチャネルである。現在、7 種類のサブユニットが同定されており、それらの機能と構造の解析が急速に進められている。しかし、現在明らかになっているサブユニットの機能や活性調節機構だけでは厳密に制御されているミトコンドリア Ca^{2+} 取込機能のメカニズムを完全に説明することは出来ていない。

他方で、細胞膜に存在する電位依存性カリウムイオンチャネル (Kv4.2) と複合体を形成することが知られている KCHIP4 は Kv4.2 の四量体に対して一定の化学量論比を取らず、両者の相対的な発現レベルに応じて量比が変化する[43]。この可変的な化学量論比はカリウムイオンチャネルの性質を変化させ、心筋の興奮性に寄与していると考えられている。この報告と同様に、MCU の四量体に対する EMRE の結合数は常に一定ではなく、両者の相対的な発現レベルがミトコンドリアの高度な Ca^{2+} 取込機能の制御様式に関与している可能性がある。

そこで本研究では、哺乳類ミトコンドリア中の MCU, EMRE のタンパク質量を定量することによって、ミトコンドリアにおける MCU, EMRE の化学量論比を明らかにすることを試みた。

本研究では、マウスの脳、心臓、肝臓、腎臓および汎用的な実験用培養細胞である HeLa 細胞のミトコンドリアに含まれる MCU と EMRE のタンパク質量を抗原抗体反応によって調べた。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、ウェスタンブロットティングを行った。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。最終的に、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 の化学量論比を推定した。

2.2 結果

2.2.1 抗 MCU 抗体および抗 EMRE 抗体の調製と特異性の評価

抗原抗体反応を用いて MCU と EMRE の定量的解析を行うためには、それぞれのタンパク質に対して高い特異性を有する抗体は必要不可欠である。そのため、まず MCU と EMRE に対する抗体を新たに調製し、それらの抗体と市販品として購入可能な抗体を含めてそれらの特異性を評価した。

本研究で採用した市販品として購入可能な抗ヒト MCU 抗体は、ヒト MCU の N 末端領域 (His47-Val152) の組み換えタンパク質を抗原として使用して調製されたものである (AB_{MCU1}) (Fig. 2-1)。これに加えて、マウス MCU の Ala214-Thr232, Lys304-Ala322, Asn317-Leu341 に相当する 3 種類のペプチドを合成した。これらのペプチドを抗原として、3 種類の抗血清を調製した (それぞれ AB_{MCU2}, AB_{MCU3}, AB_{MCU4} [Fig. 2-1])。なお、マウス MCU とヒト MCU におけるタンパク質の同一性はほぼ 100%であることを確認しており、ヒト MCU とマウス MCU 間で高い免疫交差性が予測される (Fig. 2-2)。

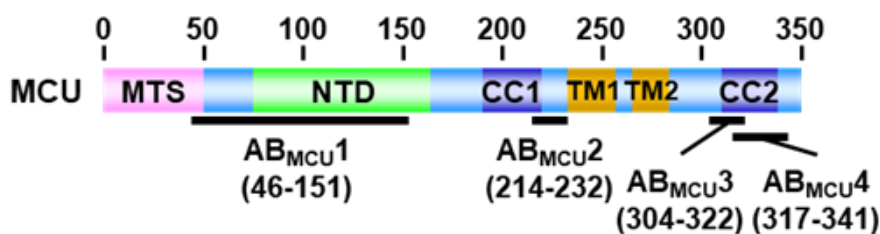


Fig. 2-1 マウス MCU における本研究で用いた抗体の認識部位

マウス MCU のドメインおよびモチーフを示した。それぞれの名称と領域は以下の通りである; MTS: ミトコンドリア移行シグナル (Met1-Thr49)、NTD: N 末端ドメイン (Val74-Arg164)、CC: コイルドコイルドメイン (CC1: Ile191-Arg220, CC2: Arg310-Gln338)、TM: 膜貫通領域 (TM1: Leu233-Glu256, TM2: Val265-Val282)。本研究で使用した 4 種類の抗マウス MCU 抗体 (AB_{MCU1-4}) の認識部位をそれぞれ太線で示した。

```

MCU_HUMAN MAAAAGRSLLLLLSRGGGGGGAGGCGALTAGCFPGLGVSRRHQQQHHRTVHQRIASWQN 60
*****.**** *****:*.***.***.***.
MCU_MOUSE MAAAAGRSLLLLLCSRGG-GGGAGGCGALTAGCFPGLGVSRRHPHQQHRTAHQRPASWQS 59
MCU_HUMAN LGAVYCSTVVPABMCU1DDVTVVYQNGLPVISVRLPSRRERCQFTLKPISDSVGVFLRQLQEEDR 120
:*.*****
MCU_MOUSE VGAAVCSTVVPDDVTVVYQNGLPVISVRLPSRRERCQFTLKPISDSVGVFLRQLQEEDR 119
MCU_HUMAN GIDRVAIYSPDGVRVAASTGIDLLLLDDFKLVINDLTYHVRPPKRDLLSHENAATLNDVK 180
*****:*****
MCU_MOUSE GIDRVAIYSPDGVRVAASTGIDLLLLDDFKLVINDLTYHVRPPKRDLLSHEDAATLNDVK 179
MCU_HUMAN TLVQQLYTTLCIEQHQLNKERELIERLEDLKEQLAPLEKVRIEISRKAEKRTTLVLWGGL 240
*****:*****
MCU_MOUSE TLVQQLYTTLCIEQHQLNKERELVERLEDLKQQLAPLEKVRIEISRKAEKRTTLVLWGGL 239
MCU_HUMAN AYMATQFGILARLTWWEYSWDIMEPVTYFITYGSAMAMYAYFVMTRQEYVYPEARDRQYL 300
*****
MCU_MOUSE AYMATQFGILARLTWWEYSWDIMEPVTYFITYGSAMAMYAYFVMTRQEYVYPEARDRQYL 299
MCU_HUMAN LFFHKGAKKSRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKRLRDPLQVHLPLRQIGEKE 351
*****:
MCU_MOUSE LFFHKGAKKSRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKRLRDPLQVHLPLRQIGEKE 350

```

AB_{MCU3} AB_{MCU4}

Fig. 2-2 ヒト MCU とマウス MCU におけるアミノ酸配列の比較

ヒト MCU (Uniprot ID:Q8NE86)およびマウス MCU (Uniprot ID:Q3UMR5)のアミノ酸配列を示した。アスタリスク (*)は両者で一致しているアミノ酸残基を示し、ドット (“.”または“:”)は両者で性質が類似しているアミノ酸残基を示している。各抗 MCU 抗体 (AB_{MCU1}~AB_{MCU4})の認識部位は赤字と下線で示した。

これらの抗体の特異性を評価するために、マウス脳および HeLa 細胞から単離したミトコンドリアに対して、それぞれの抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

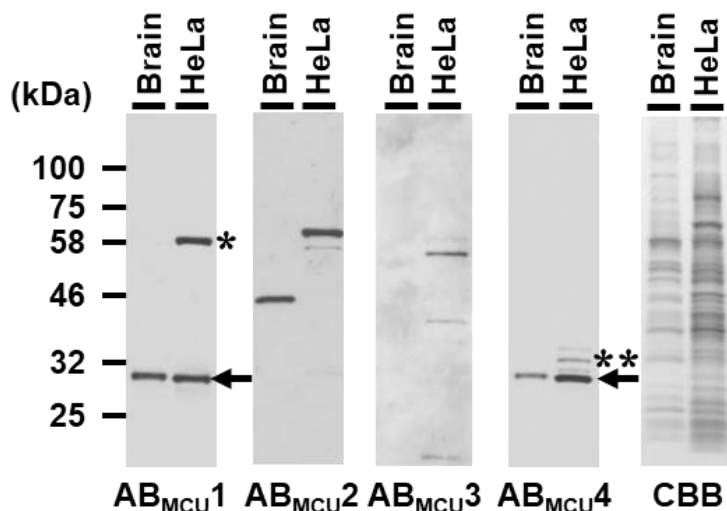


Fig. 2-3 ウェスタンブロッティングによる各抗マウス MCU 抗体の特異性の評価

マウス脳および HeLa 細胞から単離したミトコンドリアをそれぞれ 5.0 μ g、10.0 μ g 使用し、SDS-PAGE に供した。泳動後、CBB 染色 (CBB) および各抗 MCU 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った (AB_{MCU1}~AB_{MCU4})。成熟 MCU と同じ移動度を示すバンドを矢印で示した。AB_{MCU1} および AB_{MCU4} において非特異的な反応によって検出されたバンドはそれぞれアスタリスク (*, **) で示した。

マウス MCU の Met1-Thr49 はミトコンドリア移行シグナル (MTS, mitochondrial targeting signal) として機能しており、MCU がミトコンドリアへ移行した後に切断を受け、成熟 MCU となる (Fig. 2-1)。Fig. 2-3 において AB_{MCU1}~AB_{MCU4} を用いたウェスタンブロッティングの結果、免疫反応性のバンドが明瞭に検出され、その移動度はマウスおよびヒト成熟 MCU の推定分子量 (それぞれ 34843.02, 35027.34) と一致していた (Fig. 2-3)。また、AB_{MCU2} および AB_{MCU3} では MCU との免疫反応は見られなかった。原因は不明だが、免疫した抗原が形成する二次構造と SDS-PAGE での変性条件下における検出タンパク質 (MCU) の構造との違いが可能性として考えられる。AB_{MCU1} を用いた結果では、高分子量側 (約 58 kDa) に免疫反応性のバンドが検出された。また、AB_{MCU4} では成熟 MCU よりわずかに高分子量側に同様のバンドが検出された。以上より、最も明瞭に MCU を示すバンドが検出された AB_{MCU1} が MCU の定量的な解析に適していると判断した。

Fig. 2-3 において AB_{MCU1} の高分子量側に検出されるバンドが MCU を含んだ複合体を検出したバンドであるか、非特異的な免疫反応性の結果検出されたバンドであるか明らかにするために、MCU 欠損 HeLa 細胞から単離したミトコンドリアを同様にウェスタンブロットティングに供した (Fig. 2-4)。その結果、30 kDa 周辺の成熟 MCU を示すバンドは完全に消失した一方で、高分子量側で検出されるバンドは野生型と同様に MCU を欠損させた場合にも検出された。これは高分子量側のバンドが MCU オリゴマーなどではなく AB_{MCU1} が他のタンパク質と特異的に反応して見られたバンドであることを意味している。これらの結果から、 AB_{MCU1} において MCU を示すバンドは 30 kDa に検出されるバンドだけであることが分かった。このことから、このバンドのシグナル強度を用いて MCU の定量的解析を行うこととした。

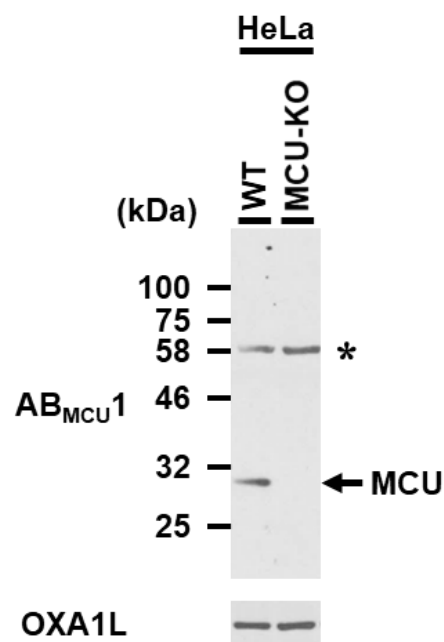


Fig. 2-4 MCU 欠損 HeLa 細胞 (MCU-KO) に対する AB_{MCU1} の反応性

野生型の HeLa 細胞 (WT) および MCU がノックアウトされた HeLa 細胞 (MCU-KO) から単離したミトコンドリアをそれぞれ 10 μ g/レーンで SDS-PAGE に供し、 AB_{MCU1} を用いたウェスタンブロットティングを行った結果。ローディングコントロールとして、ヒト OXA1L を抗 OXA1L 抗体 (Santa Cruz, sc-136011) で検出した。

EMRE に関しても、マウス成熟 EMRE の N 末端領域にあたる Val48-Ser64 に相当する合成ペプチドを抗原として用いて AB_{EMRE1} を調製した (Fig. 2-5)。また、市販品として購入可能な抗 EMRE 抗体として、過去に複数の研究グループが使用している抗体 (anti-EMRE polyclonal antibody C22orf32 (C-12))を使用した (本研究では AB_{EMRE2} とする) [20,28,46,47]。

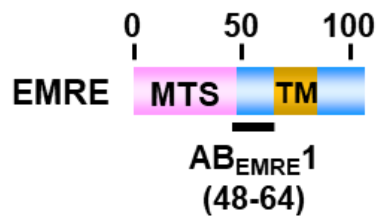


Fig. 2-5 マウス EMRE における抗 EMRE 抗体 (AB_{EMRE1}) の認識部位

マウス EMRE におけるドメインおよびモチーフを示した。それぞれの名称と領域は以下の通りである; MTS: ミトコンドリア移行シグナル (Met1-Ser47)、TM: 膜貫通領域 (Phe65-Ile84)。また、本研究で使用した抗マウス EMRE 抗体 (AB_{EMRE1}) の認識部位を太線で示した。

