

## ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取り込みに必須のタンパク質 EMRE の機能解析

山本 武範<sup>1,2</sup>, 大園 瑞音<sup>1,2</sup>, 渡辺 朗<sup>1,2</sup>, 山田 安希子<sup>2</sup>

### 1. はじめに

Ca<sup>2+</sup>は生体内のさまざまな場面で重要な役割を果たすシグナリングイオンである。その働きは筋収縮や受精に始まり細胞死に至るまで多岐にわたり、“生と死をつかさどるイオン”といえることができる。このため、Ca<sup>2+</sup>の細胞内濃度は厳密に制御されている。真核細胞において最も重要なCa<sup>2+</sup>レギュレーターの一つはミトコンドリアであるが、そのCa<sup>2+</sup>濃度調節に関わるメカニズムは最近までほとんどわかっていなかった。ミトコンドリアによる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の調節機構の中核となるのはミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>取り込みを行うカルシウムユニポーターによる単輸送機構である。50年以上にわたり不明であったカルシウムユニポーターを構成する分子群がここ5年ほどの間に続々と同定された。これにより、カルシウムユニポーターはポア形成サブユニットとそれに結合する複数の調節サブユニットによって構成されることがわかってきた。関連分子の同定により、この複合体がどのようにCa<sup>2+</sup>を取り込んでいるのか、さらにはなぜその取り込み機構が細胞や多くの器官の機能に重要なのか、といったより深い疑問に対してアプローチが可能になった。本稿では、筆者らが最近明らかにした知見を踏まえながら、カルシウムユニポーターがCa<sup>2+</sup>を取り込む分子機構を中心に最新の動向を紹介する。

### 2. ミトコンドリアカルシウムユニポーター

ミトコンドリアとCa<sup>2+</sup>に関する研究は、1960年代に複数の研究グループが動物組織から高純度に精製したミト

コンドリアがCa<sup>2+</sup>を取り込み内部に保持する性質を持つことを報告したことに始まる<sup>1)</sup>。このCa<sup>2+</sup>の取り込みは一部の真菌を除く広い生物種のミトコンドリアで観察され、進化の過程を通じたその重要性が認識されてきた。その後、この取り込みはミトコンドリア内膜を介した膜電位を駆動力として起こり、他の陰イオンや陽イオンとの交換を必要としないことが示され、この輸送を担保する分子は“カルシウムユニポーター”と呼ばれるようになった<sup>2)</sup>(図1A)。カルシウムユニポーターはミトコンドリア外のCa<sup>2+</sup>濃度が低いときにはCa<sup>2+</sup>取り込み活性を示さず、ミトコンドリア外Ca<sup>2+</sup>濃度が高いと(>10 μM)と取り込み活性を示す、というユニークな性質を持ち、このシグモイド型のCa<sup>2+</sup>応答性から複数のタンパク質によって構成されたと考えられていた。2004年、ミトプラストに対する電気生理学的解析によって、高いCa<sup>2+</sup>選択性とコンダクタンスが確認されたことから<sup>3)</sup>、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ものの、その分子実体は依然不明のままであった。

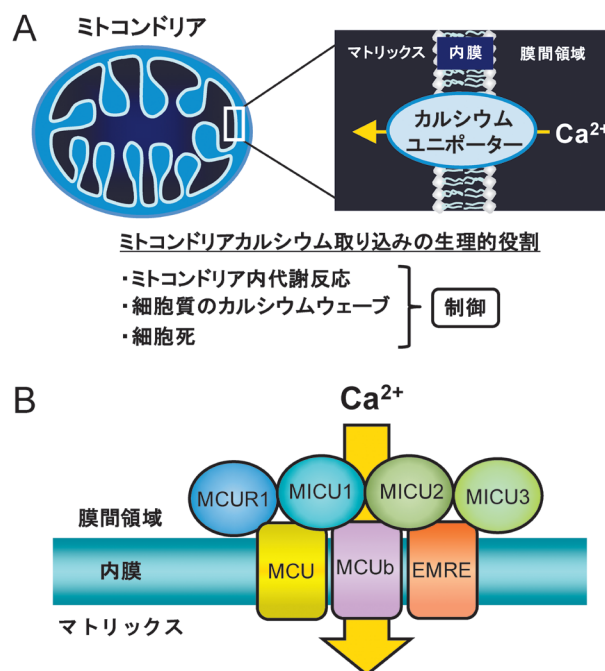


図1 ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取り込み機構 (A) ミトコンドリアのカルシウムユニポーターとその生理的役割。 (B) カルシウムユニポーターの構成分子。

