

学位論文

# オルガネラ間コンタクトサイト評価系の開発と応用

山形大学大学院医学系研究科(先進的医科学専攻(博士後期課程))

(分子疫学コース, 生化学・分子生物学講座)

武田百合子

## 目次

### 1. General Introduction

- 1-1. 細胞内リン脂質の合成と輸送
- 1-2. オルガネラ間コンタクトサイト
- 1-3. ERMES 複合体
- 1-4. 小胞体ストレス応答
- 1-5. 細胞ストレスとオルガネラ間コンタクトサイト
- 1-6. 参考文献

### 2. 材料と実験方法

#### 2-1. 実験材料

- 2-1-1. 本研究で使用した菌株と培地
  - 2-1-1-1. 大腸菌
  - 2-1-1-2. 酵母株
  - 2-1-1-3. 大腸菌用培地
  - 2-1-1-4. 酵母用培地
- 2-1-2. 本研究で使用したプラスミド
- 2-1-3. 本研究で使用したオリゴヌクレオチド
- 2-1-4. 本研究で使用した抗体

#### 2-2. 実験操作

- 2-2-1. 遺伝子操作
- 2-2-2. 酵母ゲノム DNA の抽出
- 2-2-3. 酵母株へのプラスミドまたは DNA 断片の導入
- 2-2-4. 遺伝子欠損酵母株の作製
- 2-2-5. タグ遺伝子導入変異酵母株の作製
- 2-2-6. 酵母株の増殖確認実験
- 2-2-7. 蛍光顕微鏡を用いた出芽酵母細胞の観察
- 2-2-8. 超解像蛍光顕微鏡 SCLIM を用いたタンパク質の細胞局在のライブセルイメージング
- 2-2-9. ホモジナイザーを用いた酵母から粗ミトコンドリア画分の単離
- 2-2-10. SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング
- 2-2-11.  $^{32}\text{P}$  を用いたリン脂質組成分析
- 2-2-12.  $^{32}\text{P}_i$  を用いた細胞内リン脂質組成のタイムコース分析
- 2-2-13.  $^{14}\text{C}$ -Serine を用いた細胞内リン脂質輸送分析
- 2-2-14. TLC 分析
- 2-2-15. グリセロール密度勾配遠心解析



## 2-2-16. フローサイトメトリー

### 3. 結果と考察

#### 3-1. Split-GFP を用いたオルガネラ膜間近接検出系の開発

##### 3-1-1. 緒言

##### 3-1-2. 結果

3-2-1. Split-GFP の実験系によってミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイトが可視化される

3-2-2. Split-GFP シグナルは既存のコンタクトサイトと共局在する

3-2-3. *mmm1Δ*株はミトコンドリアと小胞体に発現させた Split-GFP シグナルが検出される

3-2-4. Split-GFP 実験系による任意のオルガネラ膜近接検出

##### 3-1-3. 考察

#### 3-2. ERMES 複合体の解離は小胞体ストレスの緩和に重要である

##### 3-2-1. 緒言

##### 3-2-2. 結果

3-2-2-1. 小胞体ストレス時に UPR 応答経路非依存的に ERMES ドット数が増加する

3-2-2-2. 小胞体ストレス時に ERMES 複合体クラスター構造が解離する

3-2-2-3. 小胞体ストレス時の ERMES クラスター構造解離のメカニズムの検討

3-2-2-4. 小胞体ストレス時の小胞体の伸長に ERMES ドット数の増加が必要である

3-2-2-5. ERMES 複合体クラスターの解離は、リン脂質輸送活性を阻害する

3-2-2-6. Split-GFP 実験系を用いた細胞ストレス応答モニター

##### 3-2-3. 考察

### 4. 参考文献

### 5. 謝辞

### 6. 略語

### 7. Figure

## 1. General Introduction

### 1-1. 細胞内リン脂質の合成と輸送

リン脂質研究の始まりは、1812年にM.Vauquelininが動物細胞内にリン含有脂質を脳の脂肪組織内に発見したことが始まりとされている。1874年には、リン含有物質にはリン酸、グリセロール、脂肪酸、窒素原子を含む有機塩基が含まれていることが報告され、この物質をグリセロリン脂質と命名した[1]。代表的なグリセロリン脂質として、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルグリセロール(PG)、カルジオリピン(CL)が挙げられる。グリセロリン脂質の合成経路は、1956年にKennedyらのグループによって報告された[2]。出芽酵母細胞では、グリセロリン脂質はKennedy経路かCDP-DAG経路(Fig.1AB)で合成される。Kennedy経路はCDP-エタノールアミンやCDP-コリンのような可溶性の中間体が、DAGと反応し、PEやPCを合成する経路である(Fig.1A)。またCDP-DAG経路はリン脂質が高エネルギー中間体リン脂質であるCDP-DAGを介して合成される経路であり、リン脂質合成が小胞体-ミトコンドリア間、ミトコンドリア外膜-ミトコンドリア内膜間のリン脂質輸送に依存する(Fig.1B)。ミトコンドリアは細胞内のエネルギーを合成するオルガネラであり、その機能を保つためには最適な脂質組成を維持する必要がある。ミトコンドリアの呼吸活性や輸送タンパク質の最適な活性を維持するために必要なCLやPEの前駆体リン脂質は、小胞体膜で合成されており、小胞体からのリン脂質輸送がミトコンドリアの機能維持に重要である。CLはミトコンドリア内膜に局在する合成酵素Crd1などによって、PAから複数の段階を経て合成される。まず、解糖系で産出されたグリセロール三リン酸に脂肪酸が結合しPAが合成される[2]。PAはUps1-Mdm35複合体によって、ミトコンドリア外膜から内膜まで輸送される。Ups1はグルコース培地でミトコンドリアの形態維持に関与するタンパク質として同定された[3]。その後、Ups1が欠損した細胞では、PAが蓄積し、CL量が減少することからPAの輸送に関与するタンパク質と考えられた。その欠損によってミトコンドリアの形態が異常になるタンパク質として同定されていたMdm35[4]とUps1が複合体を形成し、CL合成の内、初期段階にあたるPAをミトコンドリア内膜まで輸送していることが明らかになった[5,6]。Ups1-Mdm35複合体は、PAと結合するポケットとポケットを塞ぐ $\Omega$ ループ構造を持ち、Ups1とMdm35のジスルフィド結合の解離と再結合の繰り返しによってPAを輸送している[7,8]。ミトコンドリア内膜まで輸送されたPAは、CDP-DAG合成酵素Tam41によってCDP-DAGに変換される。Tam41はミトコンドリアマトリクスに局在する内膜表在性タンパク質であり、ミトコンドリアタンパク質の輸送やアセンブリに関与する品質管理を担うタンパク質として同定された[9]。その後、*tam41* $\Delta$ によってCLが減少しPAが蓄積することが報告され、CL合成に関与すると考えられた[10]。実際、精製したTam41が試験管内でCTP存在下にPAからCDP-DAGを合成することが報告された[11]。合成されたCDP-DAGは合成酵素Pgs1によって、グリセロール3リン酸と結合しPGPに変換される。Pgs1変異株では、CLやPG合成が抑制されたことから、PGP合成酵素であると報告された[12]。PGPはGep4による脱リン酸化を受けてPGに変換される。Gep4はプロヒビチン非存在下において、細胞生存に必須な因子として同定された[13]。Gep4がリン酸

結合モチーフを有していたこと、Gep4 を欠損した細胞で CL が減少していたことから、Gep4 が CL 合成に関与する因子であると考えられた。実際に質量分析によって *gep4Δ* では PGP が蓄積されたことから、Gep4 が PGP を脱リン酸化し PG を合成する酵素であることが明らかになった[14]。最終的に、合成された PG は Crd1 によって CL へ変換される。Crd1 は CDP-DAG 結合ドメインを持つ因子として同定された[15]。Crd1 変異株では CL 合成量が減少し、PG が蓄積したことから、Crd1 が CL 合成の最終段階を担う合成酵素であることが報告された[15]。

PA は小胞体に局在する合成酵素 Cds1 によって CDP-DAG に変換される。出芽酵母の Cds1 はショウジョウバエの CDP-DAG 合成酵素のホモログとして単離された[16]。CDP-DAG がイノシトールと反応すると PI が合成され、セリンと反応すると PS が合成される。PS は小胞体膜に局在する合成酵素 Cho1 によって合成される[17]。放射性物質を用いたリン脂質ラベルによって Cho1 変異株では PS が検出されなかったことから、PS 合成酵素であると示された[18]。合成された PS は Ups2-Mdm35 複合体によってミトコンドリア外膜から内膜まで輸送される。*ups2Δ* や *mdm35Δ* では、PS から PE の変換が遅延し、逆に Ups2 と Mdm35 が過剰発現した細胞では、PS から PE への変換が促進されることが放射性ラベルを用いた PS から PE へのリン脂質輸送実験によって立証された[19]。また精製した Ups2-Mdm35 が試験管内で PS 輸送活性を有することが明らかになり、輸送タンパク質複合体であることが示唆された[6,19]。ミトコンドリア内膜まで輸送された PS は合成酵素 Psd1 によって脱炭酸され PE へと変換される。Psd1 は大腸菌の PS 合成酵素 PSD の欠損による細胞致死を回復する因子としてクローニングされ、出芽酵母細胞でも PS 合成活性を持つことが示された[20]。そして、PE は再度小胞体に輸送され、メチル化酵素 Cho2 と Opi3 によって PC へ変換される。Cho2 と Opi3 はそれぞれ、PE の第一段階のメチル化 (PMME 合成) と PMME をさらにメチル化する酵素として機能する[21]。

