

## 新規ミトコンドリア外膜-内膜接触部位を介したリン脂質輸送

### Phospholipid transport via novel contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria

(日本脂質生化学会推薦)

代表研究者 九州大学 宮田 暖 Kyushu University Non Miyata  
協同研究者 九州大学 久下 理 Kyushu University Osamu Kuge

Mitochondrial synthesis of cardiolipin and phosphatidylethanolamine requires the transport of their precursors, phosphatidic acid and phosphatidylserine, respectively, from Endoplasmic reticulum to the mitochondrial inner membrane via the mitochondrial outer membrane. In yeast, the Ups1-Mdm35 and Ups2-Mdm35 complexes transfer phosphatidic acid and phosphatidylserine, respectively, between the mitochondrial outer and inner membranes. In addition, there is a Ups1-independent cardiolipin synthetic pathway requiring several mitochondrial inner membrane proteins with unknown functions including Mdm31, Mdm32 and Fmp30. In the present study, we identified a mitochondrial porin, Por1 as a protein interacting with Mdm31 and Mdm35. Depletion of porins Por1 and Por2 led to destabilization of Ups1 and Ups2, striking decreases in the cardiolipin synthesis via Ups1-dependent and Ups1-independent pathways as well as loss of Ups2-dependent phosphatidylethanolamine synthesis but did not affect Ups2-independent phosphatidylethanolamine synthesis in mitochondria. Por1 mutations affecting the interactions with Mdm31 and Mdm35 led to decreases in CL levels. Thus, yeast porins have specific functions in mitochondrial phospholipid metabolism. Furthermore, knockdown of the mammalian porins, VDAC1 and VDAC2 in HeLa cells decreased CL level, suggesting that Porin function in cardiolipin metabolism is conserved among species.

#### 研究目的

ミトコンドリアは外膜、内膜の二つの生体膜に囲まれた細胞小器官であり、好気呼吸によるエネルギー産生や、アポトーシスによる細胞死、脂質合成など、種々の重要な機能を担っている。ミトコンドリアはまた、小胞体と並んで主要なリン脂質合成の場でもある。リン脂質のうち、カルジオリピン(CL)および、細胞内の大部分のホスファチジルエタノールアミン(PE)は、ミトコンドリア内膜において合成される。CL、PEは、呼吸鎖複合体やクリステ構造の形成など、ミトコンドリア機能維持に必須のリン脂質である。CL、PEは、ミトコンドリア内膜においてそれぞれホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルセリン(PS)か

ら合成されるが、ミトコンドリアはPA、PSの合成能を持たないため、CL、PE合成のためにはPA、PSは小胞体などからミトコンドリア外膜を経てミトコンドリア内膜まで輸送されなくてはならない。

酵母において、ミトコンドリア膜間腔に局在するUps1-Mdm35複合体がPAの、Ups2-Mdm35複合体がPSのミトコンドリア外膜-内膜間輸送を媒介し、それぞれCL、PEの合成に寄与している。ミトコンドリア外膜-内膜間PA輸送体であるUps1を欠損するとCL合成の著しい減少がみられるが、Ups1とUps2を同時に欠損すると、CL合成が野生型酵母と同程度まで回復することが知られており、Ups1に依存しない未知のCL合成経路の存在が示唆されていた。我々は、近

年、この Ups1 非依存的 CL 合成経路に必須の因子として、ミトコンドリア内膜タンパク質 Mdm31、Mdm32、Fmp30 を見出した。さらに、この Ups1 非依存的 CL 合成経路は、Ups2 の欠損などによってミトコンドリア PE 量が低下した際に活性化し、Ups1 の欠損の有無に関わらず、Ups1 依存的な CL 合成経路に替わり、主要な CL 合成経路となることを明らかにした(参考文献 1)。酵母は Ups1 依存的経路と Ups1 非依存的経路を使い分けることにより、様々な環境下における CL 合成を保証していると考えられる。

さらに我々は、Ups1 非依存的 CL 合成経路の分子機構の解明を目的とし、Mdm31、Mdm32 の結合因子の同定を試みた。結果、Mdm31 の結合因子として、ミトコンドリア外膜 Porin タンパク質である Por1 を同定した。本研究では、Porin のミトコンドリア内リン脂質合成・輸送に関する機能解明を目的として解析を行った。

## 研究経過

まず、Porin がミトコンドリアにおける CL 合成に関与するかを検証した。酵母には、Por1、Por2 二つの Porin が存在するため、Por1 欠損し、Por2 を Doxycycline によって発現抑制が可能な TetO7 プロモーター存在下で発現する酵母株を樹立し、Porin の発現抑制時の CL 量を観察したところ、CL 量が野生型の約 10%にまで低下していた。このことから、Porin は CL 合成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

定常状態の酵母においてにおいて、大部分の CL は、Ups1-Mdm35 によって媒介される PA 輸送依存的に合成されている。次に、CL が Ups1 非依的に合成されている Ups1Ups2 二重欠損酵母において Porin を発現抑制すると、やはり CL 量の著しい減少が見られた。これらのことより、Porin は Ups1 依存的、非依存的 CL 合成経路両者に関与していることが示唆された。また、Porin のチャンネル活性を低下させる変異を持つ Por1 変異体を発現する酵母では、正常量の CL が観察された。このことより、Porin の CL 合成に関する機能は、そのチャンネル活性とは独立したものであることが示唆された。

