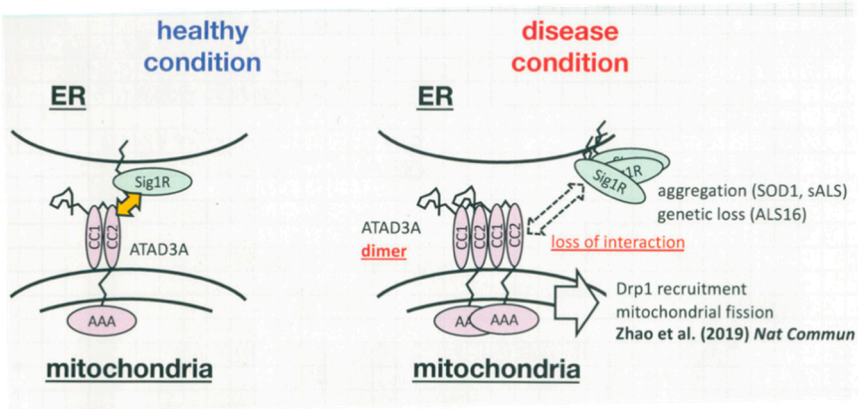
168　新規ミトコンドリア・小胞体連関維持機構の解析	渡邊　征爾

【目的】ミトコンドリアと小胞体の膜同士が近接した領域（mitochondria-associated membrane : MAM）は、細胞の機能維持に重要なマイクロドメインとして、近年、ATP 合成やオートファジーの制御など、様々な機能が明らかにされていた。著者は、これまでの MAM の機能的・構造的な破綻が筋萎縮性側索硬化症（ALS）で広く共通した病態であるという知見をもとに、新規の MAM の維持機構について分子レベルで明らかにすることを目指した。

【方法】本研究では、まず MAM 特異的タンパク質で MAM の維持に必須である σ 1 受容体（Sig1R）と相互作用するタンパク質としてミトコンドリア膜タンパク質 ATAD3A を同定した。次に、ATAD3A の部分欠損変異体を作製し、共免疫沈降法によって Sig1R との相互作用に必須の分子内ドメインを同定した。また、独自に開発した MAM の定量評価系である MAMtracker-Luc（Sakai et al., *FASEB J in press*）と作製した ATAD3A 部分欠損変異体を用いて、細胞内の MAM 量に影響を与える領域についても同定した。さらに、生体内での ATAD3A と Sig1R の相互作用の破綻が及ぼす影響を Sig1R 欠損マウスおよび ALS モデルマウスである変異 SOD1 マウスで検討を行った。

【結果】ATAD3A と Sig1R の相互作用は、ATAD3A の N 末端側に存在する二つの Coiled-Coil ドメイン（CC1、CC2）に依存していた。これは N 末端側がミトコンドリア外膜側に局在するとする先行研究と一致していた。興味深いことに、ATAD3A の野生型は非常に強く MAM の形成を誘導した一方、CC1、CC2、AAA ATPase ドメイン（AAA）のいずれを欠損しても MAM の誘導はされなくなった。そこで、各部分欠損変異体を HEK293 細胞に発現させて細胞内における局在を観察した結果、野生型と CC1 または CC2 の欠損変異体はミトコンドリアに局在した一方、AAA 欠損変異体は小胞体に局在することが明らかとなった。また、野生型マウス脊髄と Sig1R 欠損マウス脊髄また ALS モデルマウスである変異 SOD1 マウスで比較したところ、意外なことに ATAD3A の発現量や局在に大きな変化は見られなかった。しかし、ハンチントン病モデルで報告があった ATDA3A のオリゴマー化について、先行研究と同様の方法で検討を行った結果、これらのマウス脊髄においては ATAD3A のオリゴマー化が有意に促進されていることが明らかとなった。以上の結果、まず、1. ATAD3A は N 末端側の Coild-Coil ドメインを介して小胞体膜タンパク質と相互作用することによって、MAM の増強に寄与していることが判明した。また、2. Sig1R は ATAD3A の異常なオリゴマー化の抑制に重要であり、MAM の破綻は ATAD3A の異常なオリゴマー化の促進を介しても神経細胞に対して毒性的に作用する可能性が示唆された。