## 1-2. オルガネラ間コンタクトサイト

出芽酵母細胞をはじめとした真核生物には、ミトコンドリア、小胞体、液胞といったオルガネラ膜構造が発達している。オルガネラは細胞状態や発生の変化に応じて特徴的な機能を果たしている。オルガネラ間は特徴的な機能を維持するため、それぞれが独立して存在していると考えられてきた。小胞体で合成されたリン脂質は、様々なオルガネラに小胞輸送によって供給されている。ミトコンドリアも小胞体で合成されたリン脂質が輸送される必要があるが、小胞体からミトコンドリアへの小胞輸送経路は存在しておらず、そのリン脂質輸送経路は未解明であった。出芽酵母細胞においては蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いた三次元的解析によって、小胞体とミトコンドリア間に近接する領域があることが示唆され、さらに、この領域で小胞体からミトコンドリアへの PS 輸送が行われていることが示唆された[22]。この報告により、異なるオルガネラ間が近接した領域で、脂質が輸送される可能性が示唆された。また、小胞体からミトコンドリアへの  $\text{Ca}^{2+}$  輸送にミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイトが関与していることが報告された[23]。その後、哺乳類細胞においてミトコンドリア-小胞体間を結合することで、ミトコンドリアへの  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みを促進するタンパク質として、ミトコンドリアダイナミタンパク質である Mfn2 が同定された[24]。このように異なるオルガネラ間がタンパ

ク質複合体やタンパク質によって物理的に結合していることが相次いで明らかになり、異なるオルガネラ間に形成されるコンタクトサイト“MCS (Membrane Contact Sites)”の機能が注目されている[25,26]。具体的にはこれまでに MCS の役割として、カルシウムシグナル伝達、活性酸素シグナル伝達、脂質シグナル伝達、オートファジー、脂質代謝、ミトコンドリア膜ダイナミクス、細胞ストレス応答、オルガネラ輸送などが報告され、精力的に研究されている[26]。

MCS の形状や MCS を構成するタンパク質の種類には多様性があることが分かっている。例えば、MCS が形成される距離は細胞種によって異なる。小胞体と細胞膜間の MCS は、哺乳類細胞では 19~22nm と固定的だが、出芽酵母細胞では 17~57nm と可変的であることが知られている[27,28]。また、オルガネラ間で機能的に異なる MCS を形成する場合もある。例えばミトコンドリア-小胞体間は、ミトコンドリア分裂を担う MCS や、リン脂質輸送を担う MCS が存在すると考えられている[29,30]。さらに、同一オルガネラ内で MCS を形成する場合もある。例えばミトコンドリア外膜と内膜間は、クリステジャンクション形成に関与する MICOS (Mitochondrial Contact Site) 複合体を介して、近接すると考えられている[31]。さらに、三つの異なるオルガネラ間に MCS が形成される場合も報告されている。具体的には、小胞体-液胞-脂肪滴間における MCS 形成や、小胞体-エンドソーム-ミトコンドリア間における MCS 形成が報告されている[32,33]。

本研究では、任意のオルガネラ膜間コンタクトを可視化する Split-GFP 実験系を開発した[34]。この実験系によって、ミトコンドリア、小胞体、液胞、ペルオキシソーム、脂肪滴間が近接することを検出した。これらオルガネラ間にはコンタクトサイトが存在する可能性が示唆された。特に、出芽酵母細胞において、液胞膜とペルオキシソーム膜間はコンタクトサイトを形成するのかわは不明であったが、本実験系によって初めて、その可能性を示唆した。その後、Wu らの研究グループによって、Pex3 が液胞とペルオキシソーム間のテザリング因子として報告された[35]。本研究で開発した Split-GFP の実験系が、オルガネラ間コンタクトサイトの探索に有用な系であると考えられる。

### 1-3. ERMES 複合体

出芽酵母においてミトコンドリア外膜と小胞体膜を結合している ERMES (ER-Mitochondria Encounter Structures) 複合体は、小胞体膜に局在する Mmm1、可溶性タンパク質である Mdm12、ミトコンドリア外膜に局在する  $\beta$  バレル型タンパク質 Mdm10、そしてミトコンドリア外膜に局在する Mdm34 (Mmm2) をコアサブユニットとして構成される複合体である[36]。Mmm1 はもともとミトコンドリア外膜に局在するタンパク質同定され、Mdm12、Mdm10、Mdm34 と同様にミトコンドリアの形態を制御する因子として発見された[37-40]。mmm1 $\Delta$ 細胞は非発酵培地で増殖不全であり、ミトコンドリアの形態がチューブ状からボール状に変化することが知られている。また Mmm1 の欠損により細胞が mtDNA (ミトコンドリア DNA) を保持できなくなることが報告されたことから、ミトコンドリアの機能維持に重要なタンパク質であると考えられてきた[41,42]。また Mdm12、Mmm1、Mdm10、Mmm2 が複合体を形成することが古くから知られており[40,43]、ミトコンドリア形態維持だけでなくミトコンドリアタンパク質の輸送に関与することも報告されていた[44]。この様な状況の中、2009 年に Kornmann らのグループによって、ERMES 複合体がミトコンドリア-小胞体間結合因子であることが

示された。ミトコンドリアと小胞体間を人工的に結合するタンパク質を出芽酵母細胞に導入し、この人工タンパク質の発現が生育に有利になる変異株をスクリーニングしたところ、Mdm12の変異株が分離された。さらに、ミトコンドリア外膜タンパク質であると考えられていたMmm1が小胞体の膜タンパク質であることが示された。Mdm12のみならずMmm1, Mdm10, Mmm2を単独欠損した細胞の増殖阻害やミトコンドリア形態異常も、ミトコンドリア-小胞体間の人工テザリングの発現によって回復したことなどから、Mmm1/Mdm12/Mdm10/Mmm2が小胞体、ミトコンドリアの膜を越えて複合体を形成することで、ミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイトを形成することが証明された[36,45]。

ERMES複合体のMmm1, Mdm12, Mdm34はリン酸結合モチーフとして知られるSMP (Synaptotagmin-like-Mitochondrial-lipid binding Protein)ドメインを持っており[46]、実際 *mdm12Δ* 細胞ではCL量が減少することが報告されたことから[5,36]、リン脂質輸送を担う可能性が示唆された。しかし、ERMESを欠損した細胞では小胞体からミトコンドリアへのPS輸送への影響が小さかったことから、ERMESがリン脂質輸送を担う可能性が否定された[47]。試験管内でミトコンドリア以外のリン脂質合成経路を排除した新しいリン脂質輸送活性評価系を樹立したことにより、疎水性のリン脂質結合ポケットを持つMmm1-Mdm12がリン脂質輸送の最小単位として働くことが相次いで報告された[30,48]。加えてリン脂質を小胞体-ミトコンドリアのMCSに提供することによってマイトファジーに必要なオートファゴソーム形成を促進することや、ミトコンドリア分裂にも関わることが報告された[29,49]。またERMES複合体のサブユニットがmtDNAと近接していることから、ERMES複合体がmtDNAの複製に関与する可能性が示唆されている。さらに、Mdm10はSAM (Sorting and Assembly Machinery)複合体とERMES複合体とは異なる領域で相互作用し、ミトコンドリア外膜タンパク質の輸送に関与することが報告された[50]。さらにMdm12やMdm34の欠損によってペルオキシソームの数が増加することや、Mdm34がペルオキシソームタンパク質Pex11と直接相互作用することから、ERMES複合体がミトコンドリア-小胞体-ペルオキシソーム間のコンタクトサイト形成に関与し、ペルオキシソームの生合成に関与する可能性も示唆されている[51,52]。

ERMES複合体のサブユニットに蛍光タンパク質を融合し、蛍光顕微鏡で観察すると、1細胞あたり平均5個程度のドットとして検出される[53]。ERMES複合体の数を調整するタンパク質としてGem1やEmr1(出芽酵母細胞ではMco6)が報告されている[53,54]。Gem1はGTPaseタンパク質であり、Mmm1やMdm34と相互作用するタンパク質として同定された。Gem1を欠損した細胞では、ERMES複合体の安定性は変化しないが、ERMESドット数の減少やサイズの増加が報告された[54]。また、Emr1はミトコンドリア外膜に局在し、ミトコンドリアの形態制御や分裂に関与するタンパク質として同定された。Emr1はMdm12と直接相互作用しており、*emr1Δ*細胞ではERMES複合体の数が減少したことから、Emr1はERMES複合体の数を制御することが示唆された[53]。

ERMES複合体と機能的に冗長なMCSが存在することが知られている。例えば、Vps39はその欠損によってERMES複合体の数が増加する遺伝子として報告された[55]。Vps39がミトコンドリアと液胞間のコンタクトサイトに局在する様子が観察され、このMCSをvCLAMP (Vacuole and Mitochondria Patch)と命名した[55]。同年に、過剰発現することでミトコンドリア-液胞間コンタクトサイトが拡大する因子としてVps39が報告された。Vps39過剰発現による結合領域の拡大は、Vps39



