課題番号 ０５Ａ－９

研究題目　PDZD8 による小胞体-ミトコンドリア繋留機構の解明

研究組織

研究代表者：平林祐介（東京大学工学系研究科）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：中村航規（東京大学工学系研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

ミトコンドリアはエネルギー変換、アポトーシスの誘導などを行う細胞の恒常性に必須の細胞内小器官である。近年、ミトコンドリアと小胞体は二つの膜同士が数十ナノメートルにまでに近接した、接触場を形成することが発見され、この接触場はミトコンドリアにおける脂質合成やカルシウムイオン濃度制御、ミトコンドリア分裂制御等に重要な役割を果たすことが報告されている (Rowland & Voeltz, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2012) 。最近、我々は哺乳動物細胞において小胞体タンパク質 PDZD8 がミトコンドリア―小胞体接触場形成の決定的因子であることを発見した (Hirabayashi et al., Science, 2017) 。さらに最近、我々は PDZD8-3xHA KI マウスを用いた免疫沈降―質量分析法、PDZD8-TurboID KI HeLa 細胞を用いた近接ビオチン標識―質量分析法 (どちらも小迫教授との共同研究) によるスクリーニングにより、PDZD8 の結合分子としてミトコンドリア局在タンパク質 FKBP8 を同定した (Nakamura, Aoyama-Ishiwatari, Nagao et al., bioRxiv, 2023)。これまでに、精製組み換え PDZD8 と精製組み換え FKBP8 のプルダウン実験により、PDZD8 と FKBP8 は試験管内で直接結合することを明らかにしたものの、PDZD8 と FKBP8 の分子レベルでの結合様式は不明である。特に、PDZD8 と FKBP8 の相互作用界面、さらに、複合体内において両タンパク質が空間的にどのように配置しているのかは不明である。そこで本共同研究では、in vitro 再構成系とクロスリンキング―質量分析法を用いて、PDZD8-FKBP8 結合を分子レベルで解析することを目的とした。

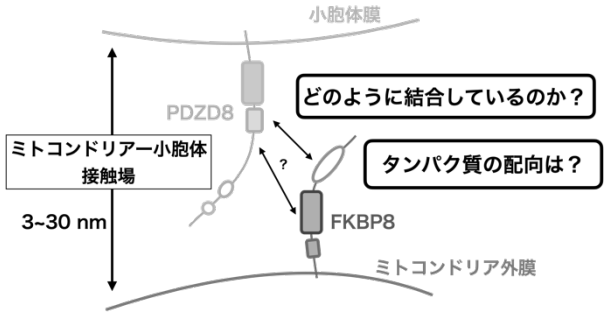

図: 小胞体タンパク質 PDZD8 とミトコンドリアタンパク質 FKBP8 の直接の結合により小胞体膜とミトコンドリア外膜を繋留することを我々が発見したが、その結合様式は不明である。

[1-2]研究の方法・経過

本共同研究では、組み換えタンパク質に対して、クロスリンキング―質量分析法を用いることで PDZD8-FKBP8 複合体の空間情報を得ることを試みた。

Expi293 細胞に PDZD8-Flag を過剰発現させ、抗 Flag タグビーズによるアフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。また、FKBP8-Histag を発現した大腸菌株 C43 (DE3) を破砕し、IMAC (immobilized metal affinity chromatography) とサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。これら精製済みの組み換え PDZD8 と組み換え FKBP8 に対して、小迫研究室にてクロスリンキング―質量分析を行った。実験は計画通りに進行し、クロスリンクされた様々なペプチドを同定した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

クロスリンクされたペプチドの LC-MS/MS 解析の結果、分子内でクロスリンクされたペプチド、分子間でクロスリンクされたペプチドを同定することに成功した。分子内でクロスリンクされたペプチドはそのタンパク質の 3 次構造、4 次構造の情報を与えるが、本共同研究で得られた結果は予想された構造と一貫性があった。さらに分子間でクロスリンクされたペプチド情報からは、相互作用表面のいくつかの候補が得られた。現在、クロスリンキング―質量分析法で示唆された相互作用様式について生化学的手法で検証中である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

従来、複合体形成に必要なドメインを調べるためには、ドメイン欠損変異体を細胞に過剰発現し、免疫沈降―ウェスタンブロット実験を行うことが一般的であるが、これは細胞内における未知の相互作用タンパク質のバイパス的な結合などの可能性を排除できないために、実験の解釈が難しくなることがある。

本共同研究で用いたクロスリンキング―質量分析法は、試験管内に PDZD8 と FKBP8 のみが存在する状況下でクロスリンクを行ったため、前述の懸念を回避できる。さらに、接触界面をアミノ酸残基レベルで同定できるため、結合ドメイン同士の配向を高い精度で推定可能である。故に、本共同研究で得られた結果は、PDZD8―FKBP8 結合の相互作用解析において重要な知見と言える。

本共同研究による PDZD8-FKBP8 の結合様式の解明は、哺乳細胞における小胞体膜―ミトコンドリア膜繋留機構の分子レベルでの解明を意味しており、当該研究分野におけるインパクトが大きい。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

K. Nakamura*, S. Aoyama-Ishiwatari*, T. Nagao*, M. Paaran, C. J. Obara, Y. Sakurai-Saito, J. Johnston, Y. Du, S. Suga, M. Tsuboi, M. Nakakido, K. Tsumoto, Y. Kishi, Y. Gotoh, C. Kwak, H.-W. Rhee, J. K. Seo, H. Kosako, C. Potter, B. Carragher, J. Lippincott-Schwartz, F. Polleux, Y. Hirabayashi, Mitochondrial protein FKBP8 captures PDZD8 to form mitochondria-ER contacts, bioRxiv, 2023

[3-2]学会発表

中村 航規, 青山 幸恵子, 長尾 崇弘, Paaran Mohammadreza, Christopher J. Obara, 櫻井 結衣, 中木戸 誠, 津本 浩平, 岸 雄介, 後藤 由季子, 小迫 英尊, Clint Potter, Bridget Carragher, Jennifer Lippincott-Schwartz, Franck Polleux, 平林 祐介
ミトコンドリアタンパク質 FKBP8 は PDZD8 を捕まえることで、ミトコンドリア―小胞体接触場 を形成する, 第 46 回 日本分子生物学会年会, 神戸市, 12 月 8 日, 2023 年

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本年度中には、具体的な相互作用界面の同定には至らなかったが、本共同研究で得られた知見に基づいた解析により、PDZD8-FKBP8 複合体の分子レベルでの相互作用解析、つまり哺乳細胞における小胞体膜―ミトコンドリア膜繋留機構の分子レベルでの解明を行う。