Porin が Ups1 依存的な CL 合成に関与していることから、Porin は、Ups1-Mdm35 複合体とも相互作用

があるのではないかと考えた。解析の結果、Por1 は、Mdm35 と結合することを明らかにした。Mdm35 は、Ups1、Ups2 両者のコファクターであり、Mdm35 を欠損すると、Ups1、Ups2 が不安定することが知られている。Porin を発現抑制した酵母では、Mdm35 同様、Ups1、Ups2 の不安定化が見られた。これらのことから、Porin は Mdm35 と結合し、Mdm35 の機能発現に関与している可能性が示唆された。

Porin が Mdm35 の機能に必要であるならば、Porin の発現抑制は、Ups2-Mdm35 による PS 輸送依存的な PE 合成にも影響するはずである。そこで、Porin の発現抑制した酵母における Ups2 依存的な PE 合成を観察した結果、予想通り、Porin の発現抑制によって Ups2 依存的 PE 合成を低下させた。重要なことに、Porin の発現抑制は、Ups2 非依存的な PE 合成に影響を及ぼさなかった。これらのことより、Porin は、Mdm35 との結合を介して Ups1 依存的 CL 合成および Ups2 依存的 PE 合成に、そして Mdm31 との結合を介して Ups1 非依存的 CL 合成経路に、それぞれ重要な役割を果たしていることが示唆された。

Porin はミトコンドリア外膜の  $\beta$  バレルタンパク質であり膜間部に露出する 9 つのループ領域を持っており、ミトコンドリア内膜に局在する Mdm31 および膜間部に局在する Mdm35 は、これらループのいずれかに結合する可能性がある。Porin の Mdm31、Mdm35 結合部位を同定するため、Por1 の各ループ領域に点変異を導入し、Mdm31、Mdm35 との結合への影響を観察した。結果、Por1 の N 末端から 1 番目のループに変異を持つ Por1 変異体は、Mdm31、Mdm35 両者との結合が低下していた。また、この Por1 変異体を発現する酵母では、CL 量の低下が見られた。このことから、Mdm31、Mdm35 と Porin の結合は CL 量維持重要であることが示唆された。また、興味深いことに、N 末端から 6 番目のループに変異を導入した Por1 変異体は、Mdm31、Mdm35 との結合が著しく上昇していた。このことから、Por1 と Mdm31、Mdm35 の結合はなんらかの機構で制御されている可能性が考えられる。

Porin は、酵母からヒトまで広く保存されている。哺乳動物には、VDAC1、VDAC2、VDAC3 の 3 つの Porin が存在する。次に Porin のミトコンドリアリン脂質合成に関する機能が種間で保存されているかを検証した。まず、酵母にマウス由来 VDAC1 を導入した上で、内在性 Porin の発現を抑制すると、CL の

減少が救済された。また、ヒト由来培養細胞である HeLa 細胞において、VDAC1、VDAC2 を siRNA により発現抑制すると、やはり CL 量の減少が観察された。これらの結果より、Porin の CL 合成に関する機能は、種間で保存されていることが示唆された。

## 考察

本研究により、ミトコンドリア外膜タンパク質 Porin のミトコンドリアリン脂質輸送・合成に関する新規の機能が明らかになった。ミトコンドリアにおける CL、PE の合成は、それぞれの前駆体リン脂質である PA、PS のミトコンドリア外膜-内膜間輸送に依存している。膜間部において Ups1-Mdm35 が PA の、Ups2-Mdm35 が PS のミトコンドリア外膜-内膜間輸送を担い、それぞれ CL、PE の合成に寄与している。一方、ミトコンドリア内膜タンパク質である Mdm31、Mdm32、Fmp30 が Ups1 非依存的な CL 合成に関与している。Porin は、Mdm35、Mdm31 と結合することで、Ups1 依存的 CL 合成、Ups2 依存的 PE 合成および Ups1 非依存的 CL 合成に関与していることが強く示唆された。

脂質輸送は、リン脂質を供給する膜と受容する膜が近接した膜接触部位において行われていると考えられる。Ups1-Mdm35 はミトコンドリア内膜に豊富に存在する CL と結合することが知られていた。本研究において、ミトコンドリア外膜タンパク質である Porin が Mdm35 と結合することを見出した。このことから、Ups1-Mdm35 は、Porin を介してミトコンドリア外膜と、CL を介してミトコンドリア内膜と結合し、自身が膜接触部位を形成し、リン脂質輸送を促進しているのではないかと考えられる。また、Porin の発現抑制は、Ups1 の不安定化を引き起こした。これに類似して Mdm35 欠損酵母では、Ups1 が不安定化し、ミトコンドリア内のプロテアーゼにより分解を受けることが報告されている(参考文献 2)。これらのことより、Porin は Mdm35 と結合することで Mdm35 の構造変化を引き起こし、Ups1 との結合を促進する可能性が考えられる。さらに、Ups1-Mdm35 はリン脂質輸送過程においてダイナミックに結合と解離を繰り返しており、複合体状態で、リン脂質と結合し、逆にサブユニット状態でリン脂質を放出することで、リン脂質の膜間輸送を媒介していると考えられている(参考文献 3)。よって、我々は Porin がミトコンドリア外膜において Ups1 と