の液胞膜結合パートナーである Ypt7 の存在に依存しており, vCLAMP の形成には Vps39 と Ypt7 が必要であることが示唆された[56]。さらに免疫沈降法を用いて, Vps39 と結合するミトコンドリア側のタンパク質としてミトコンドリア外膜タンパク質 Tom40 が同定された[57]。ERMES 複合体が欠損すると, vCLAMP 複合体の領域が拡大し, 逆に vCLAMP 複合体が欠損すると, ERMES 複合体の領域が拡大することが報告された[58]。さらに, ERMES 複合体と vCLAMP 複合体の二重欠損は, リン脂質組成が変化し, かつ細胞致死になることから, これら MCS 同士が機能的に相互作用している可能性が示唆された[55]。加えて, ERMES 複合体の機能を相補するミトコンドリア-液胞間 MCS として Vps13-Mcp1 が報告された。Vps13 の変異株や, ミトコンドリア外膜タンパク質 Mcp1 の過剰発現は, ERMES 欠損によって引き起こされる表現系である生育阻害やミトコンドリア形態の異常, リン脂質組成の変化などを回復することが報告された[59][60]。Mcp1 が Vps13 をミトコンドリアへリクルートし, ミトコンドリア-液胞間結合を促進している可能性が示唆された[61]。興味深いことに, vCLAMP 複合体と Vps13-Mcp1 によるミトコンドリア-液胞間 MCS は機能的に独立し, ERMES 複合体の機能を相補していると報告された[57]。

また, 小胞体膜と液胞膜を結合している NVJ (Nuclear and Vacuole Junction) 複合体は Nvj1, Nvj2, Nvj3, Mdm1, Vac8, Osh1, Sac1 から構成されている[62,63]。Lam6 は NVJ 複合体構成タンパク質 Nvj1 や vCLAMP 複合体構成タンパク質 Vps39 と共局在している[58]。ERMES, vCLAMP や NVJ が担うミトコンドリアへのリン脂質輸送の機能は冗長であり, ミトコンドリア-小胞体間のリン脂質輸送はミトコンドリア-液胞間のリン脂質輸送に相補される可能性が示唆された[58]。以上のように ERMES 複合体は, 他の MCS と相互作用しながら機能を維持していると考えられる。

#### 1-4. 小胞体ストレス応答

小胞体はコレステロールや脂質の合成, 分泌タンパク質の修飾 (ジスルフィド結合形成やグリコシル化) とフォールディング, 分泌輸送を担うオルガネラである。合成されたタンパク質は小胞輸送を介してゴルジ体などのオルガネラや細胞膜へと輸送される。また, 正しくフォールディングされなかったタンパク質は, 小胞体内に留まり, 再度折り畳まれるか, 分解される。これらの過程の崩壊が小胞体ストレスを引き起こす。正常な折りたたみ構造が取れないタンパク質の蓄積によって引き起こされる小胞体ストレスがこれまで活発に研究されているが, 脂質二重膜の組成の変化によって誘導される小胞体ストレスの存在も示唆されている[64]。

小胞体ストレスへの細胞応答は, UPR (Unfolded Protein Response) 応答と呼ばれ, 3種類の応答経路が存在する。一つ目は小胞体内のタンパク質のフォールディング能力を上げる応答である。具体的には, 分子シャペロンを発現させることや, 脂質合成を活性化させて小胞体のサイズを拡大化することで, タンパク質を折り畳み直す方法が挙げられる。二つ目は, 転写を抑制することでタンパク質の翻訳を抑制する方法である。三つ目に, 小胞体内から不良タンパク質をサイトゾルへ輸送し, UPS (Ubiquitin-Proteasome System) によって異常タンパク質を分解する ERAD (ER Association Degradation) を活性化することである[65]。UPR 応答で処理しきれない慢性的な小胞

体ストレスは細胞死につながる[66]。UPR 応答不全は様々な疾患の発症につながるため、小胞体ストレス応答メカニズムの解明は医学的にも重要なトピックである[67]。

出芽酵母細胞の UPR 応答は (Fig.1C) の経路がよく知られており、小胞体膜に局在する Ire1 が担うことが報告されている。Ire1 は、イノシトール要求性変異株を回復させる遺伝子として同定された[68]。これとは独立に、薬剤で小胞体ストレスを誘導した際に、タンパク質のフォールディングを担うタンパク質 Kar2 や Pdi1 の転写が起こらない変異株としても単離された[69]。同時に Ire1 を欠損、変異した細胞はツニカマイシン存在条件下において細胞増殖阻害が報告された[69]。当時は、Ire1 が小胞体内腔の異常タンパク質蓄積を核内に伝達する役割を担うと考えられ、bZIP 転写因子 Hac1 が、小胞体ストレス時に UPR 特異的に活性化する UPRE 配列に結合する因子として同定された[70–72]。小胞体ストレス時にはまず、ER 内腔に蓄積した構造異常タンパク質に分子シャペロンである BiP が結合する。通常 BiP は小胞体膜に局在する Ire1 に結合しているが、構造異常タンパク質の蓄積に伴って BiP が Ire1 から離脱すると、Ire1 がオリゴマー化し、自己リン酸化によって自身の RNase ドメインが活性化する。活性化 Ire1 が転写因子 Hac1 の mRNA をスプライシングすることで転写活性化因子として機能的な Hac1 が発現するようになる。この転写活性化因子としての機能を持った Hac1 が核内に移行し、UPRE (Unfolded Protein Response Elements) 配列に結合することで、その下流の小胞体ストレス応答に必要なタンパク質を発現させる。例えば、小胞体膜局在シャペロンである Kar2, Pdi1, Fkb2 のなどである。また、詳細なメカニズムはまだ不明であるが、小胞体ストレス時には UPR シグナルを通して、転写因子 Ino2/Ino4 に依存したリン脂質合成酵素の発現量が増加する[73]。Opi1 は両親媒性ヘリックス領域でグリセロリン脂質の出発物質である PA を認識している。PA が豊富に存在する場合、Opi1 は PA が含まれる小胞体膜に結合して核内に移行しないため、Ino2/Ino4 の転写が活性化される。逆に、PA が不足している場合は、Opi1 が小胞体膜に結合できなくなり、核内に移行し Ino2 に結合することで、Ino2/Ino4 の転写活性を阻害する[73–75]。Ino2/Ino4 経路の活性化によるリン脂質合成量の増加によって、小胞体が拡大し、フォールディング能力を増加すると考えられる。

本研究では、Ire1 や Hac1 が担う UPR 経路とは独立して、ERMES 複合体が担う新しい小胞体ストレス応答経路の存在を示唆した。ツニカマイシンやジチオトレイトール誘導の小胞体ストレス状態では、ERMES クラスター構造が解離し、小胞体からミトコンドリアへの PS 輸送やミトコンドリアから小胞体への PE 輸送が抑制されることを発見した。リン脂質が小胞体に留まることで、小胞体の拡大に貢献していると考えられる。

#### 1-5. 細胞ストレスとオルガネラ間コンタクトサイト

上述のように、近年、MCS が、細胞のストレス応答において多くの役割を担うことが明らかになった。例えば、脂質ストレスは毒性レベルまで DAG, 脂肪酸, セラミドなどの脂質が蓄積する際に引き起こされる[76]。植物において細胞内にリン酸塩が蓄積すると、ミトコンドリア-小胞体-葉緑体の MCS のサイズが拡大し、非小胞の脂質輸送が促進されることが知られている[77]。また、窒素飢餓に誘導される選択的オートファジーには MCS が貢献している。マイトファジーでは、機能不全ミトコ

ンドリアが正常なミトコンドリアから独立している必要があるが、ERMES 複合体はミトコンドリア分裂に関与しているため、マイトファジーに ERMES 複合体は重要な役割を担っている[78]。ペルオキシソームを分解する“ペキソファジー”には、ペルオキシソーム膜に局在する Pex11 と ERMES の相互作用に依存することが報告されている[79]。同様に哺乳類細胞においては、FUNDC1 は ER-Mito の MCS に豊富に存在し、低酸素ストレス状態のミトコンドリアの分裂に必要であると考えられている[80]。酸化ストレスの緩和にも小胞体-ミトコンドリア間の MCS が関与することが報告されている[81]。過酸化水素をはじめとした ROS はミトコンドリアや小胞体、ペルオキシソームの酸化還元経路において定常的に生産されている。細胞内 ROS レベルを減少させる経路は多数存在するが、過剰な ROS はタンパク質や脂質にダメージを与える。哺乳類細胞の小胞体-ミトコンドリア間 MCS には、ROS によって活性化される沢山の還元型活性タンパク質が局在していることが報告されている[82–84]。小胞体-ミトコンドリア間の MCS に ROS レベルが過剰になった条件下では、MAP キナーゼが活性化され、ミトコンドリアの品質保証のためミトコンドリアの運動性が減少する[85]。以上のように、MCS は異なるオルガネラ間のシグナル伝達と細胞ストレス応答を担うことが徐々に明らかになってきている。

本研究では Split-GFP の実験系[34]を応用し、細胞ストレス状態におけるコンタクトサイトの結合領域の変化を評価している。ミトコンドリア外膜-小胞体膜、ミトコンドリア外膜-液胞膜、小胞体膜-液胞膜間コンタクトは、飢餓ストレス、酸化ストレスや浸透圧ストレスなどに応答して、その結合領域をダイナミックに変化させることを明らかにした。Split-GFP の実験系によって、網羅的にストレス時のオルガネラ間コンタクトの挙動を観察することが可能になり、細胞ストレス時における MCS の役割を解明する強力なツールとなると期待される。

## 1-6. 参考文献

- [1] Vance, J. E. “Historical perspective: phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine from the 1800s to the present”. *J. Lipid Res.* **59**, 923–944 (2018).
- [2] Kennedy, E. P. & Weiss, S. B. “The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides.”. *J. Biol. Chem.* **222**, 193–214 (1956).
- [3] Sesaki, H., Dunn, C. D., Iijima, M., *et al.* “Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p”. *J. Cell Biol.* **173**, 651–658 (2006).
- [4] Chen, Y., Lu, Q., Goodenough, D. A., *et al.* “Nonreceptor Tyrosine Kinase c-Yes Interacts with Occludin during Tight Junction Formation in Canine”. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1227–1237 (2002).
- [5] Tamura, Y., Onguka, O., Aiken Hobbs, A. E., *et al.* “Role for two conserved intermembrane space proteins, Ups1p and Up2p, in intra-mitochondrial phospholipid trafficking”. *J. Biol. Chem.* **287**, 15205–15218 (2012).