<sup>1</sup> 徳島大学先端酵素学研究所 (〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15)

<sup>2</sup> 徳島大学大学院医歯薬研究科 (〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15)

**The Function of EMRE in Mitochondrial Calcium Uptake System** Takenori Yamamoto<sup>1,2</sup>, Mizune Ozono<sup>1,2</sup>, Akira Watanabe<sup>1,2</sup> and Akiko Yamada<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Advanced Medical Sciences, Kuramotocho-3, Tokushima 770-8503, Japan, <sup>2</sup>Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University, Kuramotocho-3, Tokushima 770-8503, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890453

© 2017 公益社団法人日本生化学会

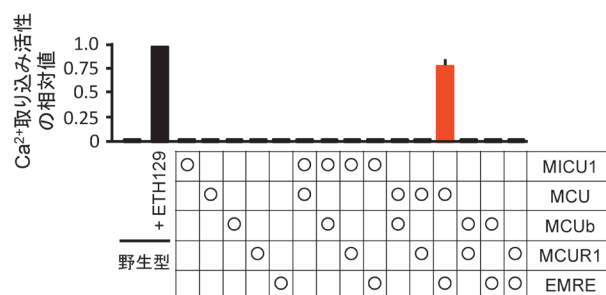
### 3. カルシウムユニポーターの分子機構

たれる。

これまでに発見された七つのサブユニットの中で、 $\text{Ca}^{2+}$  取り込みに必須なサブユニットはどれであろうか？ これまでに、MCUがチャネル孔を構成するという漠然とした認識はあったものの、MCUが単独で $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを行うのか、という疑問は残されたままだった。そこでまず、我々はこの疑問に解答を得ることを試みた。

これまで、カルシウムユニポーターの分子機構の研究は特定のサブユニットを欠損させた動物細胞を使って進められてきた。しかし、このアプローチを使って、「 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みにはMCUだけで十分か？」という疑問に答えるには複数の遺伝子の欠損が必要となる上、欠損させた遺伝子の機能が他のサブユニットによって代替される可能性も否定できない。このような弱点を回避するため、我々は酵母に注目した。ミトコンドリアへの $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み機能はヒトから真菌まで広く保存されているが、興味深いことに酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（以下、酵母）では欠損している。実際、酵母のゲノム上にはカルシウムユニポーターのサブユニット群のオルソログは認められない。この特性を利用し、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により、特定のサブユニットだけを持つミトコンドリアの調製が可能である。この方法は内在するサブユニットに由来する二次的な影響を受けず、個々のサブユニットの機能を選択的にミトコンドリア上で解析できるという利点を持つ。

このような考えのもと、我々は酵母にマウスのカルシウムユニポートターのサブユニットを単独またはさまざまな二つの組合せで発現させ、ミトコンドリアにCa<sup>2+</sup>取り込み活性が認められるかを調べた。その結果、MCUをはじめ



**図2** ミトコンドリアへの $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みに必須の因子  
マウスのカルシウムユニポートのサブユニットを単独または二つ同時に発現させた酵母からミトコンドリアを単離し、 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み活性を測定した。野生型酵母のミトコンドリアにカルシウムイオノフォア (ETH129) を添加した際に観察される $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み活性を1.0として相対活性を示した。丸印は発現させた遺伝子を示す。

とする各サブユニットはいずれも単独ではCa<sup>2+</sup>取り込み活性を示さなかったが、MCUとEMREを共発現させた場合にのみ顕著なCa<sup>2+</sup>取り込み活性を示すことが明らかになった（図2）。このことは、既知の七つのサブユニットの中で、MCUとEMREの二つがCa<sup>2+</sup>取り込みを行う最小単位であることを示している<sup>14)</sup>。