本研究により明らかとなった ATAD3A と Sig1R の相互作用の概念図



168. 新規ミトコンドリア・小胞体連関維持機構の解析

渡邊　征爾

名古屋大学 環境医学研究所 病態神経科学分野

Key words：ミトコンドリア･小胞体膜間領域（MAM），σ1 受容体，ATAD3A，筋萎縮性側索硬化症（ALS）

緒　言

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis：ALS）は、運動神経細胞が選択的に傷害される神経変性疾患である。著者は、これまでに ALS モデルマウスである変異 SOD1 マウスを用いた研究から、ミトコンドリアと小胞体の近接部位（mitochondria-associated membranes：MAM）の機能的・構造的な破綻が ALS において重要な病理的変化であることを明らかにしてきた［1］。近年、MAM の異常化はアルツハイマー病やハンチントン病など、様々な神経変性疾患と関連していることが明らかにされており、MAM の生理機能もオートファジーの隔離膜形成からインスリン抵抗性など、多岐に渡ることが明らかとなってきた［2］。しかし、MAM の破綻が様々な疾患で指摘される一方、その機序については必ずしも明らかでない。

本研究では、MAM の維持に必須であるσ1 受容体（Sig1R）と相互作用する分子としてミトコンドリア膜タンパク質である ATAD3A（ATPase AAA domain-containing protein 3A）を同定したことから、Sig1R と ATAD3A の相互作用を解析することによって、新規の MAM 維持機構を分子レベルで明らかにすることを目指した。

方法および結果

マウス神経芽腫細胞株 Neuro2a（N2a）に HA タグを付加したヒト ATAD3A と FLAG タグを付加した Sig1R を発現させ、抗 FLAG 抗体により共免疫沈降を行ったところ、ATAD3A が Sig1R と相互作用することを確認できた（図 1A）。また、これと同様の方法により、ATAD3A の機能的ドメインとされる Proline-Rich ドメイン（PR）、Coiled-Coil ドメイン 1（CC1）、Coiled-Coil ドメイン 2（CC2）、および AAA ATPase ドメイン（AAA）の各ドメインを欠損した変異体（図 1B、C）で検討したところ、CC1、CC2 欠損変異体では共沈せず、N 末端側の Coiled-Coil ドメインが両者の相互作用に必須であることが明らかになった（図 1D）。

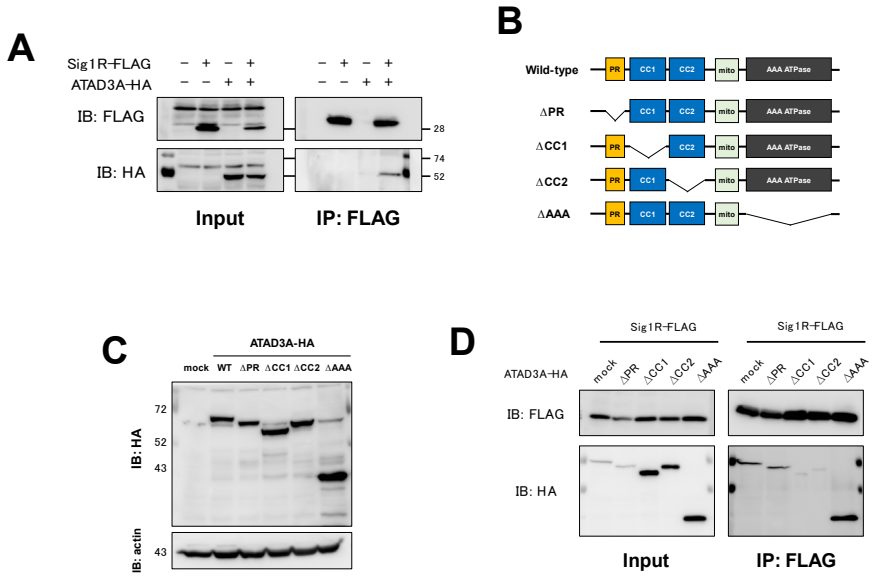


図 1. ATAD3A は N 末端側の CC1/CC2 ドメインを介して Sig1R と相互作用する

A) Sig1R-FLAG による ATAD3A-HA との共免疫沈降。N2a 細胞にそれぞれの発現用プラスミドをトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体で沈降させた。

B、C) 作製した ATAD3A のドメイン欠損変異体 (B)。各変異体はイムノブロットで目的長に正しく発現することを確認した (C)。PR : Proline-rich、CC1/2 : Coiled-Coil 1/2、mito : mitochondria import signal、AAA : AAA ATPase。

D) ATAD3A のドメイン欠損変異体と Sig1R-FLAG との共免疫沈降。CC1 または CC2 を欠損した ATAD3A は Sig1R と共沈せず、Sig1R との相互作用には CC1／CC2 のドメインが必要であると判明した。