- [6] Connerth, M., Tatsuta, T., Haag, M., *et al.* “Intramitochondrial transport of phosphatidic acid in yeast by a lipid transfer protein”. *Science (80-. )*. **338**, 815–818 (2012).
- [7] Watanabe, Y., Tamura, Y., Kawano, S., *et al.* “Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria”. *Nat. Commun.* **6**, 1–4 (2015).
- [8] Yu, F., He, F., Yao, H., *et al.* “Structural basis of intramitochondrial phosphatidic acid transport mediated by Ups1-Mdm35 complex”. *EMBO Rep.* **16**, 813–823 (2015).
- [9] Tamura, Y., Harada, Y., Yamano, K., *et al.* “Identification of Tam41 maintaining integrity of the TIM23 protein translocator complex in mitochondria”. *J. Cell Biol.* **174**, 631–637 (2006).
- [10] Kutik, S., Rissler, M., Guan, X. L., *et al.* “The translocator maintenance protein Tam41 is required for mitochondrial cardiolipin biosynthesis”. *J. Cell Biol.* **183**, 1213–1221 (2008).
- [11] Tamura, Y., Harada, Y., Nishikawa, S. I., *et al.* “Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria”. *Cell Metab.* **17**, 709–718 (2013).
- [12] Chang, S. C., Heacock, P. N., Clancey, C. J., *et al.* “The PEL1 gene (renamed PGS1) encodes the phosphatidylglycerophosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae*”. *J. Biol. Chem.* **273**, 9829–9836 (1998).
- [13] Osman, C., Haag, M., Potting, C., *et al.* “The genetic interactome of prohibitins: Coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria”. *J. Cell Biol.* **184**, 583–596 (2009).
- [14] Osman, C., Haag, M., Wieland, F. T., *et al.* “A mitochondrial phosphatase required for cardiolipin biosynthesis: The PGP phosphatase Gep4”. *EMBO J.* **29**, 1976–1987 (2010).
- [15] Chang, S. C., Heacock, P. N., Mileykovskaya, E., *et al.* “Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*”. *J. Biol. Chem.* **273**, 14933–14941 (1998).
- [16] Shen, H., Heacock, P. N., Clancey, C. J., *et al.* “The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth”. *J. Biol. Chem.* **271**, 789–795 (1996).
- [17] Bae-Lee, M. S. & Carman, G. M. “Phosphatidylserine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of membrane-associated phosphatidylserine synthase”. *J. Biol. Chem.* **259**, 10857–10862 (1984).
- [18] Atkinson, K. D., Jensen, B., Kolat, A. I., *et al.* “Yeast mutants auxotrophic for choline or ethanolamine”. *J. Bacteriol.* **141**, 558–564 (1980).
- [19] Miyata, N., Watanabe, Y., Tamura, Y., *et al.* “Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria”. *J. Cell Biol.* **214**, 77–88 (2016).
- [20] Clancey, C. J., Chang, S. C. & Dowhan, W. “Cloning of a gene (PSD1) encoding phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of an *Escherichia coli* mutant”. *J. Biol. Chem.* **268**, 24580–24590 (1993).

- [21] Kodaki, T. & Yamashita, S. “Yeast phosphatidylethanolamine methylation pathway. Cloning and characterization of two distinct methyltransferase genes.”. *J. Biol. Chem.* **262**, 15428–15435 (1987).
- [22] Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., *et al.* “Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact”. *Eur. J. Biochem.* **264**, 545–553 (1999).
- [23] Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., *et al.* “Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses”. *Science (80-. )*. **280**, 1763–1766 (1998).
- [24] De Brito, O. M. & Scorrano, L. “Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria”. *Nature* **456**, 605–610 (2008).
- [25] Scorrano, L., De Matteis, M. A., Emr, S., *et al.* “Coming together to define membrane contact sites”. *Nat. Commun.* **10**, 1287 (2019).
- [26] Prinz, W. A., Toulmay, A. & Balla, T. “The functional universe of membrane contact sites”. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 7–24 (2020).
- [27] Fernández-Busnadiego, R., Saheki, Y. & De Camilli, P. “Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E2004–E2013 (2015).
- [28] West, M., Zurek, N., Hoenger, A., *et al.* “A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature”. *J. Cell Biol.* **193**, 333–346 (2011).
- [29] Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., *et al.* “ER tubules mark sites of mitochondrial division”. *Science (80-. )*. **334**, 358–362 (2011).
- [30] Kojima, R., Endo, T. & Tamura, Y. “A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro”. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
- [31] Friedman, J. R., Mourier, A., Yamada, J., *et al.* “MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture”. *Elife* **2015**, 1–61 (2015).
- [32] Hariri, H., Speer, N., Bowerman, J., *et al.* “Mdm1 maintains endoplasmic reticulum homeostasis by spatially regulating lipid droplet biogenesis”. *J. Cell Biol.* jcb.201808119 (2019) doi:10.1083/jcb.201808119.
- [33] Hsu, F., Spann, S., Ferguson, C., *et al.* “Rab5 and alsin regulate stress-activated cytoprotective signaling on mitochondria”. *Elife* **7**, 1–37 (2018).
- [34] Kakimoto, Y., Tashiro, S., Kojima, R., *et al.* “Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-Targeted split-GFP system”. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
- [35] Wu, H., de Boer, R., Krikken, A. M., *et al.* “Peroxisome development in yeast is associated with the formation of Pex3-dependent peroxisome-vacuole contact sites”. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1866**, 349–359 (2019).

- [36] Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., *et al.* “An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen”. *Science* (80-. ). **325**, 477–481 (2009).
- [37] Shawn M. Burgess, Michael Delannoy, R. E. J. “MMM1 Encodes a Mitochondrial Outer Membrane Protein Essential for Establishing and Maintaining the Structure of Yeast Mitochondria”. *J. Cell Biol.* **126**, 1375–1391 (1994).
- [38] Berger, K. H., Sogo, L. F. & Yaffe, M. P. “Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast”. *J. Cell Biol.* **136**, 545–553 (1997).
- [39] Sogo, L. F. & Yaffe, M. P. “Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane”. *J. Cell Biol.* **126**, 1361–1373 (1994).
- [40] Youngman, M. J., Hobbs, A. E. A., Burgess, S. M., *et al.* “Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids”. *J. Cell Biol.* **164**, 677–688 (2004).
- [41] Aiken Hobbs, A. E., Srinivasan, M., McCaffery, J. M., *et al.* “Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability”. *J. Cell Biol.* **152**, 401–410 (2001).
- [42] Meeusen, S. & Nunnari, J. “Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome”. *J. Cell Biol.* **163**, 503–510 (2003).
- [43] Istvan R. Boldogh, D. W. N. & Hyeong-Cheol Yang, Haesung Chung, Sharon Karmon, Patrina Royes, and L. A. P. “A Protein Complex Containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p Links Mitochondrial Membranes and DNA to the Cytoskeleton-based Segregation Machinery”. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4618–4627 (2003).
- [44] Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., *et al.* “The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane”. *Dev. Cell* **7**, 61–71 (2004).
- [45] Meisinger, C., Pfanschmidt, S., Rissler, M., *et al.* “The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major  $\beta$ -barrel assembly pathway of mitochondria”. *EMBO J.* **26**, 2229–2239 (2007).
- [46] Toulmay, A. & Prinz, W. A. “A conserved membrane-binding domain targets proteins to organelle contact sites”. *J. Cell Sci.* **125**, 49–58 (2012).
- [47] Nguyen, T. T., Lewandowska, A., Choi, J. Y., *et al.* “Gem1 and ERMES Do Not Directly Affect Phosphatidylserine Transport from ER to Mitochondria or Mitochondrial Inheritance”. *Traffic* **13**, 880–890 (2012).

- [48] Kawano, S., Tamura, Y., Kojima, R., *et al.* “Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm 1-Mdm 12 of ERMES”. *J. Cell Biol.* **217**, 959–974 (2018).
- [49] Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., *et al.* “Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites”. *Nature* **495**, 389–393 (2013).
- [50] Ellenrieder, L., Opaliński, Ł., Becker, L., *et al.* “Separating mitochondrial protein assembly and endoplasmic reticulum tethering by selective coupling of Mdm10”. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
- [51] Mattiazzi Ušaj, M., Brložnik, M., Kaferle, P., *et al.* “Genome-wide localization study of yeast pex11 identifies peroxisome-mitochondria interactions through the ERMES complex”. *J. Mol. Biol.* **427**, 2072–2087 (2015).
- [52] Esposito, M., Hermann-Le Denmat, S. & Delahodde, A. “Contribution of ERMES subunits to mature peroxisome abundance”. *PLoS One* **14**, e0214287 (2019).
- [53] Rasul, F., Zheng, F., Dong, F., *et al.* “Emr1 regulates the number of foci of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure complex”. *Nat. Commun.* **12**, 1–14 (2021).
- [54] Kornmann, B., Osman, C. & Walter, P. “The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14151–14156 (2011).
- [55] Elbaz-Alon, Y., Rosenfeld-Gur, E., Shinder, V., *et al.* “A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast”. *Dev. Cell* **30**, 95–102 (2014).
- [56] Hönscher, C., Mari, M., Auffarth, K., *et al.* “Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria”. *Dev. Cell* **30**, 86–94 (2014).
- [57] González Montoro, A., Auffarth, K., Hönscher, C., *et al.* “Vps39 Interacts with Tom40 to Establish One of Two Functionally Distinct Vacuole-Mitochondria Contact Sites”. *Dev. Cell* **45**, (2018).
- [58] Elbaz-Alon, Y., Eisenberg-Bord, M., Shinder, V., *et al.* “Lam6 Regulates the Extent of Contacts between Organelles”. *Cell Rep.* **12**, 7–14 (2015).
- [59] Lang, A. B., John Peter, A. T. A. T., Walter, P., *et al.* “ER-mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13”. *J. Cell Biol.* **210**, 883–890 (2015).
- [60] Tan, T., Özbalci, C., Brügger, B., *et al.* “Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis”. *J. Cell Sci.* **126**, 3563–3574 (2013).
- [61] Peter, A. T. J., Herrmann, B., Antunes, D., *et al.* “Vps13-Mcp1 interact at vacuole-mitochondria interfaces and bypass ER-mitochondria contact sites”. *J. Cell Biol.* **216**, 3219–3229 (2017).