### 5. ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>取り込みにおけるEMREの役割

MCUとEMREがCa<sup>2+</sup>取り込みに必須であることがわかったので、次にそれぞれの分子の役割について解析を進めることにした。これまでの知見から、MCUはチャネル孔を形成することが示唆されている。しかしながら、EMREはロックアウトした場合にCa<sup>2+</sup>取り込み機能が消失することがわかっていただけに具体的な役割は不明であった。そこで我々は、EMREに焦点をあて、酵母発現系を使ってその構造と機能を調べた<sup>14)</sup>。

#### 1) EMREの構造機能解析

まず、EMREがミトコンドリアでのMCUのタンパク質安定性に寄与する可能性について検討した。その結果、MCUを単独で発現させた場合とEMREと共発現させた場合とで、ミトコンドリアでのMCUの存在量は変化しなかった。したがって、EMREはMCUのタンパク質安定性に寄与する因子ではないと考えられた。

一般に、イオンチャネルに存在するいくつかの酸性アミノ酸が、基質となる陽イオンの集積や結合に寄与する。そこで、種間でもよく保存されたEMREの酸性アミノ酸について変異体を構築し、Ca<sup>2+</sup>取り込みに及ぼす影響を調べた。その結果、いずれの変異体を発現させたミトコンドリアも野生型EMREと同等のCa<sup>2+</sup>取り込み活性を示した。このことは、EMREは直接Ca<sup>2+</sup>と結合してCa<sup>2+</sup>取り込みに寄与するのではないことを示唆している。一方で、酸性アミノ酸以外についても、さまざまな変異体を構築して解析を行ったところ、Pro60の変異体（P60A）とSer85-Asn90を欠損した変異体（Δ85-90）では、Ca<sup>2+</sup>取り込みがまったく観察されなくなることがわかった（図3A）。