AB_{EMRE1} と AB_{EMRE2} を用いてマウス組織および HeLa から単離したミトコンドリアをウェスタンブロットティングに供した結果、両抗体で明瞭な免疫反応性のバンドが同じ移動度に検出された (Fig. 2-6)。MCUと同様に、EMREもミトコンドリア移行シグナルが切断されることで成熟 EMREとして機能する (Fig. 2-5)。Fig. 2-6 より、検出されたバンドの移動度はマウス成熟 EMRE の分子量 (6109.04)と一致していた。また、AB_{EMRE2} は単一のバンドとして検出されたが、AB_{EMRE1} では高分子量側に非特異的な免疫反応性によるバンドが検出された。

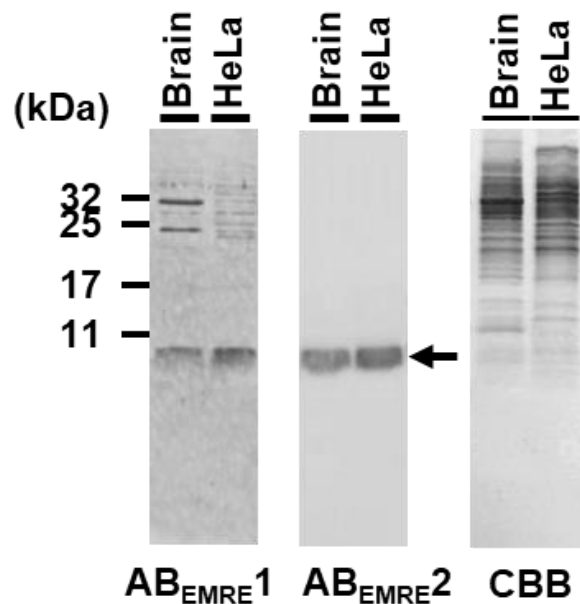


Fig. 2-6 ウェスタンブロットティングを用いた各抗 EMRE 抗体の特異性の評価

マウス脳および HeLa 細胞から単離したミトコンドリアに対して、それぞれの抗 EMRE 抗体 (AB_{EMRE1}, AB_{EMRE2}) を用いたウェスタンブロットティングの結果と CBB 染色の結果を示した。成熟 EMRE と同等の移動度を示すバンドを矢印で示した。

更に、両抗体で検出されたバンドが目的のタンパク質 (EMRE)を示すバンドであることを確認するために、EMRE 欠損 HeLa 細胞から単離したミトコンドリアをウェスタンブロットティングに供した。その結果、野生型において 10 kDa に見られたバンドは完全に消失した (Fig. 2-7)。

以上の結果から、EMRE の定量的解析にはより EMRE に対する特異性の高い AB_{EMRE2} が適していると判断した。

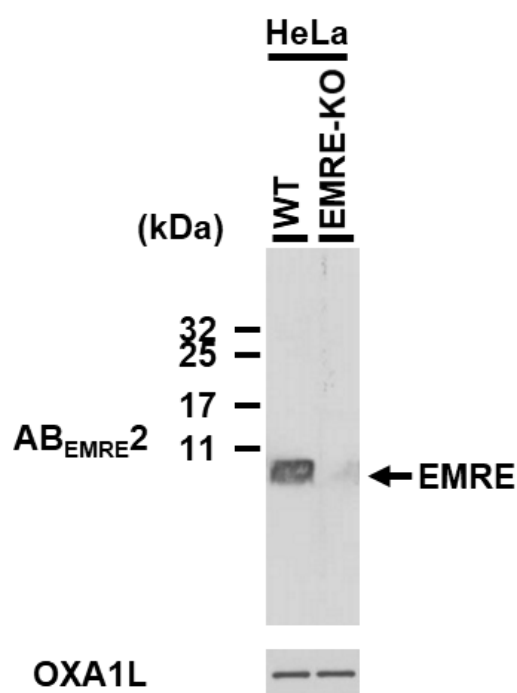


Fig. 2-7 EMRE 欠損 HeLa 細胞 (EMRE-KO)に対する AB_{EMRE2} の反応性

野生型の HeLa 細胞 (WT)および EMRE がノックアウトされた HeLa 細胞 (EMRE-KO)から単離したミトコンドリアをそれぞれ 10 µg/レーンで SDS-PAGE に供し、AB_{EMRE2} を用いたウェスタンブロットティングを行った結果。ローディングコントロールとして、ヒト OXA1L を抗 OXA1L 抗体 (Santa Cruz, sc-136011)で検出した。

これまでの解析により、EMRE の定量的解析に市販品として購入可能な AB_{EMRE2} が有用であることが分かった。しかし、この抗体が認識する抗原のエピトープ領域は公表されておらず、明らかとなっていない。そこで AB_{EMRE2} を定量的な解析に用いるために、AB_{EMRE2} の認識部位の推定を試みた。

本抗体の認識部位を調べるために、抗原となる EMRE について、様々な領域の欠損変異体を作製し、それらに対する免疫反応性を比較することにした。最初に、大腸菌による EMRE 欠損変異体タンパク質の調製を試みたが、大腸菌発現系での EMRE の発現は困難であった（データは示さない）。これまでに、当研究室では、本来ミトコンドリア Ca²⁺ 取込機能を持たない酵母ミトコンドリアにマウスの EMRE を機能的に発現させる実験系（酵母再構成系）の構築に成功している [21,29]。そこで、酵母再構成系を利用して、特にマウス EMRE の C 末側領域に注目して構築した欠損変異体を酵母ミトコンドリアに発現させ、この酵母から単離・調製したミトコンドリアを用いて、AB_{EMRE2} の抗体認識部位に関する解析を進めることを試みた (Fig. 2-8, 2-9) [21,22]。

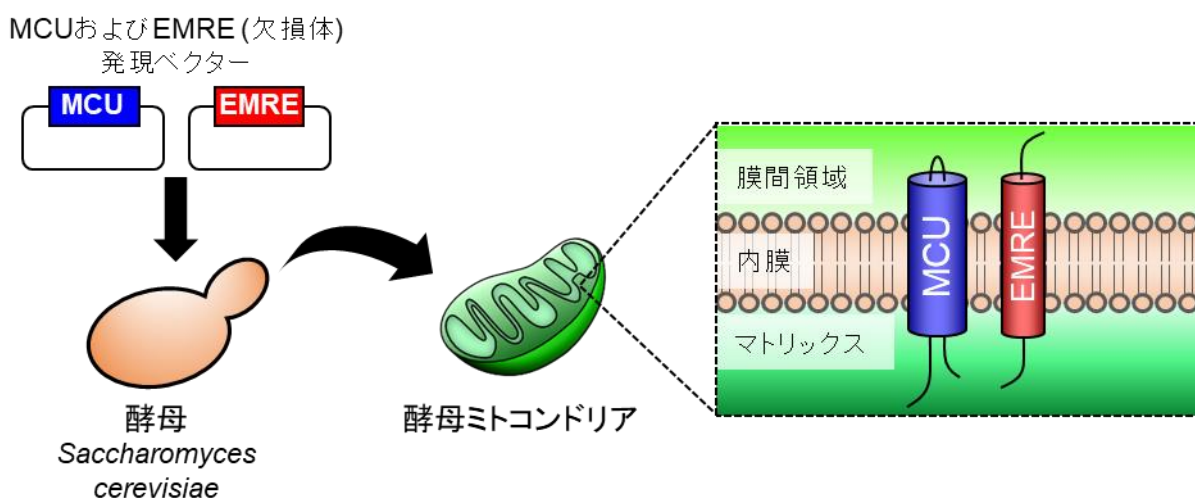


Fig. 2-8 酵母発現系を用いた EMRE 欠損変異体の発現・再構成

酵母ミトコンドリアにおけるマウス EMRE 欠損変異体および MCU の発現と再構成。カルシウム取込機能はヒトから真菌に至るまで広く保存されているが、酵母ミトコンドリアでは欠損しており、これらの内在的な発現が見られない。そのため、哺乳類の MCU, EMRE の酵母発現用発現ベクターを導入することで機能的な各サブユニットを発現・再構成することができる。

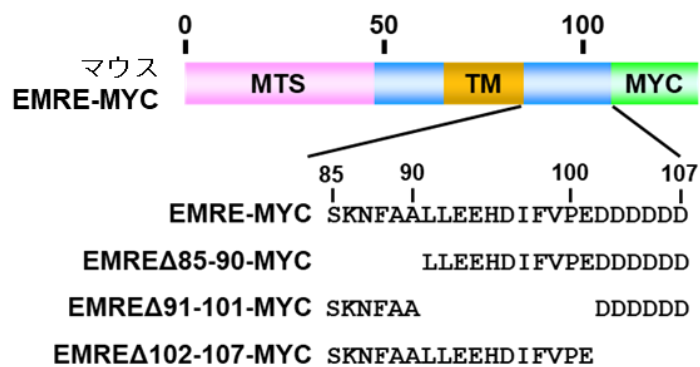


Fig. 2-9 作製したマウス EMRE 欠損変異体の配列

完全長のマウス EMRE および作製したマウス EMRE の欠損変異体。それぞれ C 末端側にエピトープタグとして MYC タグを融合した。

酵母へ MCU および EMRE 欠損変異体の発現ベクターを導入後、単離・調製した酵母ミトコンドリアをウェスタンブロッティングに供することで、ミトコンドリアに発現している各種マウス EMRE 欠損変異体への AB_{EMRE2} の反応性を調べた (Fig. 2-10)。

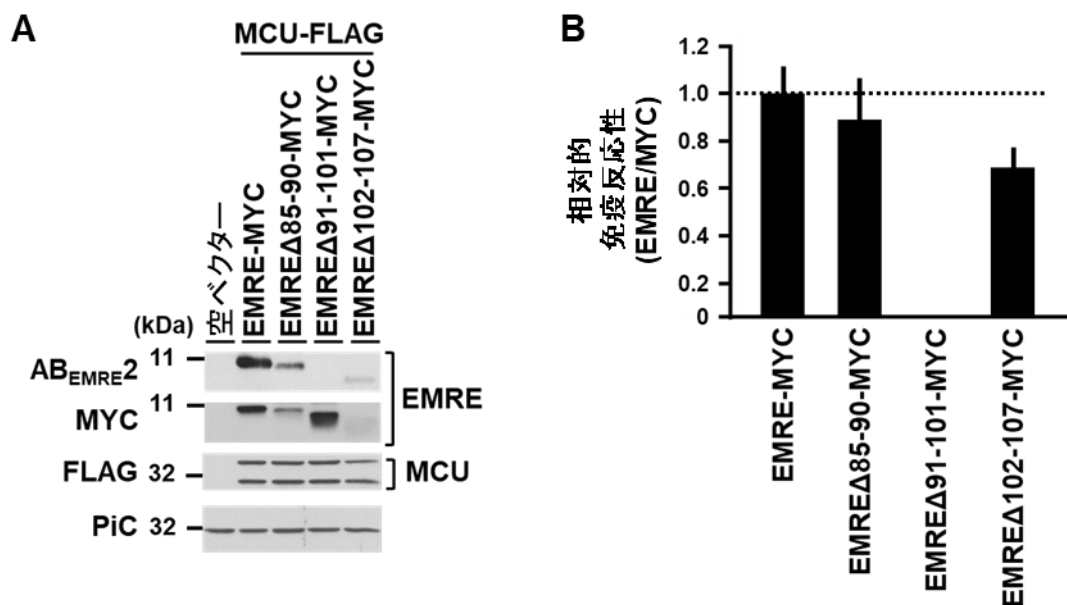


Fig. 2-10 ウェスタンブロッティングによる AB_{EMRE2} における認識部位の推定

(A) Fig. 2-9 で示した各 MYC タグ融合 EMRE 欠損変異体および FLAG タグ融合 MCU を発現した酵母から単離したミトコンドリア (10 μg/レーン) を用いたウェスタンブロッティングの結果。EMRE タンパク質の検出には AB_{EMRE2} および抗 MYC 抗体を用いた。抗 MCU 抗体によって検出された 2 本のバンドはそれぞれ上が未成熟な MCU、下が成熟 MCU を示す。ローディングコントロールとして、PiC を特異抗体で検出した。(B) 各 EMRE 欠損変異体に対する AB_{EMRE2} の相対的な反応性を示した。AB_{EMRE2} で検出された各バンドのシグナル強度を抗 MYC 抗体で検出されたバンドのシグナル強度で割った値を相対的な反応性とした。

Fig. 2-10A より、全ての EMRE 欠損変異体の発現を抗 MYC タグ抗体を用いて確認することができた。また、抗 FLAG 抗体における結果から、全ての酵母ミトコンドリアにおいて MCU-FLAG の共発現を確認した。次に、AB_{EMRE2} において、抗 MYC タグ抗体で検出されたバンドと同じ移動度に検出されたバンドのシグナル強度を比較することで AB_{EMRE2} の認識部位を推定した (Fig. 2-10B)。なお、抗 MYC タグ抗体での検出結果より、各 EMRE 欠損変異体の発現量はそれぞれ異なっていることが分かっている (Fig. 2-10A)。このことから、AB_{EMRE2} における検出結果は抗原のエピトープの欠損による影響以外にそれぞれの発現量を反映していることが予想される。そのため、発現量の差を補正するために、抗 MYC 抗体で検出されたバンドのシグナル強度を基にして、完全長の EMRE に対する相対的な免疫反応性 (EMRE/MYC) を算出し、これらの比較を行った。