Mdm35 の結合を促進するならば、Ups1-Mdm35 の PA への結合(積み込み)がミトコンドリア外膜に限定され、PA のミトコンドリア外膜から内膜への一方向性の輸送の保証に寄与しているのではないかと考えた。この仮説を検証するためには、今後、Porin を再構成したリポソームを用いた試験管内アッセイ系を用いて Ups1-Mdm35 による PA 輸送活性に Porin がどのように影響するかを検証する必要がある。

一方、ミトコンドリア内膜タンパク質 Mdm31 は、Porin と結合し、Ups1 非依存的 CL 合成経路に関与している。よって、Porin と Mdm31 は、もう一つのミトコンドリア内膜接触部位を形成し、PA のミトコンドリア外膜-内膜間リン脂質輸送に関与している可能性が考えられる。Mdm31 は現在立体構造に関する情報がなく、既知のドメインも有していないため、Mdm31 が直接リン脂質を輸送するかは不明である。今後、Mdm31 リコンビナントタンパク質を用いた脂質結合アッセイや、脂質輸送アッセイによって、Mdm31 が PA を直接輸送するかを検証する必要がある。また、この Ups1 非依存的経路は、Ups2 欠損酵母のような、ミトコンドリアにおける PE 合成が低下した酵母において活性化され、Ups1 依存的 CL 合成経路にかわり、主要な CL 合成経路となる。一方、ミトコンドリア膜接触部位を形成する MICOS 複合体の欠損は、クリステ構造の異常と非発酵性条件における酵母の生育が低下するが、Ups2 欠損は、Ups1 非依存的 CL 合成経路を活性化させるだけでなく、MICOS 複合体の欠損による障害をも救済することが報告されている(参考文献 4)。このことから、ミトコンドリア PE 低下時に Mdm31-Porin を介して形成されるミトコンドリア膜接触部位は、MICOS 複合体の欠損を相補する可能性がある。今後、Mdm31-Porin の形成するミトコンドリア内膜接触部位がミトコンドリア構造に与える影響について、電子顕微鏡などによる解析を行う必要がある。

上述のように、Ups1 依存的 CL 合成経路と Ups1 非依存的 CL 合成経路は、ミトコンドリア PE 量によって相反的に制御されている。Porin は、Mdm35 および Mdm31 両者と結合し、両 CL 合成経路に重要な役割を担っていることから、Porin は、ミトコンドリア PE 量に応じた CL 合成経路の切り替えに重要な役割を担っている可能性が考えられる。今後、Porin がミトコンドリア外膜-内膜間リン脂質をどのように制御しているか、その分子機構の解析を進めること

で、トコンドリアリン脂質恒常性とミトコンドリア機能維持に関し重要な知見を得ることができると期待している。また、このような Porin の機能は酵母からヒトまで高度に保存されているものと考えられる。

## 参考文献

1. Miyata N, Goda N, Matsuo K, Hoketsu T and Kuge O.  
Cooperative function of Fmp30, Mdm31, and Mdm32 in Ups1-independent cardiolipin accumulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Tamura Y, Iijima M, and Sesaki H.  
Mdm35p imports Ups proteins into the mitochondrial intermembrane space by functional complex formation.  
*EMBO Journal* Vol. 29(17):2875-2887 (2010)
3. Watanabe Y, Tamura Y, Kawano S and Endo T  
Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria.  
*Nature Communications* Vol. 6:7922 (2015)
4. Aaltonen MJ, Friedman JR, Osman C, Salin B, di Rago JP, Nunnari J, Langer T, Tatsuta T.  
MICOS and phospholipid transfer by Ups2-Mdm35 organize membrane lipid synthesis in mitochondria.  
*Journal of Cell Biology* Vol. 213(5):525-534 (2016)

## 研究の発表

口頭発表

1. 宮田暖、久下理

ミトコンドリアにおけるリン脂質の合成・輸送制御機構の解析

第 41 回日本分子生物学会 2018 年 11 月 横浜

フォーラム オルガネラ・ゾーン討論会「オルガネラ研究から、オルガネラ・ゾーン研究へ」招待講演

2. 宮田暖

ミトコンドリア形成過程におけるタンパク質とリン脂質輸送機構の解明

平成 30 年度日本生化学会九州支部例会

2018 年 7 月 福岡

日本生化学会九州支部学術奨励賞・受賞講演

誌上発表

1. **Miyata N**, Satoru Fujii and Osamu Kuge

Porin proteins have crucial functions in mitochondrial phospholipid metabolism in yeast.

*Journal of Biological Chemistry*

Vol. 293(45):17593-17605 (2018)