- [62] Pan, X., Roberts, P., Chen, Y., *et al.* “Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p”. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2445–2457 (2000).
- [63] Henne, W. M., Zhu, L., Balogi, Z., *et al.* “Mdm1/Snx13 is a novel ER-endolysosomal interorganelle tethering protein”. *J. Cell Biol.* **210**, 541–551 (2015).
- [64] Halbleib, K., Pesek, K., Covino, R., *et al.* “Activation of the Unfolded Protein Response by Lipid Bilayer Stress”. *Mol. Cell* **67**, 673–684.e8 (2017).
- [65] Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., *et al.* “ERAD: The long road to destruction”. *Nat. Cell Biol.* **7**, 766–772 (2005).
- [66] Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., *et al.* “Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis”. *EMBO Rep.* **7**, 880–885 (2006).
- [67] Kaufman, R. J. “Orchestrating the unfolded protein response in health and disease”. *J. Clin. Invest.* **110**, 1389–1398 (2002).
- [68] Nikawa, J. -I & Yamashita, S. “IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Mol. Microbiol.* **6**, 1441–1446 (1992).
- [69] Cox, J. S., Shamu, C. E. & Walter, P. “Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase”. *Cell* **73**, 1197–1206 (1993).
- [70] Morl, K., Ma, W., Gething, M. J., *et al.* “A transmembrane protein with a cdc2+ CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus”. *Cell* **74**, 743–756 (1993).
- [71] Cox, J. S. & Walter, P. “A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response”. *Cell* **87**, 391–404 (1996).
- [72] Nikawa, J. I., Akiyoshi, M., Hirata, S., *et al.* “*Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression”. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4222–4226 (1996).
- [73] Cox, J. S., Chapman, R. E. & Walter, P. “The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane”. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1805–1814 (1997).
- [74] Hofbauer, H. F., Gecht, M., Fischer, S. C., *et al.* “The molecular recognition of phosphatidic acid by an amphipathic helix in Opi1”. *J. Cell Biol.* **217**, 3109–3126 (2018).
- [75] Schröder, M. & Kaufman, R. J. “ER stress and the unfolded protein response”. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **569**, 29–63 (2005).
- [76] Montgomery, M. K., De Nardo, W. & Watt, M. J. “Impact of lipotoxicity on tissue “cross talk” and metabolic regulation”. *Physiology* **34**, 134–149 (2019).

- [77] Michaud, M., Prinz, W. A. & Jouhet, J. “Glycerolipid synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria”. *FEBS J.* **284**, 376–390 (2017).
- [78] Böckler, S. & Westermann, B. “Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast”. *Dev. Cell* **28**, 450–458 (2014).
- [79] Liu, X., Wen, X. & Klionsky, D. J. “Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Contacts Are Required for Pexophagy in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Contact* **2**, 251525641882158 (2019).
- [80] Wu, W., Lin, C., Wu, K., *et al.* “FUNDC 1 regulates mitochondrial dynamics at the ER – mitochondrial contact site under hypoxic conditions”. *EMBO J.* **35**, 1368–1384 (2016).
- [81] Csordás, G., Weaver, D. & Hajnóczky, G. “Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions”. *Trends Cell Biol.* **28**, 523–540 (2018).
- [82] Marino, M., Stoilova, T., Giorgi, C., *et al.* “SEPN1, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity”. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1843–1855 (2014).
- [83] Gilady, S. Y., Bui, M., Lynes, E. M., *et al.* “Ero1 $\alpha$  requires oxidizing and normoxic conditions to localize to the mitochondria-associated membrane (MAM)”. *Cell Stress Chaperones* **15**, 619–629 (2010).
- [84] Raturi, A., Gutiérrez, T., Ortiz-Sandoval, C., *et al.* “TMX1 determines cancer cell metabolism as a thiolbased modulator of ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> flux”. *J. Cell Biol.* **214**, 433–444 (2016).
- [85] Debattisti, V., Gerencser, A. A., Saotome, M., *et al.* “ROS Control Mitochondrial Motility through p38 and the Motor Adaptor Miro/Trak”. *Cell Rep.* **21**, 1667–1680 (2017).

## 2. 材料と実験方法

### 2-1. 実験材料

#### 2-1-1. 本研究で使用した菌株と培地

##### 2-1-1-1. 大腸菌

株	遺伝子型
XL2-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gryA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup>lacZDM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)</i> ]

##### 2-1-1-2. 酵母株

株	遺伝子型	備考
FY833	<i>MATa ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-<math>\Delta</math>202 trp1-<math>\Delta</math>63</i>	野生型
YPH250	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-<math>\Delta</math>1 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 gal3</i>	野生型[1]
SEY6210	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 trp1-<math>\Delta</math>901 suc2-<math>\Delta</math>9 lys2-801</i>	野生型
<i>mmm1<math>\Delta</math></i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 mmm1<math>\Delta</math>::kanMX</i>	本研究で作製[2]
<i>ire1<math>\Delta</math>Mmm1-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 ire1<math>\Delta</math>::kanMX MMM1-GFP::TRP1</i>	本研究で作製
<i>hac1<math>\Delta</math>Mmm1-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 hac1<math>\Delta</math>::kanMX MMM1-GFP::TRP1</i>	本研究で作製
<i>ino2<math>\Delta</math>Mmm1-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 ino2<math>\Delta</math>::kanMX MMM1-GFP::TRP1</i>	本研究で作製
<i>ino4<math>\Delta</math>Mmm1-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 ino4<math>\Delta</math>::kanMX MMM1-GFP::TRP1</i>	本研究で作製
<i>Mdm12-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 MDM12-GFP::TRP1</i>	本研究室田村より供与
<i>Mdm34-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 MDM34-GFP::TRP1</i>	本研究室田村より供与
<i>gem1<math>\Delta</math>Mmm1-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 gem1<math>\Delta</math>::kanMX MMM1-GFP::TRP1</i>	本研究で作製
<i>mco6<math>\Delta</math>Mmm1-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 mco6<math>\Delta</math>::kanMX MMM1-GFP::TRP1</i>	本研究で作製
<i>Cse4-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i>	本研究で作製

	<i>CSE4-GFP::TRP1</i>	
<i>Mdm34-3PA-GFP</i>	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3</i> <i>MDM34-3PA-GFP::TRP1</i>	本研究で作製
<i>mmm1-1</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1</i> <i>his3-Δ200 leu2-Δ1 gal3 mmm1-1</i>	[3]
<i>mmm1-1</i> <i>Mdm12-GFP</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1</i> <i>his3-Δ200 leu2-Δ1 gal3 MDM12-GFP::TRP1</i> <i>mmm1-1</i>	本研究で作製
<i>Mdm12-GFP</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1</i> <i>his3-Δ200 leu2-Δ1 gal3 MDM12-GFP::TRP1</i>	本研究で作製
<i>psd2Δdpl1Δ</i>	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-Δ202</i> <i>trp1-Δ63 psd2Δ::HIS3 dpl1Δ::URA3</i>	[4]
<i>psd2Δdpl1Δ</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1</i> <i>his3-Δ200 leu2-Δ1 gal3 psd2Δ::HIS3</i> <i>dpl1Δ::URA3</i>	本研究で作製
<i>mmm1-1</i> <i>/psd2Δdpl1Δ</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1</i> <i>his3-Δ200 leu2-Δ1 gal3 psd2Δ::HIS3</i> <i>dpl1Δ::URA3 mmm1-1</i>	本研究で作製
<i>psd2Δdpl1Δrho<sup>0</sup></i>	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-Δ202</i> <i>trp1-Δ63 psd2Δ::kanMX dpl1Δ::URA3 rho<sup>0</sup></i>	本研究で作製
<i>psd2Δdpl1Δfzo1Δ</i>	<i>psd2Δdpl1Δfzo1Δ- MATa ura3-52 his3-Δ200</i> <i>leu2-Δ1 lys2-Δ202 trp1-Δ63 psd2Δ::kanMX</i> <i>dpl1Δ::URA3 fzo1Δ::hpnMX</i>	本研究で作製
<i>Mmm1-GFP</i> <i>Idh1-mCherry</i>	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-Δ202</i> <i>trp1-Δ63 MMM1-GFP::TRP1 IDH1-</i> <i>mCherry::kanMX6</i>	本研究で作製
<i>Ifa38-GFP(1-10)</i> <i>Dpp1-V5-GFP11</i>	<i>MATa leu2 ura3 his3 trp1 suc2 lys2</i> <i>ura3Δ::IFA38-GFP-(1-10)hphMX</i> <i>leu2Δ::DPP1-V5-GFP11-natMX</i>	本研究で作製
<i>Tom71-GFP</i> <i>(1-10)</i> <i>Ifa38-v5-GFP11</i>	<i>MATa leu2 ura3 his3 trp1 suc2 lys2</i> <i>ura3Δ::TOM71-GFP (1-10)-hphMX</i> <i>leu2Δ::IFA38-V5- GFP11-natMX</i>	本研究で作製
<i>Tom71-GFP</i> <i>(1-10)</i> <i>Dpp1-v5-GFP11</i>	<i>MATa leu2 ura3 his3 trp1 suc2 lys2</i> <i>ura3Δ::TOM71- GFP (1-10)-hphMX</i> <i>leu2Δ::DPP1-V5-GFP11-natMX</i>	本研究で作製