その結果、AB_{EMRE2} は Leu91-Glu101 を欠損した EMRE 変異体 (EMRE Δ91-101-MYC)に 対して反応性を示さなかった。このことから、AB_{EMRE2} の認識部位は主にマウス EMRE の Leu91-Glu101 に位置していると結論した。

また、AB_{EMRE1} と AB_{EMRE2} における認識部位のアミノ酸配列はマウス EMRE とヒト EMRE で 完全に一致しており、これらの抗体がマウス EMRE だけでなくヒト EMRE にも使用できることが確 認された (Fig. 2-11)。

```
EMRE_HUMAN MASGAARWLVLAPVRSALRSGPSLRKGDVSAAWSGSGRSLVPSRSLVIVTRSGAILPKP 60
            *** ** * . * * * * * * * . : * * * * : . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EMRE_MOUSE MASTAARRLAWVAVRPGALWVGPRGRRGGDVYTVPGSSGLSQVPSRSLVIVTRSGAILPKP 60
                                         ABEMRE1
EMRE_HUMAN VKMSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSKNFAALLEEHDFVPEDDDDDD 107
            * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
EMRE_MOUSE VKMSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSKNFAALLEEHDFVPEDDDDDD 107
                                         ABEMRE2
```

Fig. 2-11 ヒト EMRE とマウス EMRE におけるアミノ酸配列の比較

ヒト EMRE (Uniprot ID:Q9H4I9)およびマウス EMRE (Uniprot ID:Q9DB10)のアミノ酸配列を示した。アスタリスク (*)は両者で一致しているアミノ酸残基を示し、ドット (“.”または“:”)は両者で性質が類似しているアミノ酸残基を示している。各抗 EMRE 抗体 (AB_{EMRE1}, AB_{EMRE2})の認識部位は青字と下線で示した。

以上の結果より、MCU と EMRE の定量的な解析を行うために最適な抗体を、それぞれ AB_{MCU1}, AB_{EMRE2} とし、これらの抗体を以降の MCU, EMRE のタンパク質レベルでの定量解析 に用いることとした。

2.2.2 標準タンパク質としての MCU および EMRE の組み換えタンパク質の調製

マウス MCU の Met1-Thr49 はミトコンドリア移行シグナル (MTS, mitochondrial targeting signal)として機能しており、MCU がミトコンドリアへ移行した後に切断を受け、成熟 MCU となる (Fig. 2-12)。大腸菌内では MTS の切断が起こらないため、大腸菌発現系を用いて成熟 MCU の標準タンパク質を調製する場合は MTS を予め除く必要がある。この考えを基に、MTS を除いたマウス MCU のタンパク質コード領域 (Ala50-Glu350)を大腸菌発現用ベクター-pET-3a に組み込んだ。これを用いて大腸菌 BL21(DE3)plysS を形質転換し、そのライセートを CBB 染色およびウェスタンブロットティングに供することで成熟 MCU の発現を確認した (Fig. 2-13)。

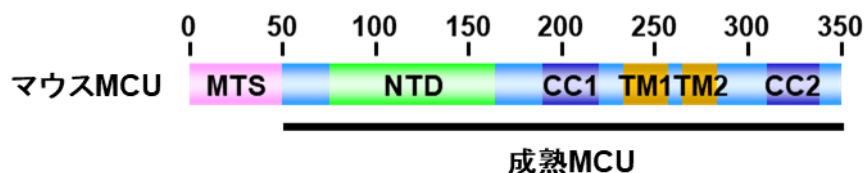


Fig. 2-12 マウス MCU におけるミトコンドリア移行シグナルと成熟 MCU

成熟 MCU (Ala50-Glu350)の領域を太線で示した。

大腸菌において成熟 MCU を発現させた場合、その発現タンパク質の大部分は細胞ライセート遠心後の沈殿画分で得られることから、発現させた MCU は封入体として存在していることが示唆された (Fig. 2-13)。その後、粗抽出した MCU について逆相クロマトグラフィーを用いて精製した。精製 MCU 画分を SDS-PAGE に供し、泳動後のアクリルアミドゲルを CBB で染色したところ、成熟 MCU の分子量 (34843.02)を示す移動度に明瞭な単一のバンドが検出された (Fig. 2-13、左図)。更に、AB_{MCU1} を用いたウェスタンブロットティングでは対応するバンドへの特異的な反応を確認した (Fig. 2-13、右図)。

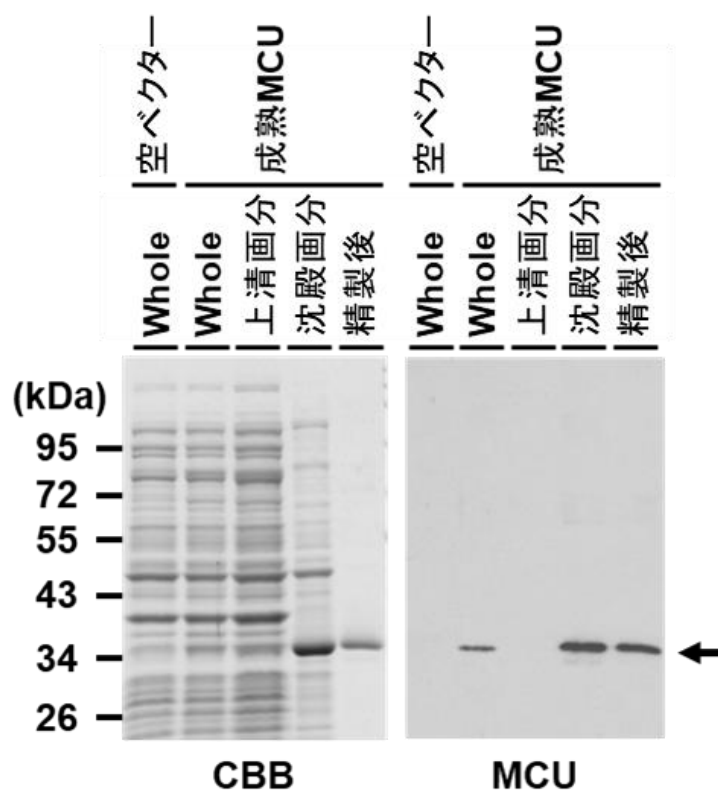


Fig. 2-13 MCU タンパク質の精製画分に対する CBB 染色およびウェスタンブロットティング

大腸菌発現系を用いて得られた成熟 MCU タンパク質について SDS-PAGE およびウェスタンブロットティングに供した結果。ウェスタンブロットティングでは AB_{MCU1} を一次抗体として使用した。左から、空ベクターを導入した大腸菌の Whole ライセート (“Whole”)、成熟 MCU の発現ベクターを導入した大腸菌の Whole ライセート、ライセート遠心後の上清画分および沈殿画分、逆相クロマトグラフィーを用いて精製された成熟 MCU (“精製後”)をそれぞれ示している。

同様に、大腸菌発現系を用いたマウス成熟 EMRE の調製も試みたが、大腸菌における EMRE タンパク質の発現量は極めて少なく、発現条件を様々に検討した場合にも、本研究で必要とされる EMRE タンパク質量を獲得できるような発現系構築は困難であった(データは示さない)。この原因は不明だが、成熟 EMRE の約 50%の amino acid 残基は疎水性 amino acid に分類されることから、大腸菌における EMRE の発現量の低さはその疎水性の高さが関係している可能性が考えられる。

成熟 EMRE は分子量 6109.04 の小さなタンパク質であることから、次に成熟 EMRE 全長の化学合成を試みた。König らによって、ヒト EMRE はミトコンドリアに移行後 Arg52 の位置で切断されることが過去に報告されている(Fig. 2-14)[46]ことから、マウス EMRE の Ser53-Asp107 を成熟 EMRE として化学的に合成した。

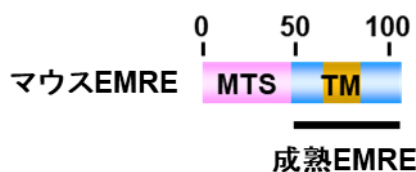


Fig. 2-14 マウス EMRE におけるミトコンドリア移行シグナルと成熟 EMRE

成熟 EMRE (Ser53-Asp107)の領域を太線で示した。

得られた成熟 EMRE を逆相クロマトグラフィーで精製後 SDS-PAGE に供し、泳動後のゲルを CBB 染色した。その結果、合成タンパク質は単一のバンドとして検出され、他のタンパク質を示すバンドは検出されなかった。また、 AB_{EMRE2} を用いたウェスタンブロットティングでは CBB 染色で検出されたバンドと同じ移動度に免疫反応性のバンドが得られた (Fig. 2-15)。

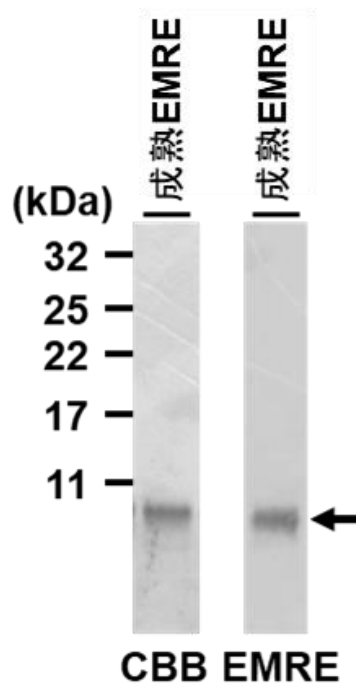


Fig. 2-15 化学合成した EMRE タンパク質に対する CBB 染色およびウェスタンブロットティング

化学的に合成した成熟 EMRE を SDS-PAGE 後、CBB 染色とウェスタンブロットティングに供した結果。ウェスタンブロットティングには AB_{EMRE2} を一次抗体として使用した。

続いて、得られた精製 MCU タンパク質と化学合成した EMRE タンパク質について、目的タンパク質であることを確認する目的で、それぞれのタンパク質試料を Trypsin/Lys-C により消化し、得られたペプチド試料に対して、LC-MS/MS 解析とそれに続くデータベース解析に供することにより、各タンパク質のアミノ酸配列情報を解析した (Table 2-1, 2-2)。その結果、両タンパク質とも、マウス MCU とマウス EMRE のほぼ全領域をカバーするペプチドがそれぞれ同定され、目的のタンパク質が得られていることが確認された。