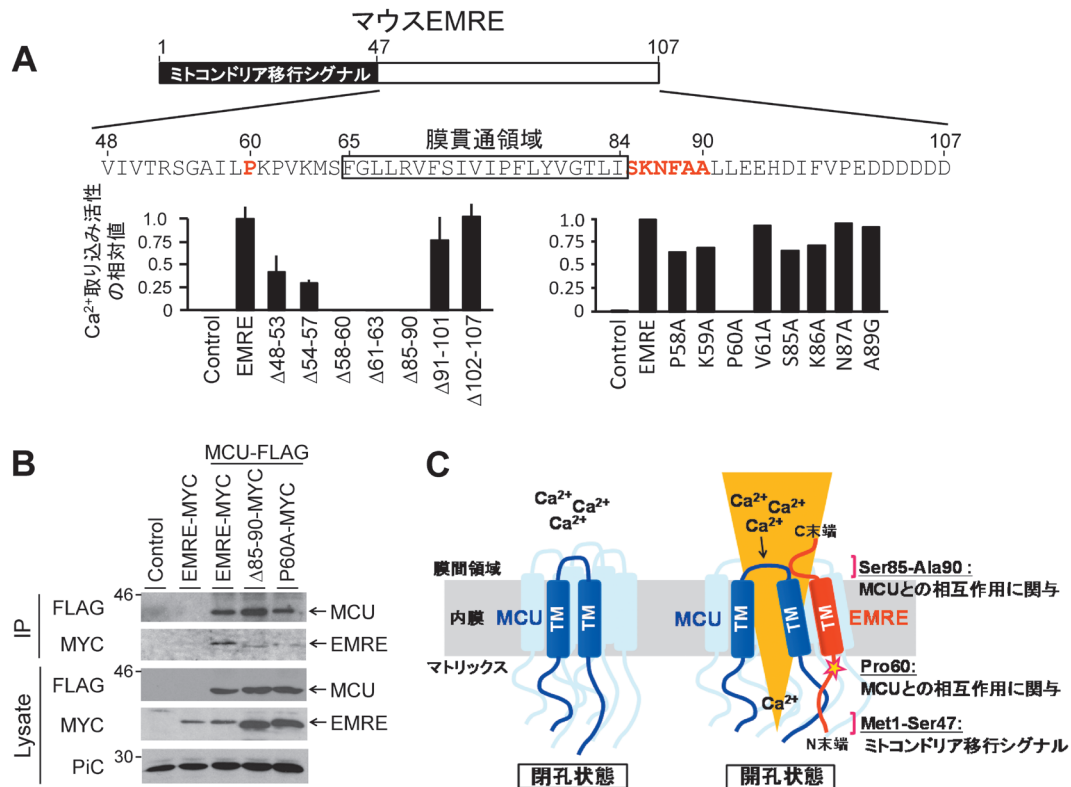


図3 EMREの構造機能解析

(A) マウスEMREについてさまざまな変異体を構築し、MCUとともに酵母に発現させた。これら酵母から単離したミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>取り込み活性を測定した。(B) 二つのEMRE変異体（Δ85-90とP60A）について、FLAGタグを付加したMCUとの相互作用を、FLAG抗体を使った免疫沈降法により調べた。IP：免疫沈降画分。(C) ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取り込みの分子機構モデル。MCUオリゴマーにより形成されたチャネル孔はEMREがないと“閉じた”状態である（左図）。EMREはC末端を膜間領域側に配向して内膜に存在し、内膜の両側でMCUと相互作用することにより、MCUが形成するチャネル孔を“開いた”状態に固定する（右図）。



## 2) EMREとMCUの相互作用の重要性

P60AやΔ85-90ではなぜ機能が消失したのであるか？ EMREはMCUと相互作用するタンパク質として同定されたので、機能を失ったEMRE変異体とMCUとの相互作用に影響がないか免疫沈降法により調べた。その結果、P60AとΔ85-90はいずれもMCUと相互作用しないことが明らかになった。この結果から、ミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>の取り込みにはEMREとMCUの相互作用が必須であり、その相互作用にはEMREのマトリックス側に位置するPro60と細胞質側に位置するSer85-Asn90が関与することがわかった(図3B)。

以上の筆者らの解析から、EMREは、1) それ単独ではCa<sup>2+</sup>の取り込み活性を持たない、2) MCUの局在やタンパク質安定性に関わる因子ではない、3) Ca<sup>2+</sup>の集積やイオン種の選択機能に関与しない、4) MCUとの相互作用がCa<sup>2+</sup>取り込みに必須である、ことを明らかにすることができた。また、変異体解析の結果から、EMREとMCUは内膜を介した両側で相互作用していることが示唆される。この両者の密接な相互作用様式から、MCUがチャネル孔を形成することを前提とするならば、EMREはMCUが形成するチャネル孔を“開孔状態に固定する構造因子”として機能していると考えられる(図3C)。

## 6. おわりに

昨年早くも、NMRと電子顕微鏡を使って、MCUの膜貫通ドメインの立体構造が解明され、MCUが五量体でチャネル孔を形成していることが明らかにされた<sup>15)</sup>。しかし、明らかになった構造はチャネル孔が狭い“閉じた”状態の構造であった。この結果は、このMCUの立体構造がEMRE非存在下で得られたことを考えると納得できる。逆に、我々が本稿で提唱するように、EMRE存在下であればチャネルが“開いた”構造となるのか、また、その構造の中ではEMREが開孔状態を固定するように存在するのか、という点が興味深い。また、EMREには他の調節サブユニットがMCUに結合する際の“足場”としての機能も示唆されており、現在我々も詳しい解析を行っている。EMREはマルチな機能を持つのかかもしれない。

ミトコンドリアカルシウムユニポーターの分子機構は構造の一部が解き明かされたばかりであり、Ca<sup>2+</sup>取り込みの構造機能相関もさることながら、冒頭で述べたCa<sup>2+</sup>を取り込む閾値を規定するメカニズム、組織間でCa<sup>2+</sup>取り込み活性を変えているメカニズム、疾患との関わりなど、興味深い課題が山積している。今後も、ミトコンドリアの