### 2-1-1-3. 大腸菌用培地

培地	組成
LB+amp	0.5 % (w/v) yeast extract, 1 % tryptone, 1 % (w/v) NaCl, 50 mg/ml ampicillin

寒天培地には 2.0 % (w/v) agar を加えた。

### 2-1-1-4. 酵母用培地

培地	組成
YPD	1.0 % yeast extract, 2.0 % (w/v) polypeptone, 2.0 % (w/v) D-glucose
SCD	0.67 % (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 0.5 % (w/v) vitamin assay casamino acid 2.0 % (w/v) D-glucose
SD	0.67 % (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 2.0 % (w/v) D-glucose
SD-N	0.17 % (w/v) yeast nitrogen base without ammonium sulfate, 2.0 % (w/v) D-glucose
S-DN	0.17 % (w/v) yeast nitrogen base without ammonium sulfate,

必要に応じてアミノ酸及びウラシルを(表. 1)の濃度で加えた。*kanMX4*, *hphMX*, *natMX* 遺伝子陽性酵母株は, YPD に終濃度 200 µg/ml の G418, clonNAT もしくは 500 µg/ml の Hygromycin を加えた培地でそれぞれ選択した。寒天培地には 2.0 % (w/v) agar を加えた。

表. 1 SD 培地のアミノ酸及びウラシル添加濃度

アミノ酸	SD 終濃度/mM
アデニン	0.43
イソロイシン	0.30
バリン	1.2
ヒスチジン	0.26
ロイシン	0.46
リジン	0.4
メチオニン	0.13
フェニルアラニン	0.67
トレオニン	1.5
トリプトファン	0.2
チロシン	0.15
ウラシル	0.36
グルタミン酸	0.65

アスパラギン酸	0.71
アスパラギン	0.31
グルタミン	0.28
グリシン	0.55
アラニン	0.46
プロリン	0.35
セリン	3.4
システイン	0.34

## 2-1-2. 本研究で使用したプラスミド

番号	名称	特徴	引用
pYU21	pBS- <i>kanMX4</i>		[5]
pYU22	pBS- <i>hphMX</i>		[5]
pYU29	pFA6a-GFP-S65T-TRP1	GFP を発現するためのプラスミド [ <i>CEN TRP1</i> ]	[6]
pYU30	pFA6a-GFP-S65T-KanMX4	GFP を発現するためのプラスミド [ <i>CEN KanMX4</i> ]	[6]
pYU36	pFA6a-mCherry-kanMX4	mCherry を発現するためのプラスミド [ <i>CEN KanMX4</i> ]	[7]
pFL8	pRS316-ADH1p-Su9-RFP	Su9-RFP を発現するためのプラスミド [ <i>CEN URA3</i> ]	瀬崎博美博士より 供与[5]
pFL17	pRS316-GPDpBipN-mCherry-HDEL	BipN-mCherry を発現するためのプラスミド [ <i>CEN URA3</i> ]	本研究室で作製
pFL26	pRS316-Sec63-GFP	Sec63-GFP を発現するためのプラスミド [ <i>CEN URA3</i> ]	本研究室で作製
pYC143	pBS-GPDp-Tom71-GFP(1-10)-CyC1ter- <i>hphMX</i>	Tom71-GFP1-10 を発現するためのプラスミド	本研究室で作製
pYC135	pBS-GPDp-Ifa38-V5-GFP(11)-CyC1ter- <i>natNT2</i>	Ifa38-V5-GFP11 を発現するためのプラスミド	本研究室で作製
pYC137	pBS-GPDp-DPP1-V5-GFP(11)-CyC1ter- <i>natNT2</i>	Dpp1-V5-GFP11 を発現するためのプラスミド	本研究室で作製
pYC141	pBS-GPDp-Ifa38-GFP(1-10)-CyC1ter- <i>hphMX</i>	Ifa38-GFP1-10 を発現するためのプラスミド	本研究室で作製
pYC453	pRS314-Mmm1(2-99Δ)-GFP	Mmm1(2-99Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製

pYC454	pRS314-Mmm1(2-14Δ)-GFP	Mmm1(2-14Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC455	pRS314-Mmm1(15-33Δ)-GFP	Mmm1(15-33Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC456	pRS314-Mmm1(34-50Δ)-GFP	Mmm1(34-50Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC457	pRS314-Mmm1(51-64Δ)-GFP	Mmm1(51-64Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC458	pRS314-Mmm1(65-83Δ)-GFP	Mmm1(65-83Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC459	pRS314-Mmm1(84-99Δ)-GFP	Mmm1(84-99Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC460	pRS314-Mmm1(2-33Δ)-GFP	Mmm1(2-33Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC461	pRS314-Mmm1(15-50Δ)-GFP	Mmm1Δ(15-50Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC462	pRS314-Mmm1(34-63Δ)-GFP	Mmm1Δ(34-63Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC463	pRS314-Mmm1(51-83Δ)-GFP	Mmm1Δ(51-83Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC464	pRS314-Mmm1(65-99Δ)-GFP	Mmm1(65-99Δ)-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製
pYC465	pRS314-Mmm1-GFP	Mmm1-GFP を発現するためのプラスミド	本研究で作製

### 2-1-3. 本研究で使用したオリゴヌクレオチド

番号	名称	塩基配列 (5'-3')
NU1174	Mmm1-tag-F	GTTACCAAGTATGTGGCCACGTAGTAAAAATACGAGAGA AGAAAAGCCTACAGAGTTACGGATCCCCGGTTAATTA
NU1175	Mmm1-tag-R	CCAAAAATGAGGCAGAGAAGATAGGAAAAAGATAGAAC AAAAAATTTGTACATAAATATGAATTCGAGCTCGTTTAA C
NU1129	Mmm1-tag- check-F	GGAGTTTGTCTTCTACTTCGAACGG
NU1130	Mmm1-check- R	AATACACATTGTCAACTATAATGC

YU1518	Mdm34-3PA-tag-F	CAAGAACCTTCAAATAACTGGAAATGGGGCATGGAGGATA GCGCCGCAGCTTATCATCGGATCCCCGGGTTAATTAA
YU1519	Mdm34-tag-R	ATCGGAGAGTATGTATTTGTGTAGTTATGTACTTA GATATGTAACTTAATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
YU1347	Ire1-check-F	CCTCTTCCCCACGTCCATTATCAC
YU1348	Ire1-check-R	GTATGTTCGATGTTTCGATGTTTATGAG
YU1349	Hac1-check-F	GTTCTCTTTTGTTCGCTCCCTACATTC
YU1350	Hac1-check-R	ATTGTAGGAGGGCGCGCCAACCTCACG
YU1358	Ino2-check-F	CCCTCCGTCATCGGCAGGGCGTTGAC
YU1359	Ino2-check-R	CCATCATTGCCTCCGGATTCTC
YU1360	Ino4-check-F	CCGGGATATTCAATTCTAGGAACCTCG
YU1361	Ino4-check-R	CGGCACACTTTCGATGAAGGAAAGC
YU1510	URA3-insert-F	TTTTGATTTCGGTAATCTCCGAGCAGAAGGAAGAACGAAGG AAGGAGCACA GTTGTA AAAACGACGGCCAGT
YU1511	URA3-insert-R	AATTTTTTTTTTTTCGTCATTATAGAAATCATTACGACCGA GATTCCCAGCACAGGAAACAGCTATGACC
YU1506	Leu2-insert-F	CGCCGGAACCGGCTTTTCATATAGAATAGAGAAGCGTTCA TGAATAAATGGTTGTA AAAACGACGGCCAGT
YU1507	Leu2-insert-R	GAGCCATTAGTATCAATTTGCTTACCTGTATTCTTTACAT CCTCCTTTTCACAGGAAACAGCTATGACC
YU1512	Leu2-check-F	AATTTTCAGAGGTCGCCTGAC
YU1513	Leu2-check-R	TCATGATTTTCTGTTACACC
YU1514	URA3-check-F	TGGTTTCAGGGTCCATAAAG
YU1515	URA3-check-R	TACTGT TACTTGTTCTGGC
YU35	Fzo1-check-F	CTTAATAAATAAAGCAAAGTACATCCGAACATAGC
YU36	Fzo1-check-R	GCAGGTTTTGCAAATCATTAAAGCAGATACACAAGG
YU101	Idh1-tag-F	CTTCTACTACTGACTTCACGAATGAAATCATCAACAAATTA TCTACCATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA
YU102	Idh1-tag-R	AATTTGAACACACTTAAGTTGCAGAACAAAAAAGGGG AATTGTTTTCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
YU103	Idh1-tag-check-F	GGAAGACCCTCATATATATATATCCCCG
YU104	Idh1-check -R	GAGCAGACCAAAAAGATTGAACATC