Table 2-1 組み換え MCU の MS/MS 解析

マウスMCU内 アミノ酸領域	ペプチド配列	修飾	実験での 質量 ¹⁾	理論質量 ²⁾	マウスMCU内 アミノ酸領域	ペプチド配列	修飾	実験での 質量 ¹⁾	理論質量 ²⁾
P54-R88	PASWQSGVAAAYCSTVVPSDDVTV VYQNGLPVISVR		3720.8406	3720.8457	I221-R225	IEISR		616.3546	616.3544
P54-R88	PASWQSGVAAAYCSTVVPSDDVTV VYQNGLPVISVR		3720.8416	3720.8457	T231-R251	TTLVLWGGGLAYMATQFGILAR		2281.228	2281.2292
E94-R112	ERCQFTLKPISDSVGVFLR		2251.1777	2251.1782	Q286-R294	QEYVYPEAR		1153.5393	1153.5404
C96-K101	CQFTLK		795.3944	795.3949	Q286-R294	QEYVYPEAR		1153.5406	1153.5404
P102-R112	PISDSVGVFLR		1188.6503	1188.6503	Q286-R294	QEYVYPEAR	Oxidation (Tyr)	1169.5339	1169.5353
Q113-R123	QLQEEDRGIDR		1357.6571	1357.6586	Q286-R294	QEYVYPEAR	Oxidation (Tyr)	1169.5345	1169.5353
Q113-R123	QLQEEDRGIDR		1357.6578	1357.6586	Q286-R294	QEYVYPEAR	Oxidation (Tyr)	1169.5349	1169.5347
Q113-R123	QLQEEDRGIDR		1357.6588	1357.6586	D295-K304	DRQYLLFFHK		1365.719	1365.7194
V124-R133	VAIYSPDGVV		1075.5671	1075.5662	D295-K304	DRQYLLFFHK		1365.7194	1365.7194
V124-R133	VAIYSPDGVV	Oxidation (Tyr)	1091.5605	1091.5611	D295-K304	DRQYLLFFHK		1365.7202	1365.7194
L150-K163	LVINDLTYHVRPPK		1663.9393	1663.941	K308-K331	KSRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLK		2853.4702	2853.4695
L150-K163	LVINDLTYHVRPPK		1663.9399	1663.941	K308-K331	KSRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLK		2853.4727	2853.4695
L150-K163	LVINDLTYHVRPPK		1663.9406	1663.941	K308-R332	KSRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKR		3009.5623	3009.5706
L150-K163	LVINDLTYHVRPPK		1663.9409	1663.941	K308-R332	KSRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKR		3009.5674	3009.5706
L150-K163	LVINDLTYHVRPPK		1663.9409	1663.941	K308-R332	KSRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKR		3009.5698	3009.5706
L150-K163	LVINDLTYHVRPPK		1663.9417	1663.941	K308-R332	KSRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKR		3009.5713	3009.5706
L150-R164	LVINDLTYHVRPPKR		1820.0425	1820.0421	S309-K315	SRFDLEK		893.4608	893.4607
L150-R164	LVINDLTYHVRPPKR		1820.0448	1820.0421	S309-K315	SRFDLEK		893.4612	893.4607
R164-K179	RDLLSHEDAATLNDVK		1795.9056	1795.9064	S309-K315	SRFDLEK	Oxidation (Phe)	909.4548	909.4556
R164-K179	RDLLSHEDAATLNDVK		1795.9062	1795.9064	S309-K320	SRFDLEKYNQLK		1539.804	1539.8044
R164-K179	RDLLSHEDAATLNDVK		1795.9069	1795.9064	S309-K320	SRFDLEKYNQLK		1539.8046	1539.8045
R164-K179	RDLLSHEDAATLNDVK		1795.9069	1795.9064	S309-K331	SRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLK		2725.373	2725.3745
R164-K179	RDLLSHEDAATLNDVK		1795.907	1795.9064	S309-K331	SRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLK		2725.376	2725.3745
R164-K179	RDLLSHEDAATLNDVK		1795.9071	1795.9064	S309-R332	SRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKR		2881.4751	2881.4756
R164-K198	RDLLSHEDAATLNDVKTLVQQLY TLCIEQHQLNK		4107.1079	4107.106	S309-R332	SRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKR		2881.4751	2881.4756
R164-K198	RDLLSHEDAATLNDVKTLVQQLY TLCIEQHQLNK		4107.1089	4107.106	S309-R332	SRFDLEKYNQLKDAIAQAEMDLKR		2881.4753	2881.4756
R164-K198	RDLLSHEDAATLNDVKTLVQQLY TLCIEQHQLNK		4107.1104	4107.106	F311-K315	FDLEK		650.3273	650.3275
D165-K179	DLLSHEDAATLNDVK		1639.8033	1639.8053	F311-K320	FDLEKYNQLK		1296.6711	1296.6714
D165-K179	DLLSHEDAATLNDVK		1639.8051	1639.8053	F311-K320	FDLEKYNQLK		1296.6713	1296.6714
D165-K179	DLLSHEDAATLNDVK		1639.8069	1639.8053	F311-K320	FDLEKYNQLK		1296.6719	1296.6714
D165-K179	DLLSHEDAATLNDVK	Oxidation (Ser)	1655.7944	1655.8002	Y316-K331	YNQLKDAIAQAEMDLK		1849.923	1849.9244
D165-K198	DLLSHEDAATLNDVKTLVQQLYT TLCIEQHQLNK		3951.0054	3951.0049	Y316-R332	YNQLKDAIAQAEMDLKR		2006.0258	2006.0255
D165-K198	DLLSHEDAATLNDVKTLVQQLYT TLCIEQHQLNK		3951.0142	3951.0049	D321-K331	DAIAQAEMDLK		1203.5814	1203.5805
T180-K198	TLVQQLYTTLCIEQHQLNK		2329.2102	2329.21	D321-K331	DAIAQAEMDLK	Oxidation (Met)	1219.5765	1219.5756
T180-K198	TLVQQLYTTLCIEQHQLNK		2329.2124	2329.21	D321-R332	DAIAQAEMDLKR		1359.6818	1359.6816
T180-K198	TLVQQLYTTLCIEQHQLNK	Oxidation (Tyr)	2345.2036	2345.2049	D321-R332	DAIAQAEMDLKR		1359.682	1359.6816
E199-R205	ERELVER		929.4935	929.493	D321-R332	DAIAQAEMDLKR		1359.6821	1359.6816
E199-R205	ERELVER		929.4938	929.493	D321-R332	DAIAQAEMDLKR		1359.683	1359.6816
E201-K210	ELVERLEDLK		1242.6815	1242.682	D321-R332	DAIAQAEMDLKR	Oxidation (Met)	1375.676	1375.6755
E201-K210	ELVERLEDLK		1242.6818	1242.682	D321-R332	DAIAQAEMDLKR	Oxidation (Met)	1375.6763	1375.6765
E201-K210	ELVERLEDLK		1242.6819	1242.682	D321-R332	DAIAQAEMDLKR	Oxidation (Met)	1375.677	1375.6765
E201-K210	ELVERLEDLK		1242.682	1242.682	R332-R344	RLRDPLQVHLPLR		1611.9683	1611.9685
E201-K210	ELVERLEDLK		1242.6825	1242.682	R332-R344	RLRDPLQVHLPLR		1611.9683	1611.9685
L206-K218	LEDLKQQLAPLEK		1523.8555	1523.8559	R332-R344	RLRDPLQVHLPLR		1611.9688	1611.9685
L206-K218	LEDLKQQLAPLEK		1523.8563	1523.856	L333-R344	LRDPLQVHLPLR		1455.8676	1455.8674
L206-K218	LEDLKQQLAPLEK		1523.8571	1523.856	L333-R344	LRDPLQVHLPLR		1455.8678	1455.8674
L206-K218	LEDLKQQLAPLEK		1523.8573	1523.856	L333-R344	LRDPLQVHLPLR		1455.8682	1455.8674
Q211-K218	QQLAPLEK		925.5237	925.5233	D335-R344	DPLQVHLPLR		1186.6821	1186.6822
Q211-R220	QQLAPLEKVR		1180.6925	1180.6927	D335-R344	DPLQVHLPLR		1186.6821	1186.6822
Q211-R220	QQLAPLEKVR		1180.6931	1180.6928	D335-R344	DPLQVHLPLR		1186.6825	1186.6823
V219-R225	VRIEISR		871.5237	871.524	D335-R344	DPLQVHLPLR		1186.6826	1186.6823
V219-R225	VRIEISR		871.5242	871.524	D335-R344	DPLQVHLPLR		1186.6826	1186.6823

1) 実験で得られたイオン質量 (Da)

2) イオン質量の理論値 (Da)

Table 2-2 化学合成した EMRE の MS/MS 解析

マウスEMRE内 アミノ酸領域	ペプチド配列	修飾	実験での 質量 ¹⁾	理論質量 ²⁾
S53-K59	SGAILPK		684.416	684.417
S53-K62	SGAILPKPVK		1008.6326	1008.6332
S53-K62	SGAILPKPVK		1008.6328	1008.6332
S53-R69	SGAILPKPVKMSFGLLR		1813.0631	1813.0648
S53-K86	SGAILPKPVKMSFGLLRVFSIVIPF LYVGTLSK		3690.145	3690.1714
S53-K86	SGAILPKPVKMSFGLLRVFSIVIPF LYVGTLSK		3690.156	3690.1714
S53-K86	SGAILPKPVKMSFGLLRVFSIVIPF LYVGTLSK		3690.1658	3690.1714
S53-K86	SGAILPKPVKMSFGLLRVFSIVIPF LYVGTLSK		3690.167	3690.1714
P58-K86	PVKMSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSK		3023.7622	3023.7649
M63-R69	MSFGLLR		822.4412	822.4422
M63-R69	MSFGLLR		822.4415	822.4422
M63-R69	MSFGLLR	Oxidation (Met)	838.436	838.437
M63-R69	MSFGLLR	Oxidation (Met)	838.4363	838.437
M63-K86	MSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSK		2699.5469	2699.5488
M63-K86	MSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSK		2699.5479	2699.5488
M63-K86	MSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSK	Oxidation (Met)	2715.5376	2715.5395
M63-K86	MSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSK	Oxidation (Met)	2715.5403	2715.5412
M63-K86	MSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSK	Oxidation (Met)	2715.5413	2715.5412
M63-K86	MSFGLLRVFSIVIPFLYVGTLSK	Oxidation (Met)	2715.5413	2715.5412
V70-K86	VFSIVIPFLYVGTLSK		1895.1156	1895.1172
V70-K86	VFSIVIPFLYVGTLSK		1895.1157	1895.1172
N87-D107	NFAALLEEHDIFVPEDDDDD		2433.0088	2433.0132
N87-D107	NFAALLEEHDIFVPEDDDDD		2433.0098	2433.0132

1) 実験で得られたイオン質量 (Da)

2) イオン質量の理論値 (Da)

以上より、MCU と EMRE の組み換えタンパク質を高純度で得ることができたと結論づけ、これらを定量的解析における標準タンパク質として使用した。

2.2.3 組織および培養細胞から単離したミトコンドリアでの MCU, EMRE の定量解析

組織および培養細胞におけるミトコンドリアの MCU タンパク質量を明らかにするために、調製した MCU 組み換えタンパク質と共に、マウス脳・心臓・肝臓・腎臓と HeLa 細胞から単離したミトコンドリアをそれぞれ段階的に希釈して SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロットングを行った (Fig. 2-16)。

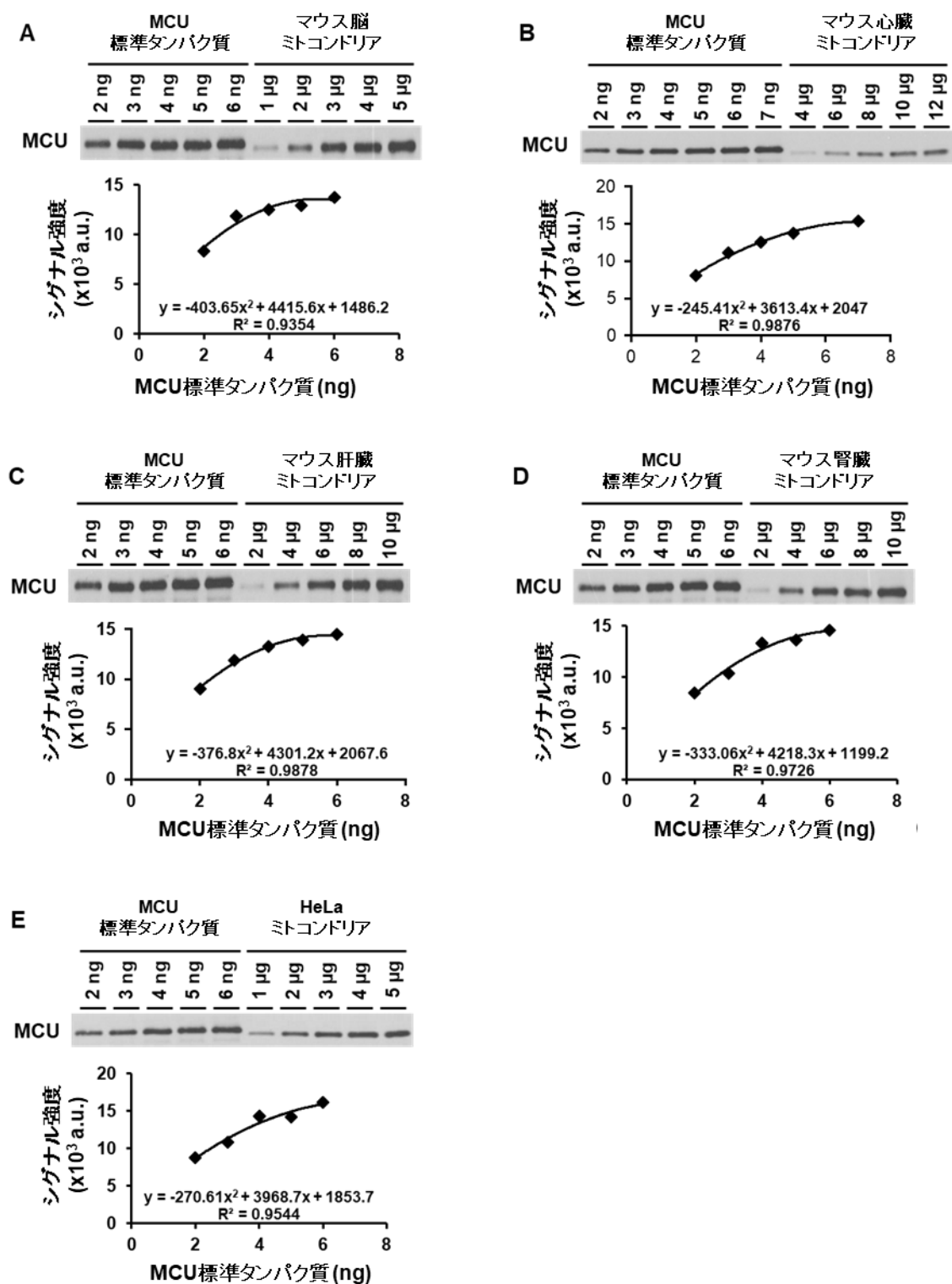


Fig. 2-16 ミトコンドリア中の MCU タンパク質の定量

標準タンパク質として調製した成熟 MCU の組み換えタンパク質とマウス組織 (脳・心臓・肝臓・腎臓)および HeLa 細胞から単離したミトコンドリアを様々な量で AB_{MCU1} を用いたウェスタンブロッティングに供した。標準タンパク質を泳動したレーンから検出されたバンドのシグナル強度を Image J によって定量し、検量線を作成した。作成した検量線を用いて、ミトコンドリア中の MCU 量を求め、平均を算出した (Table 2-3)。