Ca<sup>2+</sup>取り込みの分子機構に関する理解を深めていきたい。

## 謝辞

本研究は徳島大学先端酵素学研究所蛋白質発現分野で行われた。また、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、文部科学省科学研究費補助金基盤研究C、興和生命科学振興財団にご支援いただいた。ここに感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) Deluca, H.F. & Engstrom, G.W. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1744-1750.
- 2) Gunter, T.E. & Pfeiffer, D.R. (1990) *Am. J. Physiol.*, **258**, C755-C786.
- 3) Kirichok, Y., Krapivinsky, G., & Clapham, D.E. (2004) *Nature*, **427**, 360-364.
- 4) Denton, R.M. & McCormack, J.G. (1980) *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 266-268.
- 5) Jouaville, L.S., Ichas, F., Holmuhamedov, E.L., Camacho, P., & Lechleiter, J.D. (1995) *Nature*, **377**, 438-441.
- 6) Duchen, M.R. (2000) *J. Physiol.*, **529**, 57-68.
- 7) Perocchi, F., Gohil, V.M., Girgis, H.S., Bao, X.R., McCombs, J.E., Palmer, A.E., & Mootha, V.K. (2010) *Nature*, **467**, 291-296.
- 8) Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., Kotliansky, V., & Mootha, V.K. (2011) *Nature*, **476**, 341-345.
- 9) De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2011) *Nature*, **476**, 336-340.
- 10) Plovanich, M., Bogorad, R.L., Sancak, Y., Kamer, K.J., Strittmatter, L., Li, A.A., Girgis, H.S., Kuchimanchi, S., De Groot, J., Speciner, L., Taneja, N., Oshea, J., Kotliansky, V., & Mootha, V.K. (2013) *PLoS One*, **8**, e55785.
- 11) Raffaello, A., De Stefani, D., Sabbadin, D., Teardo, E., Merli, G., Picard, A., Checchetto, V., Moro, S., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2013) *EMBO J.*, **32**, 2362-2376.
- 12) Mallilankaraman, K., Cárdenas, C., Doonan, P.J., Chandramoorthy, H.C., Irrinki, K.M., Golenár, T., Csordás, G., Madireddi, P., Yang, J., Müller, M., Miller, R., Kolesar, J.E., Molgó, J., Kaufman, B., Hajnóczky, G., Foskett, J.K., & Madesh, M. (2012) *Nat. Cell Biol.*, **14**, 1336-1343.
- 13) Sancak, Y., Markhard, A.L., Kitami, T., Kovács-Bogdán, E., Kamer, K.J., Udeshi, N.D., Carr, S.A., Chaudhuri, D., Clapham, D.E., Li, A.A., Calvo, S.E., Goldberger, O., & Mootha, V.K. (2013) *Science*, **342**, 1379-1382.
- 14) Yamamoto, T., Yamagoshi, R., Harada, K., Kawano, M., Minami, N., Ido, Y., Kuwahara, K., Fujita, A., Ozono, M., Watanabe, A., Yamada, A., Terada, H., & Shinohara, Y. (2016) *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 831-839.
- 15) Oxenoid, K., Dong, Y., Cao, C., Cui, T., Sancak, Y., Markhard, A.L., Grabarek, Z., Kong, L., Liu, Z., Ouyang, B., Cong, Y., Mootha, V.K., & Chou, J.J. (2016) *Nature*, **533**, 269-273.

## 著者寸描

## ●山本 武範（やまもと たけのり）



徳島大学先端酵素学研究所講師。博士（薬学）。

■略歴 2002年徳島大学薬学部卒業。07年同大学院薬科学教育部博士後期課程修了。07年より同大学ゲノム機能研究センター特任助教。08年疾患ゲノム研究センター助教。13年より疾患プロテオゲノム研究センター講師。16年より現職。

■研究テーマと抱負 主にエネルギー変換の場として知られるミトコンドリアが、実際には細胞の機能や運命をどのように制御しているのかを明らかにしていきたい。

■趣味 旅行、剣道、スキューバダイビング。