YU1563	Cse4-tag-F	TAATGAAGAAAGACATGCAACTAGCAAGAAGAATCAGGG GACAGTTTATTCGGATCCCCGGGTAAATTA
YU1564	Cse4-tag-R	AAACCCCGAAAAAGGGAAAAATCGGCTCCAGCCCTGAAG CACAAATATCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
YU1565	Cse4-tag- check-F	CATACAAACCTCTTGCGCTGC
YU1566	Cse4-check-R	GTATATCCTGCAGAAGTATCCC
YU3263	gem1-check-Fz	ACAAATAAAAATTGAAAACAAAAATAGCGG
YU3264	gem1-check-F	GCTCCGCCTTAGGCCAGATATCATAGAAAT
YU3273	mco6-check-F	CATTGCTACTAGCAGCCAGC
YU3274	mco6-check-F	GCTCTCGTTCAAAGAGCAAT
YU3872	NotI-Mmm1- pro-F	AATTGCGGCCGCATAGGTATTTTCATCACAAAGG
YU3873	Mmm1-No.0-R	CAAAAACCCCATTTTCAGAAAAAGGCTACAGG
YU3874	Mmm1-No.1-R	CAAACGTCATTTTCAGAAAAAGGCTACAGG
YU3875	Mmm1-No.2-R	AATTCTCCATTAACGAATCCGTTTCGGTGG
YU3876	Mmm1-No.3-R	ACTCTGAGTTGATTAGTCTCTGTAAATGTTC
YU3877	Mmm1-No.4-R	CATCATCGAGGTTTGAAGTTTGCTTTAAGTC
YU3878	Mmm1-No.5-R	CTAACGATCCACCTTTGAAGCTCCCGTTTTTAC
YU3879	Mmm1-No.6-R	CAAAAACCCCTAACGAAGAAGGATGCAACAC
YU3880	Mmm1-No.7-R	AATTCTCCATCATTTTCAGAAAAAGGCTACAGG
YU3881	Mmm1-No.8-R	ACTCTGAGTTTAAACGAATCCGTTTCGGTGG
YU3882	Mmm1-No.9-R	CATCATCGAGGATTAGTCTCTGTAAATGTTC
YU3883	Mmm1-No.10- R	CTAACGATCCGTTTGAAGTTTGCTTTAAGTC
YU3884	Mmm1-No.11- R	CAAAAACCCACCTTTGAAGCTCCCGTTTTTAC
YU3885	Mmm1-No.0-F	TCTGAAAATGGGGTTTTTTGTAGGACAGCTAAG
YU3886	Mmm1-No.1-F	TTTTCTGAAAATGACGTTTGACGATTATATAAG
YU3887	Mmm1-No.2-F	GGATTCGTTAATGGAGAATTTGAAGGGTTC
YU3888	Mmm1-No.3-F	GAGACTAATCAACTCAGAGTTTAATGTCAG

YU3889	Mmm1-No.4-F	AACTTCAAACCTCGATGATGCAATTCAAGC
YU3890	Mmm1-No.5-F	CTTCAAAGGTGGATCGTTAGCAACGTCCTCC
YU3891	Mmm1-No.6-F	TTCTTCGTTAGGGTTTTTTGTAGGACAGCTAAG
YU3892	Mmm1-No.7-F	TTTTCTGAAAATGGAGAATTTGAAGGGTTC
YY3893	Mmm1-No.8-F	GGATTCGTTAAACTCAGAGTTTAATGTCAG
YU3894	Mmm1-No.9-F	GAGACTAATCCTCGATGATGCAATTCAAGC
YU3895	Mmm1-No.10-F	AACTTCAAACGGATCGTTAGCAACGTCCTCC
YU3896	Mmm1-No.11-F	CTTCAAAGGTGGGTTTTTTGTAGGACAGCTAAG
YU3897	BglII-ADH1-ter-R	AAACAGATCTATATTACCCTGTTATCCCTAGC

#### 2-1-4. 本研究で使用した抗体

抗体	生物種	使用時の希釈	備考
抗 Tom70 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Tim23 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 GFP 抗体	マウス	1/2,000	JL-8(TaKaRa)
抗 Tom22 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Tom40 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Kar2 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Pdi1 抗体	マウス	1/2,000	Anti-PDI, Mouse-Mono(RL90) (Gene Tex)
抗 Opi3 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Cho1 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Cho2 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Hac1 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Fzo1 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Mmm1 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
抗 Mdm12 抗体	ウサギ	1/2,000	遠藤研究室より供与
Cy5 標識-抗マウス IgG 抗体	ヤギ	1/10,000	Life Technologies(A10524)
Cy5 標識-抗ウサギ IgG 抗体	ヤギ	1/10,000	Life Technologies(A10523)

## 2-2. 実験操作

### 2-2-1. 遺伝子操作

制限酵素処理は Takara Bio の各種制限酵素を用いた。プラスミドから切り出した DNA 断片の ligation には DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio) を用いた。PCR 法では KOD One (Toyobo) を使用した。PCR 産物の精製およびアガロースゲルからの DNA 回収には FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) を用いた。大腸菌からのプラスミドの回収には FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics) を用いた。DNA の塩基配列の解析は、eurofin Genomics DNA シーケンス受託サービスを用いた。

### 2-2-2. 酵母ゲノム DNA の抽出

1 ml の YPD 液体培地を加えた 1.5 ml チューブ (BioBik, 103015) または 24 ウェルプレート (TPP, 92024) に、酵母コロニーを 1 つ植菌し、30°C で 15 時間以上培養した後、飽和した酵母培養液を 1,710 × g, 25°C で 2 分間遠心し、菌体を回収した。上澄みを取り除いた後、菌体を 200 μl の Lysis Solution (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% TritonX-100, 1% SDS) に懸濁し、新しいエッペンチューブに移した。そこに、200 μl の phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) (ナカライテスク, 25970-14) と 100 μl のガラスビーズを加え、4 分間ボルテックスミキサーを用いて攪拌した。そこにさらに 200 μl の TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) を加え、攪拌した。20,630 × g, 25°C で 5 分間遠心した後、上部の水層 20 μl を新しいチューブに分注し、90 μl の滅菌水を加えた。これをゲノム DNA 溶液として PCR の鋳型として用いた。

### 2-2-3. 酵母株へのプラスミドまたは DNA 断片の導入

対数増殖期の酵母細胞懸濁液 5 ml を集菌し、100 mM lithium acetate 1 ml を加えて懸濁した。その懸濁液を、エッペンチューブに 100 μl ずつ分注し、20,630 × g, 室温で 15 秒間遠心した。上澄みをアスピレーターで除去した後、エッペンチューブに 50 % (w/v) PEG3500 240 μl, 1.0 M lithium acetate 36 μl, 2.0 mg/ml carrier DNA (デオキシリボ核酸 ナトリウム塩 サケ精巢由来, Sigma) 24 μl, 滅菌水 47 μl, プラスミド 3 μl を加えて懸濁した。この懸濁液を 60 分間 30°C でインキュベートした後、5,870 × g, 室温で 60 秒間遠心して、細胞を沈殿させた。上澄みを除去後、50 μl の滅菌水で細胞を懸濁後、適切な寒天培地に塗布して 30°C で 2 日間以上培養した。

酵母株に DNA 断片を導入する場合は、対数増殖期の酵母細胞懸濁液 5 ml を集菌し、100 mM lithium acetate 1 ml を加えて懸濁した。その懸濁液を、エッペンチューブに 100 μl ずつ分注し、20,630 × g, 室温で 15 秒間遠心した。上澄みをアスピレーターで除去した後、エッペンチューブに 50 % (w/v) PEG3500 240 μl, 1.0 M lithium acetate 36 μl, 2.0 mg/ml carrier DNA (デオキシリボ核酸 ナトリウム塩 サケ精巢由来, Sigma) 24 μl, 滅菌水 47 μl, プラスミド 3 μl を加えて懸濁した。懸濁液を 30 分間 30°C でインキュベートした後、20 分間 42°C でインキュベートした。懸濁液を 16,630 × g, 室温で 60 秒間遠心して、上澄みをアスピレーターで除去した。さらに 1 ml YPD 液

体培地で懸濁し、2 時間 30°C でインキュベートして回復させた。最後に菌体を 50  $\mu$ l 滅菌水で懸濁後、適切な寒天培地に塗布して 30°C で 2 日間以上培養した。

#### 2-2-4. 遺伝子欠損酵母株の作製

出芽酵母の欠損株ライブラリーから得られた目的の欠損株 (*mmm1 $\Delta$* , *ire1 $\Delta$* , *hac1 $\Delta$* , *ino2 $\Delta$* , *ino4 $\Delta$* , *fzo1 $\Delta$* , *gem1 $\Delta$* , *mco61 $\Delta$* ) から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、Check プライマー F/R (YU1077/2096, YU1347/1348, YU1349/1350, YU1358/1359, YU1360/1361, YU35/36, YU3263/3264, YU3273/3274) を用いた PCR 反応を行い、*KanMX4* もしくは *HphMX4* をコードする DNA の両側に目的遺伝子の開始コドン直前の約 70 bp の相同配列と終止コドンの直後の相同配列の約 70 bp を付加した DNA 断片を増幅した。この DNA 断片を酵母株に導入し、目的遺伝子が *kanMX4* もしくは *hphMX* 遺伝子に入れ替わった酵母株を 200  $\mu$ g/ml の G418, もしくは 200  $\mu$ g/mL の hygromycin を加えた YPD 培地で選択した。得られた酵母株から調製したゲノム DNA を鋳型とし、Check プライマー F/R を用いた PCR を行うことにより、目的遺伝子が *kanMX4* もしくは *hphMX* 遺伝子に置き換わったことを確認した。