MCU の組み換えタンパク質を泳動したレーンにおけるシグナル強度から、検量線を作成し、その相関係数 (R^2) が十分に高いことを確認した。得られた検量線を用いて、各組織と HeLa 細胞のミトコンドリア中の MCU タンパク質の量を算出した。各ミトコンドリアを泳動したそれぞれのレーンにおけるシグナル強度に基づいて、それぞれのミトコンドリア 1 μg における MCU の量を算出した。スミルノフ・グラブス検定法を用いて棄却検定後、ミトコンドリア 1 μg における MCU の量の平均を算出し、これを各組織および HeLa 細胞からのミトコンドリア中の MCU の含有量とした (Table 2-3)。

組織および HeLa 細胞の MCU の SDS-PAGE における分離度は成熟 MCU の組み換えタンパク質に比べてわずかに低移動度を示したが、この理由は不明である。成熟 MCU の組み換えタンパク質には大腸菌での発現のために N 末端に Met が付加されている。タンパク質における 1 アミノ酸変異はしばしば SDS-PAGE におけるタンパク質の移動度に影響を与える[48]。この N 末端に付加された Met が成熟 MCU における移動度の違いを与えている可能性がある。また、ミトコンドリア上に存在する成熟 MCU の N 末端はこれまで実験的には確認されておらず、実際には MCU のミトコンドリア移行シグナルは Thr49 よりも下流で切断されている可能性が考えられる。ミトコンドリア移行シグナルの切断について、より詳細な解析が今後必要とされる。MCU と同様に、EMRE についても同様にミトコンドリア中のタンパク質量を算出した (Fig. 2-17, Table 2-3)。

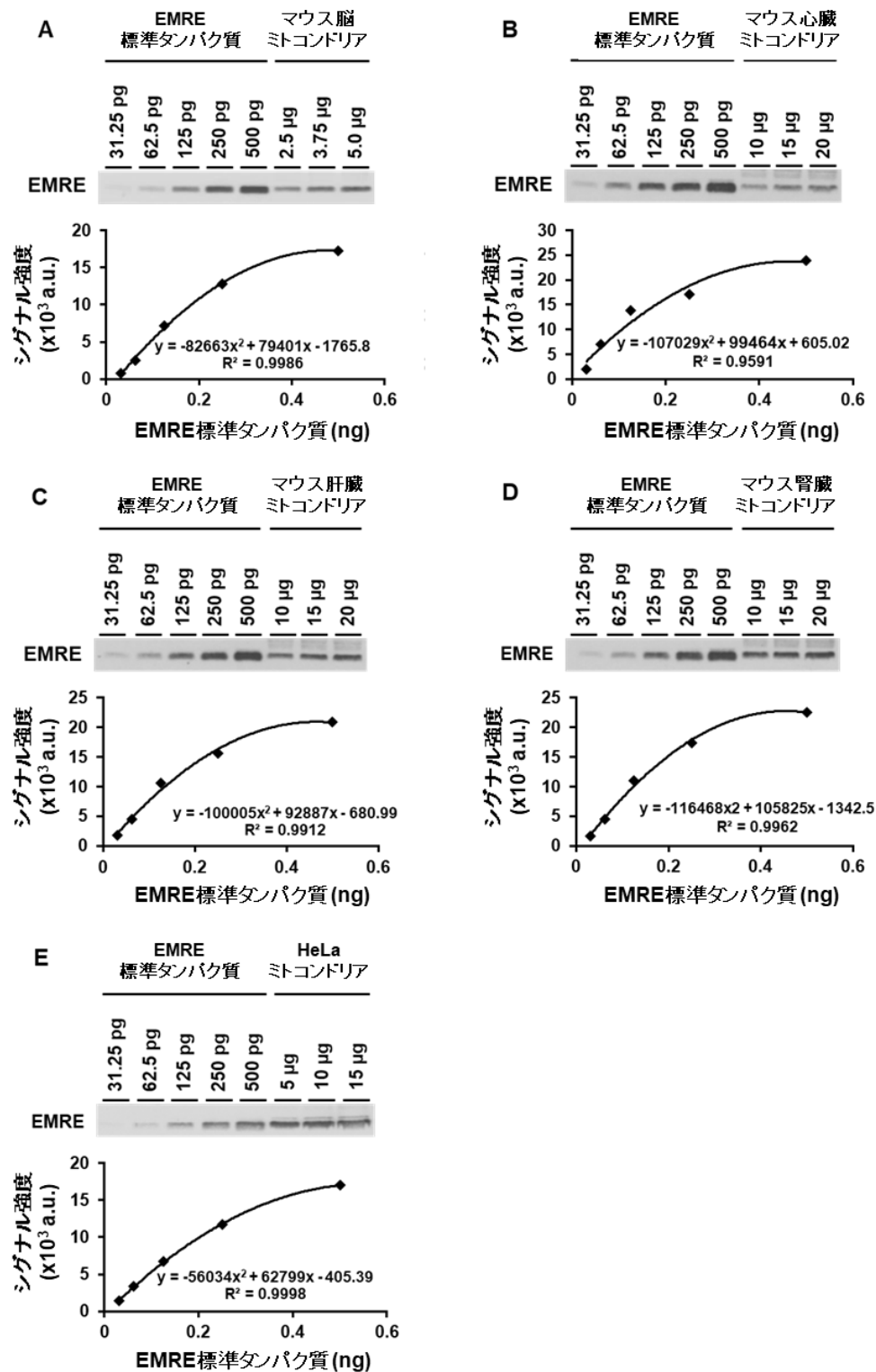


Fig. 2-17 ミトコンドリア中の EMRE の定量

標準タンパク質として調製した成熟 EMRE の組み換えタンパク質とマウス組織 (脳・心臓・肝臓・腎臓)および HeLa 細胞から単離したミトコンドリアを様々な量で AB_{EMRE2} を用いたウェスタンブロットニングに供した。MCU の定量と同様に標準タンパク質を泳動したレーンから検出されたバンドのシグナル強度を Image J によって定量し、検量線を作成した。作成した検量線を用いて、ミトコンドリア中の MCU 量を求め、平均を算出した (Table 2-3)。

Table 2-3 ミトコンドリア中の MCU, EMRE の定量結果

	MCU		EMRE		MCU : EMRE (モル比)
	pg/ μ g	fmol/ μ g	pg/ μ g	fmol/ μ g	
脳	728.52 (\pm 29.73)	20.91 (\pm 0.85)	50.30 (\pm 7.80)	8.23 (\pm 1.28)	1.00 : 0.39 (\pm 0.06)
心臓	229.47 (\pm 45.88)	6.58 (\pm 1.32)	5.90 (\pm 0.35)	0.97 (\pm 0.06)	1.00 : 0.15 (\pm 0.04)
肝臓	385.00 (\pm 90.34)	11.05 (\pm 2.59)	15.05 (\pm 3.64)	2.46 (\pm 0.60)	1.00 : 0.24 (\pm 0.09)
腎臓	480.84 (\pm 46.73)	13.8 (\pm 1.34)	15.73 (\pm 3.50)	2.58 (\pm 0.57)	1.00 : 0.19 (\pm 0.05)
HeLa	1000.08 (\pm 88.56)	28.7 (\pm 2.54)	53.16 (\pm 2.30)	8.71 (\pm 0.38)	1.00 : 0.31 (\pm 0.03)

2.2.4 認識部位の異なる抗体を用いた各標準タンパク質に対する免疫反応性の確認

2.2.3 より、マウス各組織および HeLa から単離したミトコンドリア中の MCU および EMRE の量をそれぞれ AB_{MCU1} , AB_{EMRE2} を用いて行った。しかし、実際にミトコンドリアで発現する MCU および EMRE は細胞内で種々の翻訳後修飾を受けることが考えられる。翻訳後修飾を受けた場合、そのアミノ酸残基周辺を認識する抗体の反応性は修飾のない組み換えタンパク質とは異なる可能性がある。そこで、ここまでに得られた定量結果が抗体の特性により誤っていないことを確認する目的で、Fig2-3、2-6 で得られた MCU および EMRE に対する認識部位の異なる抗体を用いて同様の定量工程を行い、使用する抗体間で得られるタンパク質定量値に大きな差異が生じないかを調べた(Fig. 2-18)。

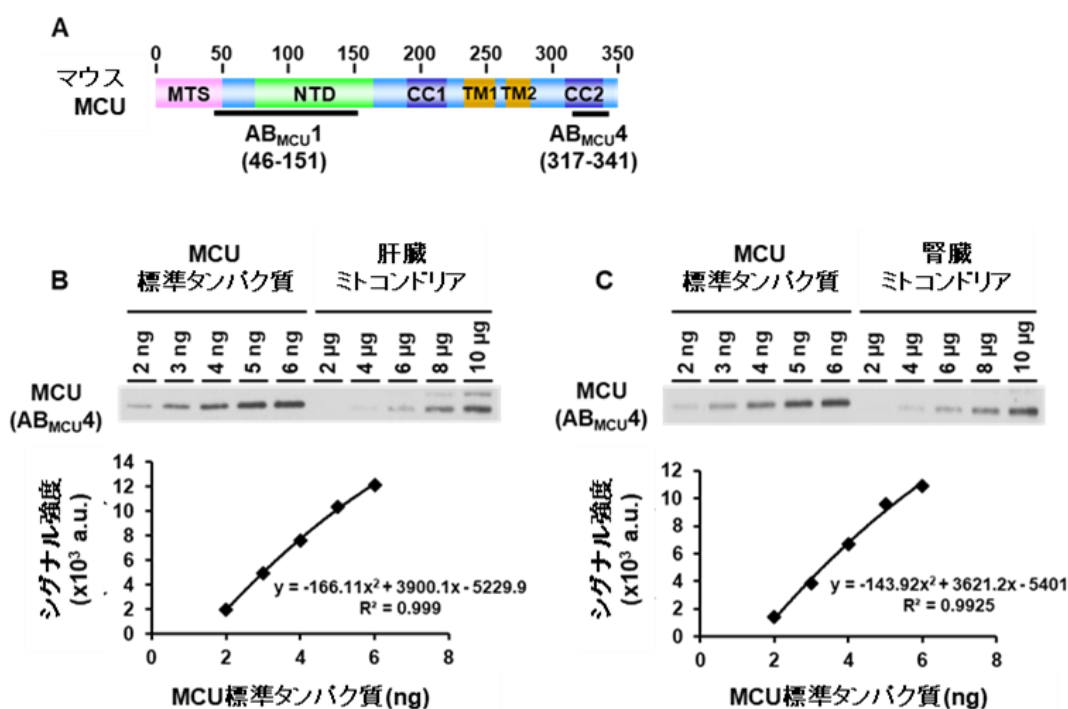


Fig. 2-18 AB_{MCU4} を用いたマウス肝臓および腎臓ミトコンドリアのウェスタンブロッティング結果

(A) 使用した抗体 (AB_{MCU1} , AB_{MCU4}) の認識部位。(B, C) 成熟 MCU の組み換えタンパク質とマウス肝臓 (B) および腎臓 (C) から単離したミトコンドリアを SDS-PAGE に供し、 AB_{MCU4} を用いてウェスタンブロッティングを行った結果。各バンドのシグナル強度は Image J によって定量した。成熟 MCU の分子量を 34843.02 としてミトコンドリア 1 μ g 中の MCU のモル数 (fmol/ μ g) を求めた。

2.2.1 より、MCU の検出を確認した抗体 (AB_{MCU4}) を用いて、同様の定量工程を行い、得られる定量値に差が無いかが調べた。Fig. 2-18, 2-19 より、認識部位の異なる抗体である AB_{MCU1} と AB_{MCU4} でそれぞれ定量を行った結果、得られた値に有意な差はなく、両抗体はほぼ同じ反応性

を示すことが分かった。このことから、MCU の翻訳後修飾等に由来する定量の誤差はほとんど無く、本研究において、調製した標準タンパク質を用いたウェスタンブロットティングによる定量解析が適正に実施されていることが確認された。

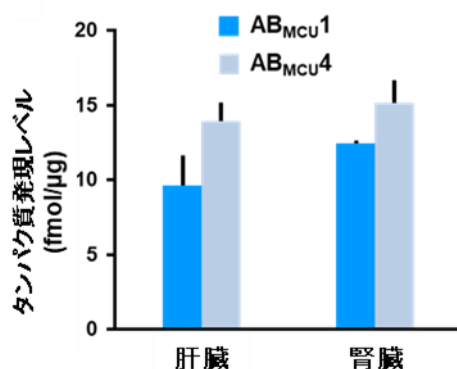


Fig. 2-19 AB_{MCU1} および AB_{MCU4} を用いた定量結果の比較

Fig. 2-18 で得られた MCU 標準タンパク質およびマウス肝臓、腎臓ミトコンドリアから単離したミトコンドリアのシグナル強度から算出した MCU のタンパク質発現量。

更に、同様に EMRE についても認識部位の異なる抗体 (AB_{EMRE1}) を用いて定量を行い、AB_{EMRE2} での定量結果との比較を行った (Fig. 2-20)。その結果、両者の定量結果にはほとんど差はなく、細胞内で EMRE が受ける翻訳後修飾および抗体の認識部位による定量結果の差異はほとんど無いことが確認された。