次に、Sig1R と ATAD3A の相互作用が MAM の形成に与える影響を検証するため、著者らが独自に開発した MAM のレポーターMAMtracker-Luc（図 2A）を N2a 細胞に発現させて、MAM の定量的評価を行った。MAMtracker-Luc は、分割型ルシフェラーゼである Nano-Bit®（Promega）を構成する LgBit と SmBit を各々小胞体膜上とミトコンドリア膜上に発現させるシステムであり、可逆的に MAM の増減を定量評価できる（図 2B）。この MAMtracker-Luc を用いた検討の結果、野生型 ATAD3A は非常に強く MAM の形成を誘導した一方、予想に反して、ATAD3A を強制発現させた N2a 細胞では、siRNA によって Sig1R をノックダウンしても MAM の量にはほとんど影響しなかった（図 2C）。これは ATAD3A が Sig1R のみならず、小胞体膜上の別のタンパク質とも結合して MAM を維持している可能性を示唆している。また、CC1、CC2 もしくは A3 のドメインを欠損した変異体では MAM の誘導が全く生じなかった（図 2D）。このときの細胞内における ATAD3A 変異体の局在を免疫染色によって確認したところ、CC1 または CC2 の欠損変異体はミトコンドリアに、AAA 欠損変異体は小胞体にそれぞれ局在した (図 3)。以上の結果は、ATAD3A の N 末端側が小胞体膜上のタンパク質と相互作用し、C 末端側はミトコンドリア膜に埋め込まれることで、ATAD3A がリンカーとして両オルガネラをつないでいることを示唆している。さらに、変異 SOD1 マウスと Sig1R 欠損マウスで ATAD3A の異常化が見られるか検討を行ったところ、それぞれのマウスの脳では ATAD3A の二量体化が促進されていることが判明した。このことから、Sig1R は ATAD3A の単量体化の維持に貢献している可能性が考えられた。

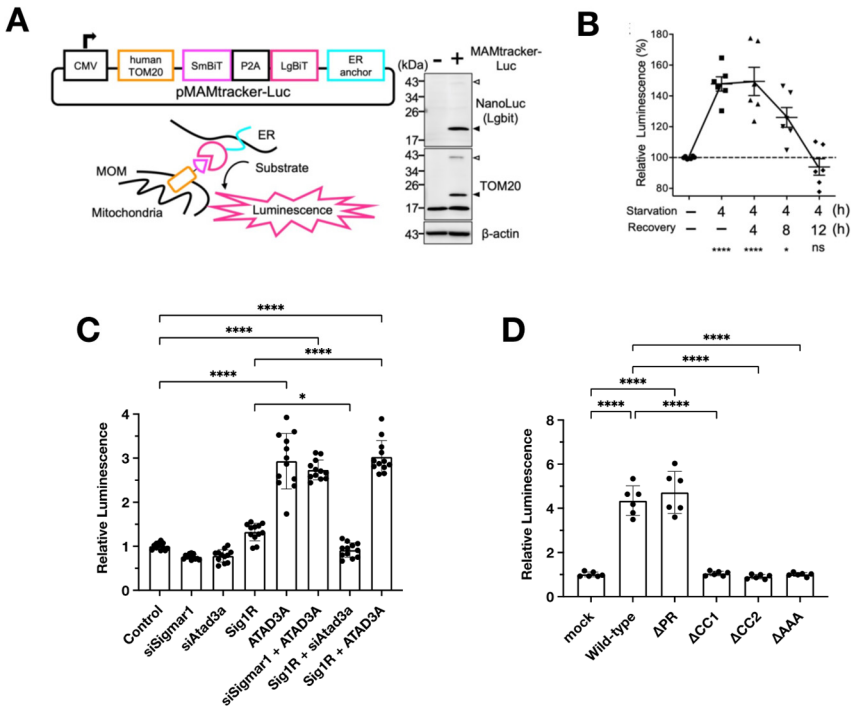


図 2. ATAD3A は MAM の形成を顕著に促進する

A) MAM の定量評価に用いた MAMtracker-Luc。小胞体（ER）側の LgBit とミトコンドリア側の SmBit が会合する（Kd＝190 mM）とルシフェラーゼが再構成され発光する。

B) 会合時の解離定数が大きいため、MAMtracker-Luc は可逆的に MAM をモニターできる。

C) MAMtracker-Luc による ATAD3A または Sig1R の有無が MAM に与える影響の評価。Sig1R と比較しても、ATAD3A は顕著に MAM の量を増加させた。siSig1R で ATAD3A による MAM 増加を相殺できなかった一方、siAtad3a では Sig1R による MAM 増加を相殺できたので、Sig1R による MAM の増加は ATAD3A によるが ATAD3A の相互作用相手は Sig1R に限らないと推測される。

D) ATAD3A のドメイン欠損変異体が細胞内の MAM 量に与える影響。Sig1R との結合に重要な CC1/2 の欠損のみならず、酵素活性に重要な AAA ドメインの欠損でも MAM の増加は抑制された。