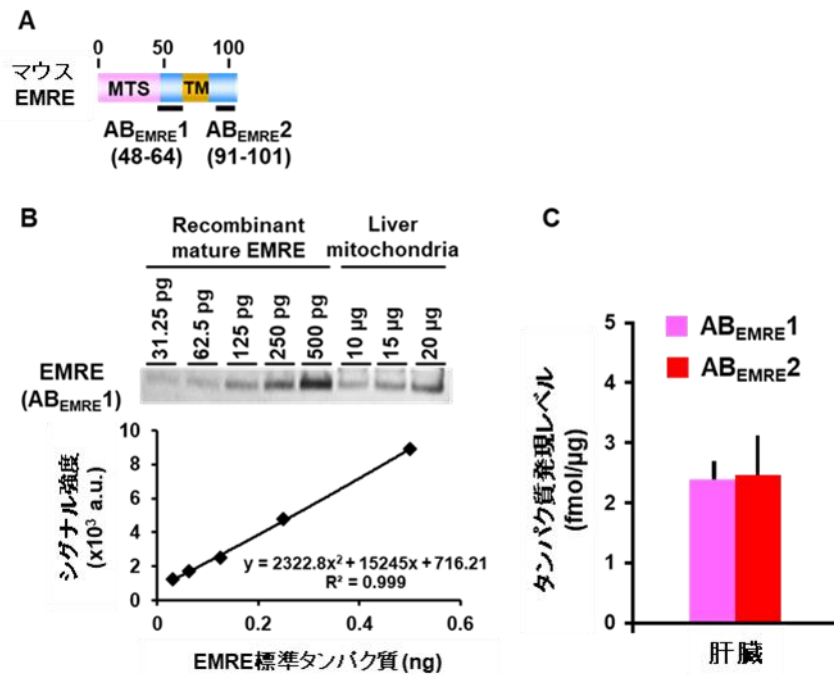


Fig. 2-20 AB_{EMRE1} を用いたマウス肝臓ミトコンドリアのウェスタンブロットング結果

(A) 使用した抗体 (AB_{EMRE1}, AB_{EMRE2}) の認識部位。(B-C) 成熟 EMRE の合成タンパク質とマウス肝臓から単離したミトコンドリアを SDS-PAGE およびウェスタンブロットングに供した結果。各バンドのシグナル強度は Image J によって定量した。成熟 EMRE の分子量を 6109.04 としてミトコンドリア 1 μg 中の EMRE のモル数 (fmol/μg) を求めた。

2.2.5 ミトコンドリア上における MCU, EMRE の化学量論比

2.2.3 および 2.2.4 より、ミトコンドリアにおける MCU, EMRE タンパク質の発現量を明らかにした。定量結果および成熟 MCU および EMRE の分子量 (それぞれ 34843.02, 6109.04) に基づいて、ミトコンドリア 1 μg あたりの各タンパク質のモル数 (fmol/μg of mitochondria) を算出した。更にこの結果から、MCU の分子数に対する EMRE の分子数の比を明らかにした (Table 2-3)。

MCU-EMRE 複合体の化学量論比が両サブユニットの相対的な発現レベルに応じて変化する場合は、MCU と EMRE の比率から複合体の構成を確率的に推定することが可能である。これまでの研究より、MCU 単独で形成される四量体の立体構造や、MCU:EMRE = 4:4 の MCU-EMRE 複合体の立体構造が報告されている[23-26]。これらの報告に基づいて、MCU 四量体に対して、EMRE が 0~4 分子結合出来ると仮定した。二項分布における確立質量関数から、MCU 四量体に結合すると予想される EMRE の数 (0~4 分子) を算出して、それをヒストグラムにプロットした (Fig. 2-21)。

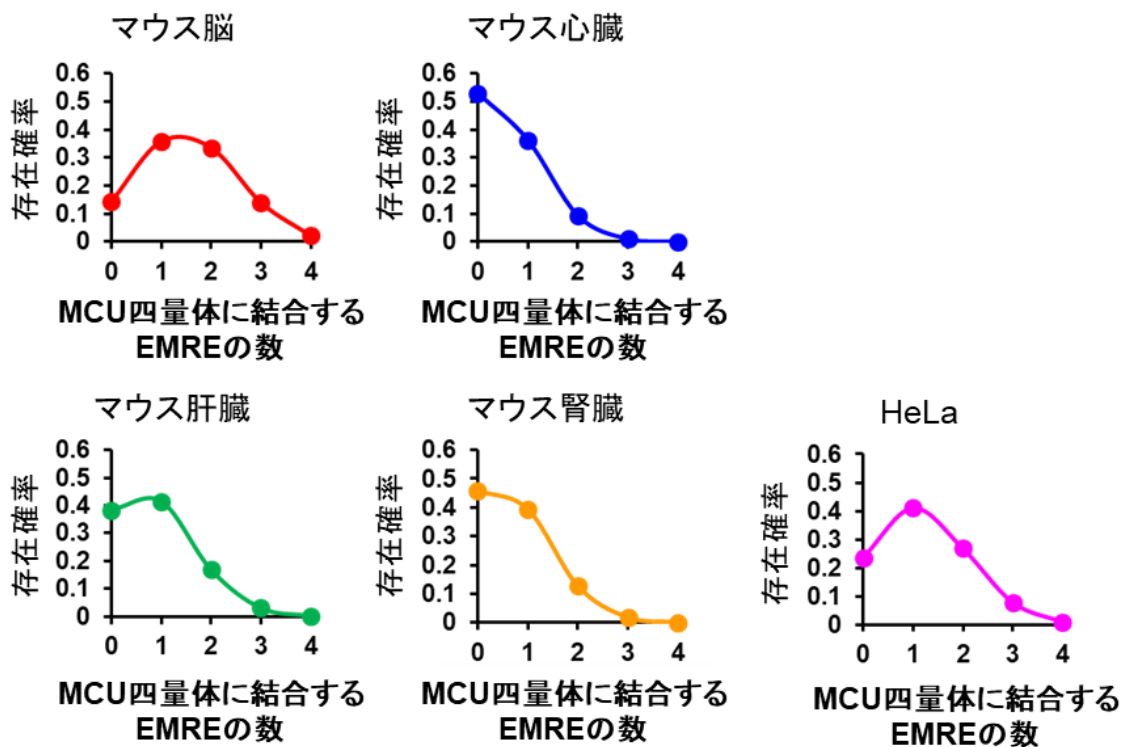


Fig. 2-21 MCU 四量体に対して EMRE が結合する数の確率分布

マウス各組織および HeLa 細胞から単離したミトコンドリア中の MCU に対する EMRE のモル比は Table 2-3 に示した。これをもとに二項分布における確率質量関数から MCU 四量体に対して EMRE が 0~4 分子結合する確率を計算し、ヒストグラムへプロットした。

更に、Fig. 2-21 に示した各複合体 (MCU:EMRE = 4:0, 4:1, 4:2, 4:3, 4:4)の存在確率に基づき、ミトコンドリア内膜に存在する各 MCU-EMRE 複合体の比を算出した。そして、これらの比率を用いて、10 個の MCU 四量体を例として、様々な化学量論比の MCU-EMRE 複合体についてその存在する割合を図として表した(Fig. 2-22)。

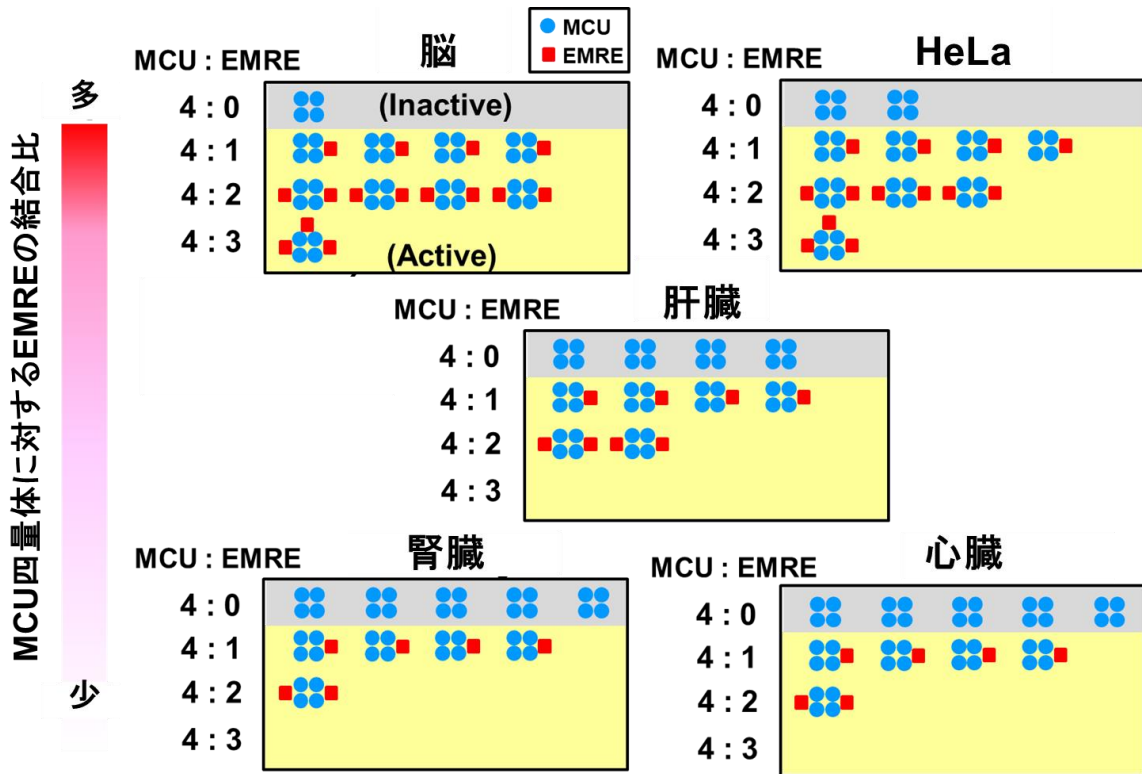


Fig. 2-22 MCU と EMRE の量比に基づいたミトコンドリア内膜上における MCU-EMRE 複合体の構成

本研究より、マウス組織および HeLa 細胞において、ほとんどの MCU 四量体には 0~3 分子の EMRE が結合していることが示唆された。Fig. 2-21 に示した各構成比の複合体の確率をもとに、ミトコンドリア内膜上に存在する MCU-EMRE 複合体の構成割合を示した。各組織中の MCU-EMRE 複合体の構成比とその割合を 10 個の MCU-EMRE 複合体で表している。このモデルにおいて、EMRE を持たない不活性な複合体は灰色の背景で示した (Inactive)。EMRE が 1~3 分子結合した複合体は機能的な活性を有していると考えられ、黄色の背景で示した (Active)。

2.3 考察

本研究では、MCU および EMRE のタンパク質量を調べるために、組み換え MCU と化学的に合成した EMRE とミトコンドリア中の MCU, EMRE をそれぞれウェスタンブロットニングで得られるバンドのシグナル強度で比較した。この定量手法では、抗体に対して内因性のタンパク質と同等の反応性を有する標準タンパク質が正確な定量を行うために必要となる。しかし、エピトープ配列内に翻訳後修飾が存在する場合、抗体の反応性は標準タンパク質と内在性のタンパク質で異なる可能性がある。実際、AB_{MCU1} の認識配列内では Thr49 で切断が、Ser92 でリン酸化がヒト MCU において報告されている[49,50]。本研究では、これらの翻訳後修飾の影響を考慮して、ミトコンドリア中の MCU の量を異なる抗 MCU 抗体 (AB_{MCU4}, Asn317-Leu341 を抗原として使用)でも同様に定量した。その結果、認識部位の異なる AB_{MCU4} と AB_{MCU1} でほぼ同等の MCU 量が算出された。これは本研究における MCU の定量において翻訳後修飾の影響はほとんど無いことを示している。他方で、EMRE はミトコンドリア移行後 Arg52 で切断されることが報告されており[46]、他の切断箇所は報告されていない。AB_{EMRE1} を用いてミトコンドリア中の EMRE 量を調べた結果、AB_{EMRE2} での定量結果と同じ値が得られたことから、EMRE についても翻訳後修飾は定量に影響を与えていないことを確認した。

本研究において、ミトコンドリア中の MCU および EMRE のタンパク質量が初めて明らかにされた。結果より、MCU のタンパク質量 (pg/μg) および分子数 (fmol/μg) はいずれのマウス組織、HeLa 細胞のミトコンドリアでも EMRE に対して大きいことが明らかとなった (Table 2-3)。マウス肝臓ミトコンドリアにおいて、MCU のタンパク質量はミトコンドリア 1 μg あたり 385 pg であり、肝臓ミトコンドリアのタンパク質全体の約 0.04%(w/w) を MCU が占めることを示している。ミトコンドリアにおいて豊富に存在するタンパク質の 1 つである電位依存性アニオンチャネルは約 0.4%(w/w) である[48]。これらのデータは MCU がミトコンドリア内ではあまり豊富なタンパク質ではないということを示しており、カルシウムユニポーター複合体の数は比較的少数であることを示唆している。この発見はカルシウムユニポーター阻害剤である Ru360 の結合解析の結果から、ミトコンドリア内のカルシウムユニポーターは少数であるとする過去の知見と一致する[51]。

いくつかの研究グループで酵母ミトコンドリアはカルシウム輸送活性が欠損していることが確認されている[21,52,53]。哺乳類 MCU 単独で酵母に発現させても酵母ミトコンドリアにおいて Ca²⁺ 取込活性は得られなかったが、哺乳類 MCU と EMRE の共発現では再構成された[21,52]。これは MCU と EMRE 両方がミトコンドリア Ca²⁺ 取込機能にとって必須の因子であることを示唆している。言い換えると、EMRE の無い MCU 複合体 (逆に、MCU の無い EMRE 複合体) は Ca²⁺ 取込

みを示さない。本研究において、全ての組織と HeLa 細胞のミトコンドリア中の EMRE は MCU の量に対して明らかに少なかった。この結果は生理的条件下において EMRE のタンパク質量が機能的なカルシウムユニポーターの量を定めるボトルネックとなっていることを示唆しており、EMRE の量がミトコンドリア Ca^{2+} 取込活性を制御している可能性がある。実際、Kirichok らがパッチクランプ法を用いてマウス組織間でのミトコンドリア Ca^{2+} 取込活性を調べた結果、肝臓および腎臓の Ca^{2+} 取込活性は心臓に比べ高いことが分かっている[38]。本研究において、肝臓および腎臓の EMRE 量は心臓よりも大きく、組織間での Ca^{2+} 取込活性の差と EMRE 量の差には相関が見られた。

最近の研究では、Wang らがクライオ電子顕微鏡を用いて人工脂質膜である nanodisc に再構成したヒト MCU と EMRE の複合体の立体構造を報告した。複合体中の MCU と EMRE の化学量論比は 4:4 であり、複合体中でそれぞれの MCU に EMRE が結合していた[27]。予期せぬことに、本研究においてミトコンドリア中の MCU と EMRE の化学量論比が 4:4 では無いことが明らかとなった。実際には、各組織および HeLa 細胞のミトコンドリア中の EMRE の分子数 (fmol/ μg) は MCU に比べておよそ 2~7 分の 1 程度であった (Table 2-3)。ミトコンドリア中の MCU, EMRE の化学量論比はこの場合どうなるのだろうか？ある種のカリウムイオンチャネル (Kv4.2) について、Kitazawa らが Kv4.2 四量体と KChIP サブユニットの化学量論比を報告している[43]。1~4 分子の KChIP がランダムに結合した Kv4.2 四量体が存在し、Kv4.2 四量体に結合する KChIP の数はその発現量によって増加することがアフリカツメガエル卵母細胞において報告されている。この知見に基づくと、EMRE が MCU 四量体に対して EMRE の発現レベルに応じて確率的に結合する場合、ミトコンドリア内膜上において 4 分子の EMRE が結合した MCU 四量体は極めて少ないことが予測される。また、組織によって複合体中の EMRE 分子の数は異なり、脳では EMRE が 1~2 分子結合した複合体が主要な複合体であり、肝臓では 1 分子、腎臓と心臓では半分以上の MCU 四量体が EMRE の結合していない状態であることが推定された (Fig. 2-21, 2-22)。近年、Payne らが 4 分子の MCU と 1 分子の EMRE をタンデムに結合した融合タンパク質を用いて EMRE1 分子が結合した MCU 四量体が Ca^{2+} 取込活性を有することを報告した[54]。この報告はミトコンドリア上において EMRE1 分子が結合した MCU 四量体が主要な複合体の化学量論比であることを示した今回の結果を支持している。本発見はミトコンドリア上において MCU が様々な分子数の EMRE と結合して存在しており、EMRE が発現量としてだけでなく MCU 四量体に結合する数によって組織・細胞間におけるミトコンドリア Ca^{2+} 取込みの精密な制御を可能としていることを示唆している。MCU 四量体に結合する EMRE の数が Ca^{2+} 取込活性や Ca^{2+} 取込みの閾値な

どの性質に影響を与えるかどうかを明らかにするには、より定量的な研究が今後必要となる。このためには、他の組織とは異なり MCU 四量体に対して 2 分子の EMRE が結合した複合体がメジャーである脳ミトコンドリアにおける Ca^{2+} 取込活性の解析が有用であると考えられる (Fig. 2-21, 2-22)。

Fan らは最近、組み換えバキュロウイルスを用いてヒト MCU、EMRE、MICU1、MICU2 を HEK293 細胞に発現させ、MCU-EMRE-MICU1 複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡で観察した[31]。その結果、MCU と EMRE は 4:4 の割合で結合していることがわかった。これは MCU-EMRE 複合体を解析した Wang らの論文においても同様である[27]。これらの結果と今回の結果が異なる理由は不明である。我々はマウス組織から単離したミトコンドリアを用いて内在性の MCU、EMRE を定量・解析したが、Fan らはバキュロウイルスで各サブユニットを高発現させ、精製した複合体をカーボン膜上で解析していた。各サブユニットの量や実験条件の違いにより、複合体を構成するサブユニットの組成が変化している可能性がある。この問題を明らかにするためには、より詳細な研究が必要である。さらに、Payne らの Native PAGE による結果では、HEK293T で 4:2 の複合体が検出され、この形態が MICU1 のゲートキープに必要であると結論付けている[54]。Fan らも MICU1 による低濃度 Ca^{2+} 条件下での Ca^{2+} 取込活性の抑制には少なくとも 2 つの EMRE が必要であることを示唆している[31]。本研究では、MCU と EMRE の化学量論的比のみに着目したが、この比率は MICU1 や MICU2 など他のサブユニットによって影響を受ける可能性がある。

二項分布を用いた計算によって、解析した組織や細胞のミトコンドリアにおいて MCU 四量体の大部分が EMRE を結合していない状態で存在していることが示唆された。これまでの研究から、MCU 単独の複合体は Ca^{2+} 取込活性を持たないことが分かっている (Fig. 2-22)[21,52]。このようにカルシウムユニポーターの大部分が不活性な状態で存在している理由は不明である。Liu らは筋ジストロフィー様の表現型を示す LAMA2 ノックアウトマウスにおいて EMRE の発現レベルが MCU に対して顕著に上昇したことを報告した[55]。また、Chen らは HINT2 の過剰発現させた Bx-PC3 細胞において MCU の発現量は変わらない一方で、EMRE の発現量の上昇を報告している[56]。これらの知見はミトコンドリアの Ca^{2+} 取込みが様々な刺激に応答して変動する EMRE の発現レベルによって制御されている可能性を示唆している。このような制御を可能とするために、生理的条件下において不活性なカルシウムユニポーターが適切な量で維持されている可能性がある。

本研究により、マウスミトコンドリアにおいて MCU および EMRE のタンパク質量が初めて定量的

に比較され、ミトコンドリア中の MCU, EMRE の化学量論比が組織・細胞間で様々であることが明らかとなった。この発見はミトコンドリア Ca^{2+} 取込みの制御メカニズムに対して新たな知見を与えるものである。

カルシウムユニポーターの最初の構成分子が発見されてから 10 年が過ぎたが、未だ単一の構成分子に焦点を当てた研究が中心的に世界中で展開されている。本研究で取り上げた構成分子間の化学量論比の解析法やそこから得られた知見は、これまでに報告された個々の構成分子に関する知見を横断的に統合し、生体内におけるカルシウムユニポーターの複雑な制御機構を理解する鍵となると考えられる。今後、MCU と EMRE 以外の全構成分子に対する化学量論比の解析法が確立され、構成分子に対する病態時・病態部位における化学量論比の変化を時空間的に解析したデータが蓄積されることにより、カルシウムユニポーターを標的とする創薬の新たな展開につながることを期待する。

2.4 実験方法

2.4.1 実験に用いた試薬および材料、機器

[]内はコード番号を示す。

合成オリゴヌクレオチド、プライマー: FASMAC

制限酵素: New England Biolabs, Roche, TOYOBO

ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」②(DMEM): 日水製薬株式会社[05919]

組織培養用ディッシュ(100 mm, 60 mm, 6well, 24 well, 48 well): IWAKI

Lipofectamine 2000 transfection reagent: Invitrogen[11668-019]

Opti-MEM: Invitrogen[31985-062]

L-Glutamine: Nacalai tesque[01102-82]

ピューロマイシンニ塩酸塩: WAKO[160-23151]

hygro gold: invitrogen[anti-hg-1]

Ex Taq HS: TaKaRa[RR006A]

BCA Protein Assay kit: Thermo Scientific[23227]

Calcium GreenTM-5N: Invitrogen[C-3737]

T4 DNA ligase: ニッポンジーン[311-00404]

Can Get Signal: TOYOBO[NKB-101]

抗 MCU 抗体: SIGMA[HPA016480]

抗 EMRE 抗体: Santa Cruz[sc-86337]

X線フィルム: フジフィルム[47410 26619]

分光蛍光光度計: HITACHI F-2700

DNA シーケンサー: ベックマン・コールター CEQ8000

その他の試薬は全て市販特級品を用いた。

2.4.2 マウス組織および HeLa 細胞からのミトコンドリア単離

11 週齢のオス Slc:ddY マウスから脳・心臓・肝臓・腎臓由来ミトコンドリアの単離を行った[53]。マウス各組織を+EDTA medium (250 mM sucrose, 2 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)中で細かく刻み、850 rpm, 15 min/stroke でホモジナイズした (脳・肝臓・腎臓:1 stroke, 心臓:2 stroke)。得られたホモジネートを 800 xg, 4°C, 5 min 遠心し、核や赤血球、未破碎の細胞などを含む画分を沈殿とした。上清の 3/4 量を新しい遠沈管に移し、同条件で再び遠心した。その上清を 6800 xg, 4°C, 10 min 遠心することで得られた沈殿をミトコンドリア画分の粗抽出物とした。これを少量の+EDTA medium に懸濁後、同条件で再び遠心を行った。その後、沈殿を再懸濁、17400 xg, 4°C, 10 min 遠心した。得られた沈殿を-EDTA medium (250 mM sucrose, 2 mM Tris-HCl, pH 7.4)に懸濁後、同条件で再び遠心した。その後、沈殿を-EDTA medium に再懸濁し、これをミトコンドリア懸濁液とした。ミトコンドリア懸濁液中のタンパク質濃度は標準物質に BSA を用いた BCA 法によって決定した。

HeLa 細胞からのミトコンドリアの単離は Schmitt らの方法を参考にして行った[57]。8x10⁶ Cell/dish の細胞を 100 mm dish 上で 3 日間 DMEM 培地を用いて培養した。その後、単離メディウム (300 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl, 200 μM EGTA, pH 7.2)で洗浄後、細胞を回収して 9000 xg, 5 min 遠心した。沈殿を単離メディウムに再懸濁後、1150 rpm, 1 min/stroke でホモジナイズした (5 stroke)。得られたホモジネートを 800 xg, 5 min 遠心した。この上清を新しい遠沈管に移し、再度 9000 xg, 10 min 遠心した。その後、沈殿を単離メディウムに懸濁してこれをミトコンドリア懸濁液とした。ミトコンドリア懸濁液中のタンパク質濃度は同様に BCA 法によって決定した。

2.4.3 CRISPR/Cas9 系による MCU ノックアウト細胞および EMRE ノックアウト細胞の樹立

MCU ノックアウト細胞および EMRE ノックアウト細胞は CRISPR/Cas9 系を用いて樹立した[58]。まず、ヒト MCU 遺伝子の exon3 およびヒト EMRE 遺伝子の exon1 内においてターゲット配列をデザインした(Table 2-4)。Table 2-4 に示した合成オリゴ DNA を sgRNA 発現ベクターである pSpCas9 (BB)-2A-Puro (Addgene, #48139)へ挿入した。作成したこれらのプラスミドをそれぞれ HeLa 細胞へトランスフェクション後、HeLa 細胞を 2 μg/mL Puromycin を含む DMEM で選択した。その後、得られたシングルコロニーをクローニングすることでそれぞれのノックアウト細胞を得た。細胞は PCR および DNA シーケンシングによってジェノタイピングを行った。

Table 2-4 ヒト MCU およびヒト EMRE におけるターゲット配列およびオリゴ DNA

「U or R」はセンス鎖(U)またはアンチセンス(R)の区別を示す。

太字で示した配列は標的遺伝子の CDS 内の配列と相補的なターゲット配列を示す。

標的遺伝子	名称	U or R	塩基配列 (5'-3')
human MCU	GE3526	U	CACCT TGACAGCGTTCACGCCGGA
	GE3527	R	AAACT TCCCGGCGTGAACGCTGTCA
human EMRE	GE3967	U	CACCG GGCTAGTATTGGCACCCGTC
	GE3968	R	AAAC GACGGGTGCCAATACTAGCC