一元配置分散分析（ANOVA）の実施後、Tukey の方法により多重比較を行った（*p<0.05、****p<0.0001、ns : p<0.05）（C、D）。

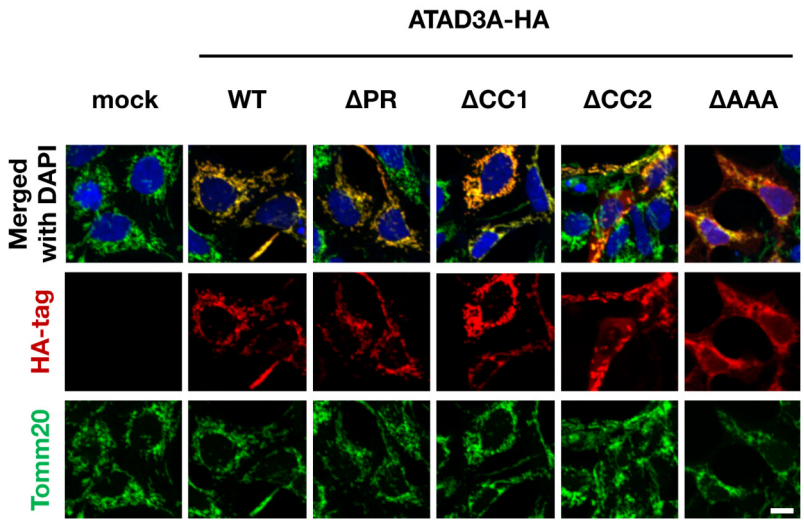


図 3. ATAD3A ドメイン欠損変異体の細胞内局在

HEK293 細胞に各変異体を発現させ、免疫染色を行った。ΔAAA 変異体のみ、ミトコンドリアと全く局在が一致しなかった。このことから、ミトコンドリア膜への挿入には AAA ATPase 活性が必要であり、ΔAAA 変異体で MAM が増加しないのは変異体がミトコンドリアに局在できないためと考えられた（スケールバー：10μm）。

考　察

本研究では、ATAD3A が小胞体膜上の分子である Sig1R と N 末端側 Coiled - Coil ドメインを介して結合することを初めて示した。ATAD3A の強制発現が MAM を大きく増強したことを併せて考えると、ATAD3A が小胞体とミトコンドリアを直接的に結びつける、MAM のリンカー分子であることが明らかとなった。ATAD3A は Sig1R と相互作用する一方で Sig1R の抑制によっては MAM の増強作用が失われなかったことから、別の結合相手も小胞体膜上に存在すると考えられた。Coiled - Coil ドメインは同じ Coiled - Coil ドメイン同士でヘテロ二量体を形成する傾向が強く、MAM でも MFN2 が Coiled - Coil ドメインによるリンカー分子として機能することが知られている［3］。従って、ATAD3A と結合する Coiled - Coil ドメインをもった小胞体タンパク質が Sig1R とは別に存在すると考えられる。一方、Sig1R 欠損マウスや ALS モデルマウスである変異 SOD1 マウスでは、ATAD3A の二量体化が促進されていた。ATAD3A の二量体化はハンチントン病においてミトコンドリア機能異常の原因となることが指摘されており［4］、Sig1R は ATAD3A を単量体状態に維持することによってミトコンドリアの機能維持に貢献しているものと考えられた。ALS における ATAD3A の多量体化制御の詳細を解明することが、今後、MAM を標的とした治療戦略を開発する上で重要になると考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学環境医学研究所の山中宏二教授である。最後に、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝致します。

文　献

1) Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, Nomura H, Komine O, Endo F, Jin S, Mancias P, Kiyama H, Yamanaka K. Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. EMBO Mol Med. 2016 Dec 1;8(12):1421-1437. doi: 10.15252/emmm.201606403. PMID: 27821430; PMCID: PMC5167132.

2) Simoes ICM, Morciano G, Lebiedzinska-Arciszewska M, Aguiari G, Pinton P, Potes Y, Wieckowski MR. The mystery of mitochondria-ER contact sites in physiology and pathology: A cancer perspective. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020 Oct 1;1866(10):165834. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165834. Epub 2020 May 11. PMID: 32437958.

3) Merkwirth C, Langer T. Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. Cell. 2008 Dec 26;135(7):1165-7. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.005. PMID: 19109886.

4) Zhao Y, Sun X, Hu D, Prosdocimo DA, Hoppel C, Jain MK, Ramachandran R, Qi X. ATAD3A oligomerization causes neurodegeneration by coupling mitochondrial fragmentation and bioenergetics defects. Nat Commun. 2019 Mar 26;10(1):1371. doi: 10.1038/s41467-019-09291-x. PMID: 30914652; PMCID: PMC6435701.