2.4.4 MCU および EMRE の酵母発現ベクターの構築と酵母への導入

酵母における MCU と EMRE の発現ベクターの構築には pYO326/TDH3p (URA3 or LEU2) を使用した[21]。これはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターとセレクションマーカーとして URA3 または LEU2 を持つマルチコピーベクターである。マウス EMRE (Uniprot ID: Q9DB10) およびコドン最適化した MCU の C 末端側にそれぞれ MYC タグ, FLAG タグを融合、pYO326/TDH3p(URA3) および pYO326/TDH3p (LEU2) の NdeI/BamHI サイトへ挿入した。EMRE の欠損変異体の構築に使用したプライマーを Table 2-5 に示す。野生型酵母 W303-1B を炭酸リチウム法によって形質転換し、ウラシルまたはロイシン非存在下の SD 培地で培養することによって pYO326/TDH3p (URA3), pYO326/TDH3p (LEU2) を導入した酵母を選択した。

2.4.5 抗 MCU 抗体および抗 EMRE 抗体の調製

マウス MCU (Uniprot ID: Q3UMR5) およびマウス EMRE (Uniprot ID: Q9DB10) に対するポリクローナル抗体はニュージーランドホワイト成体へ合成ペプチドを免疫することで産生された[48]。免疫原として用いたこれらの合成ペプチドの配列を Table 2-6 に示す。これらのペプチドをキーホールリンペットヘモシアニンと結合させ、フロイントアジュバントを用いてエマルジョン化させた後、ウサギへ免疫した。最後の免疫から 10 日後に全血を回収し、室温で 1 時間、4°C で一晩静置した。その後、5000 xg, 4°C, 10 min 遠心することで血餅を取り除いた。これにより得られた上清を抗血清として使用した。

Table 2-5 免疫原として使用した合成ペプチドの配列

タンパク質コード領域上での詳細な位置は Fig. 2-2 および Fig. 2-11 に示した。

検出タンパク質	抗体	合成ペプチドの配列 (N-C)
MCU	AB _{MCU2}	APLEKVRIEISRKAEKRTT
	AB _{MCU3}	KGAKKSFRFDLEKYNQLKDA
	AB _{MCU4}	NQLKDAIAQAEMDLKRLRDPLQVHL
EMRE	AB _{EMRE1}	VIVTRSGAILPKPVKMS

2.4.6 MCU の組み換えタンパク質の調製

コドン最適化したマウス MCU はこれまでの研究から作製されたものをテンプレートとして用いた[21]。まず、テンプレートから成熟マウス MCU (His51-350)に相当する配列を PCR で増幅した。得られた成熟マウス MCU の ORF を大腸菌発現用ベクターである pET-3a の NdeI/BamHI サイトへ挿入した。これを用いて大腸菌 BL21(DE3)pLysS を形質転換した。この形質転換体をアンピシリンおよびクロラムフェニコール添加 LB 培地を用いて 37°C で OD600 が 0.5 になるまで培養した。その後、IPTG (0.4 mM)を加えることで pET-3a から目的タンパク質の発現誘導を行い、22°C で 4 時間培養した。その後、遠心によって大腸菌を回収し、10 mM DTT, 4% Triton X-100 を加えた TE で懸濁した。この懸濁液を凍結融解および超音波処理によって細胞を破碎した。遠心後、封入体を含む沈殿画分について TE で再懸濁し、MCU 組み換えタンパク質の粗生成物とした。

2.4.7 MCU の組み換えタンパク質の精製

MCU タンパク質の粗生成物を 8 M 塩酸グアニジンに溶解させ、逆相クロマトグラフィーを行うことで精製を行った (Shimadzu, LC10-AD, cytiva, RESOURCE RPC 3 mL)。溶出はアセトニトリルの 5-40%グラジエントで行った。得られた MCU タンパク質を含む画分について凍結乾燥し、これを本研究における精製 MCU とした。この精製 MCU について 1% SDS に溶解、濃度は BSA を標準物質とした BCA 法で決定した。

2.4.8 EMRE タンパク質の化学合成

成熟 EMRE タンパク質 (Ser53-Asp107)の化学合成および精製は Cosmobio 社によって行われた。成熟 EMRE に相当する配列を Liberty Blue (CEM)を用いた Fmoc 固相合成法によって合成した。モノアイソピック質量は質量分析 (Shimazu, AXIMA Confidence)によって決定された (6111.28, 理論上のモノアイソピック質量は 6109.04)。精製された EMRE の粉体を 2% SDS で溶解、精製 MCU と同様にタンパク質濃度を決定した。

2.4.9 ウェスタンブロットティングによるタンパク質の検出

調製したタンパク質を抽出バッファー (12.5 mM Tris, 1% SDS, 10% glycerol, 1% DTT, 0.05% BPB, pH 6.8)に可溶化させ、SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は 10%および 20%アクリルアミドゲルを使用して行った[59]。泳動後、ゲル中のタンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写し、スキムミルクを含んだ TS 溶液 (20 mM NaPi, 0.05% Tween 20, 150 mM NaCl, pH7.4)中で 1 時間振盪した。その後、一次抗体 (抗マウス MCU 抗体または抗マウス EMRE 抗体)を加えた Can get signal 中で一晩振盪した。TS 溶液で洗浄後、2 次抗体 (HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体)を加えた TS 中で 1 時間浸透した。その後、ECL 溶液を用いて抗体の反応したバンドについて X 線フィルム (Fuji Photo Film)に感光させることで可視化した。

SDS-PAGE において標準タンパク質として MCU または EMRE タンパク質を異なる既知の濃度で泳動、ニトロセルロースメンブレンに転写し検出を行った。得られたバンド強度を Image J により定量し、これらを用いて検量線を作成することでミトコンドリア中の MCU と EMRE を定量した。

Table. 2-6 使用した抗体と反応条件

検出タンパク質	抗体	スキムミルク濃度	一次抗体の希釈倍率	二次抗体の希釈倍率
MCU	AB _{MCU1}	0.3%	4000 倍	2000 倍
	AB _{MCU2}	1.0%	4000 倍	2000 倍
	AB _{MCU3}	1.0%	4000 倍	2000 倍
	AB _{MCU4}	1.0%	10000 倍	3000 倍
EMRE	AB _{EMRE1}	3.0%	2000 倍	2000 倍
	AB _{EMRE2}	0.1%	1000 倍	2000 倍

2.4.10 MCU-EMRE 複合体における構成因子の割合とそれらを取りうる確率の導出

構成比の異なるそれぞれの MCU-EMRE 複合体の構成確率はミトコンドリア中の MCU, EMRE のタンパク質量比に基づき、二項分布の確率質量関数によって求めた[43]。MCU 四量体に対して EMRE が無作為に相互作用すると仮定した場合、MCU:EMRE=4:0~4:4 の複合体の構成確率は以下の式で表される。

$$P(k) = {}_n C_k \cdot p^k \cdot (1-p)^{n-k}$$

このとき、 $P(k)$ は構成比の異なるそれぞれの MCU-EMRE 複合体が構成される確率、 n は MCU 四量体に対して相互作用できる EMRE の数 ($n=4$)、 k は MCU 四量体に相互作用する EMRE の数 ($k=0\sim 4$)、 p はミトコンドリア中の MCU に対する EMRE のモル比 ($0 \leq p \leq 1$)である。

2.5 参考文献

- [46] T. König, S.E. Tröder, K. Bakka, A. Korwitz, R. Richter-Dennerlein, P.A. Lampe, M. Patron, M. Mühlmeister, S. Guerrero-Castillo, U. Brandt, T. Decker, I. Lauria, A. Paggio, R. Rizzuto, E.I. Rugarli, D. De Stefani, T. Langer, The m-AAA Protease Associated with Neurodegeneration Limits MCU Activity in Mitochondria, *Mol. Cell* 64 (2016) 148–162.
- [47] J.C. Liu, J. Liu, K.M. Holmström, S. Menazza, R.J. Parks, M.M. Fergusson, Z.X. Yu, D.A. Springer, C. Halsey, C. Liu, E. Murphy, T. Finkel, MICU1 Serves as a Molecular Gatekeeper to Prevent In Vivo Mitochondrial Calcium Overload, *Cell Rep.* 16 (2016) 1561–1573.
- [48] T. Yamamoto, A. Yamada, M. Watanabe, Y. Yoshimura, N. Yamazaki, Y. Yoshimura, T. Yamauchi, M. Kataoka, T. Nagata, H. Terada, Y. Shinohara, VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 3336–3344.
- [49] Y. Lee, C.K. Min, T.G. Kim, H.K. Song, Y. Lim, D. Kim, K. Shin, M. Kang, J.Y. Kang, H.-S. Youn, J.-G. Lee, J.Y. An, K.R. Park, J.J. Lim, J.H. Kim, J.H. Kim, Z.Y. Park, Y.-S. Kim, J. Wang, D.H. Kim, et al., Structure and function of the N-terminal domain of the human mitochondrial calcium uniporter, *EMBO Rep.* 16 (2015) 1318–1333.
- [50] Y. Lee, J. Park, G. Lee, S. Yoon, C.K. Min, T.G. Kim, T. Yamamoto, D.H. Kim, K.W. Lee, S.H. Eom, S92 phosphorylation induces structural changes in the N-terminus domain of human mitochondrial calcium uniporter, *Sci. Rep.* 10 (2020) 9131.
- [51] W.L. Ying, J. Emerson, M.J. Clarke, D.R. Sanadi, Inhibition of Mitochondrial Calcium Ion Transport by an Oxo-Bridged Dinuclear Ruthenium Ammine Complex, *Biochemistry* 30 (1991) 4949–4952.
- [52] E. Kovacs-Bogdan, Y. Sancak, K.J. Kamer, M. Plovanich, A. Jambhekar, R.J. Huber, M.A. Myre, M.D. Blower, V.K. Mootha, Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 8985–8990.
- [53] A. Yamada, T. Yamamoto, Y. Yoshimura, S. Gouda, S. Kawashima, N. Yamazaki, K. Yamashita, M. Kataoka, T. Nagata, H. Terada, D.R. Pfeiffer, Y. Shinohara, Ca²⁺-induced

- permeability transition can be observed even in yeast mitochondria under optimized experimental conditions, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1787 (2009) 1486–1491.
- [54] R. Payne, C. Li, J.K. Foskett, Variable Assembly of EMRE and MCU Creates Functional Channels with Distinct Gatekeeping Profiles, *IScience* 23 (2020) 101037.
- [55] J.C. Liu, N.C. Syder, N.S. Ghorashi, T.B. Willingham, R.J. Parks, J. Sun, M.M. Fergusson, J. Liu, K.M. Holmström, S. Menazza, D.A. Springer, C. Liu, B. Glancy, T. Finkel, E. Murphy, EMRE is essential for mitochondrial calcium uniporter activity in a mouse model, *JCI Insight* 5 (2020).
- [56] L. Chen, Q. Sun, D. Zhou, W. Song, Q. Yang, B. Ju, L. Zhang, H. Xie, L. Zhou, Z. Hu, H. Yao, S. Zheng, W. Wang, HINT2 triggers mitochondrial Ca²⁺ influx by regulating the mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU) complex and enhances gemcitabine apoptotic effect in pancreatic cancer, *Cancer Lett.* 411 (2017) 106–116.
- [57] S. Schmitt, C. Eberhagen, S. Weber, M. Aichler, H. Zischka, Isolation of Mitochondria from Cultured Cells and Liver Tissue Biopsies for Molecular and Biochemical Analyses, in: *Methods Mol. Biol.*, 2015: pp. 87–97.
- [58] F.A. Ran, P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, F. Zhang, Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 2281–2308.
- [59] A. Yamada, T. Yamamoto, N. Yamazaki, K. Yamashita, M. Kataoka, T. Nagata, H. Terada, Y. Shinohara, Differential Permeabilization Effects of Ca²⁺ and Valinomycin on the Inner and Outer Mitochondrial Membranes as Revealed by Proteomics Analysis of Proteins Released from Mitochondria, *Mol. Cell. Proteomics* 8 (2009) 1265–1277.

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、終始ご指導ご鞭撻を賜りました、
徳島大学 先端酵素学研究所 篠原 康雄 教授に心より感謝の意を表します。

また、本研究と本稿の取り纏めにあたり、常にご指導およびご討論をしていただきました、
国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室 山本 武範 室長(徳島大学 先端酵素学
研究所 客員教授) に心より感謝いたします。

また、本研究と論文作成にあたり、ご指導およびご討論をいただきました、
日本大学 歯学研究科 口腔病理学研究室の山田 安希子 助教に心よりお礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたり、pSpCas9(BB)-2A-Puro をご供与していただきました、
徳島大学 先端酵素学研究所 親泊 政一 教授に心よりお礼申し上げます。

また、研究生生活を共にし、支えていただきました、
高 暢秀 修士、谷口 あい 学士、角田 萌 学士、安井 春香 学士に深く感謝いたしますと
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、
前田 康輔 修士、奈良 篤 学士、橋田 芽依 氏、中尾 彩嘉 氏に深く感謝しますと共に、諸氏
の今後のご活躍をお祈り申し上げます。

さらに、本研究を行うにあたり、常に暖かく見守り、ご協力くださいました、
徳島大学 薬学部 生物薬品化学教室、ならびに徳島大学 先端酵素学研究所 蛋白質発現分
野の皆様にご深く感謝いたします。

最後に、これまで深い理解と愛情を持って暖かく支え見守ってくれた家族に心から感謝いたしま
す。

2022 年 3 月

渡辺 朗