#### 2-2-5. タグ遺伝子導入変異酵母株の作製

pFA6a-GFP-S65T-TRP1 または pFA6a-mCherry-kanMX4 を鋳型とし、プライマー (NU1174/1175, YU1518/1519, YU101/YU102, YU1563/YU1564) を用いた PCR 反応を行い、*GFP-S65T-TRP1* または *mCherry-kanMX4* をコードする DNA の N 末領域に目的遺伝子の終止コドン直前の相同配列と、C 末領域に目的遺伝子の終止コドンの直後の相同配列の約 50 bp を付加した DNA 断片を増幅した。この DNA 断片を酵母株に導入し、目的遺伝子 *GFP-S65T-TRP1/mCherry-kanMX4* が融合し発現する酵母株を SCD-Trp 培地または、YPD+G418 (200  $\mu$ g/ml) 培地で選択した。得られた酵母株から調製したゲノム DNA を鋳型とし、Check プライマー (NU1129/1130, YU1518/1519, YU103/104, YU1564/1565) を用いた PCR を行うことにより、目的遺伝子に *GFP-S65T-TRP1* または *mCherry-kanMX4* が挿入されたことを確認した。

#### 2-2-6. 酵母株の増殖確認実験

酵母細胞のシリアルダイリューションは酵母細胞を適切な液体培地中で、2 日以上 30°C で培養した。飽和した酵母培養液の濁度を吸光光度計で測定し、滅菌水と懸濁して細胞数を揃えた。細胞数を揃えた懸濁液を滅菌水で  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  倍に希釈した後、2  $\mu$ l ずつ寒天培地に滴下した。その後、23°C~37°C で約 2~7 日培養した。酵母細胞の増殖曲線を作製する場合は、酵母細胞を適切な液体培地で、30°C で 2 日以上培養して飽和させた酵母培養液の濁度を吸光光度計で測定し、滅菌水と懸濁して細胞数を揃えた。5 ml の液体培地に  $OD_{600} = 0.1$  程度になるように懸濁し、30°C で培養し 4 時間ごとに  $OD_{600}$  を測定した。



### 2-2-7. 蛍光顕微鏡を用いた出芽酵母細胞の観察

酵母株を適切な液体培地で 30°C で 15 時間以上前培養し、 $2,330 \times g$ , 35 秒, 室温で遠心して集菌した。上澄みを 50  $\mu\text{l}$  程度残して再懸濁した酵母懸濁液 2  $\mu\text{l}$  をスライドガラス上 (MATSUNAMI, S7441) に添加し、カバーガラス (MATSUNAMI, No.1) で覆いプレパラートを作製した。CSUX1 共焦点装置 (Yokogawa Electric Corporation) を取り付けけた蛍光顕微鏡 IX-83 (Olympus) を用いて、100 倍の対物レンズ (OLYMPUS, UPLSAPO100XO) で酵母細胞を観察した。Z 軸方向 0.2  $\mu\text{m}$  ごとに約 20~30 枚, 高感度冷却 EMCCD カメラ evolve512 (Photometrics) または sCMOS カメラ Zyla5.5 (Andor) で光学切片を撮影した。

### 2-2-8. 超解像蛍光顕微鏡 SCLIM を用いたタンパク質の細胞局在のライブセルイメージング

酵母株を SCD-Trp-Ura 液体培地で 30°C で 15 時間以上培養し  $1,500 \times g$ , 室温で 5 分間遠心し集菌し、上澄みを 100  $\mu\text{l}$  残して再懸濁した。スライドガラスにシリコングリースで枠を作り、枠内に 100  $\mu\text{l}$  の 0.1% コンカナバリン A を塗布した。5 分程度静置し、乾燥させた後、余分なコンカナバリン A を除去し、酵母懸濁液をスライドガラスに滴下した。超解像蛍光顕微鏡 SCLIM[8,9] を用いて酵母細胞を観察した。Z 軸方向 0.2  $\mu\text{m}$  ごとに約 70 枚, 10 秒間隔で光学切片を撮影した。

### 2-2-9. ホモジナイザーを用いた酵母からの粗ミトコンドリア画分の単離

酵母細胞を 1 L の YPD または SCD 液体培地中で  $\text{OD}_{600} = 1.0$  程度まで 30°C または 23°C で培養し、大型遠心機で  $3,350 \times g$ , 室温で 5 分間遠心し集菌した。上澄みを取り除き、菌体を 40 ml の Tris-HCl buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 10 mM DTT) に懸濁後、30°C で 10 分間振盪した。その後、 $3,350 \times g$ , 4°C で 5 分間遠心して菌体を回収し、菌体の湿重量を測定した。菌体を 40 ml の 1.2 M Sorbitol Buffer に懸濁後、 $3,350 \times g$ , 4°C で 5 分間遠心し菌体を回収することで洗浄した。菌体の重量 1 g 辺り 5 mg の Zymolyase 20T (ナカライテスク, Code 07663-91), または菌体の重量 1 g 辺り 1 mg Zymolyase 100T (ナカライテスク, Code 07655-55) を含む 40 ml の 1.2 M Sorbitol Buffer に菌体に懸濁し、30°C で 30 分間振盪することで細胞をスフェロプラスト化した。尚、以下の操作は全て氷上で行い、冷却したバッファーを用いた。得られたスフェロプラストを 30 ml の 1.2 M Sorbitol Buffer で洗浄後、30 ml の Breaking Buffer (0.6 M Mannitol, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) に懸濁し、ホモジナイザーで 15~25 回ホモジナイズすることで細胞を破碎した。懸濁液を  $2,000 \times g$ , 4°C で 5 分間遠心し、未破碎細胞および核やゴミを取り除いた後、上澄みを  $12,000 \times g$ , 4°C で 10 分間遠心し、ミトコンドリアを含む沈殿を回収した。得られた沈殿を 30 ml の SEM Buffer (250 mM スクロース, 10 mM MOPS-KOH pH 7.2, 1 mM EDTA) で洗浄後、1~2 ml の SEM Buffer に懸濁し、粗ミトコンドリアとした。単離したミトコンドリア 20  $\mu\text{l}$  を 0.6% SDS 180  $\mu\text{l}$  に懸濁し 95°C で 5 分間ヒートショックした後、 $\text{OD}_{280}$  を測定した。 $\text{OD}_{280} = 0.21$  が 10 mg/ml であるとしてタンパク質濃度を算出した。その後、100~200  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

#### 2-2-10. SDS-PAGE およびウェスタンブロットリング

SDS-PAGE によりタンパク質を展開後、ウェスタンブロットリングは[10]に従って行った。酵母のトータルライセートの調製は以下のように行った。まず酵母株を適切な液体培地で 30°C で 15 時間以上培養し 1,500 × g, 室温で 5 分間遠心し集菌した。上澄みを除去し、細胞を 0.1 M NaOH 500 μl で懸濁して室温で 5 分間静置した。その後、16,630 × g, 室温, 1 分間の遠心により回収した細胞を、βメルカプトエタノール 4 μl を含む 200 μl の SDS サンプル Buffer で懸濁し、95°C で 5 分間ヒートショックした。その後、12,000 × g, 4°C で 5 分間遠心したサンプルをトータルライセートとした。また、(実験方法 2-2-9)で調製した粗ミトコンドリア膜画分 500 μg を 12,000 × g, 4°C で 10 分間遠心し、SEM Buffer を除去した。沈殿を 200 μl の SDS サンプル Buffer で懸濁し、95°C で 5 分間ヒートショックしたサンプルをミトコンドリアサンプルとした。ゲル中のタンパク質を PVDF 膜 (Immobion-FL Transfer Membrane, Millipore) を濾紙と一緒にブロットリング装置 (WSE-4045, ATTO) に挟み、定電圧 18 V, 1 時間で転写した。転写後の PVDF 膜を終濃度 1% のスキムミルク (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % (w/v) Tween20, 1% スキムミルク) に浸して 30 分間振盪することで、ブロッキングした。その後、1 次抗体を加えた新しい 1% スキムミルク溶液に置換し、PVDF 膜を室温で 2 時間もしくは、4°C で一晩振盪した。PVDF 膜を TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % (w/v) Tween20) 複数回洗浄した後に、さらに 30 分間室温で振盪して洗浄した。洗浄後、2 次抗体を加えた終濃度 1% のスキムミルクに溶液中で PVDF 膜を、1 時間遮光して振盪した。その後、PVDF 膜を TBST で複数回軽く洗浄した後に、さらに 30 分間室温で浸透して洗浄した。PVDF 膜を、紙タオルに挟み 50°C に保温した乾熱滅菌器で 10 分間程度乾燥させたあと、Amersham Typhoon scanner (Cytiva) を用いて蛍光を検出した。

#### 2-2-11. <sup>32</sup>P を用いたリン脂質組成分析

酵母株を YPD 液体培地で、30°C で 20 時間以上培養した。この培養液 2 μl を、1 μCi/ml [<sup>32</sup>P]Pi を含む YPD 液体培地 1 ml に加え、30°C で 15 時間培養した。細胞を室温で 13,200 × g で 3 分間遠心し、細胞を回収した。細胞を 330 μl の Methanol に懸濁し、100 μl のガラスビーズを加えて 20 分間以上攪拌した。その後、600 μl の Chloroform を加え、さらに 5 分間攪拌した。12,000 × g, 室温で 10 分間遠心し、ビーズを吸わないように、上澄みを新しいエッペンチューブに移した。200 μl の 0.1 M HCl/0.5 M NaCl を加え、5 分間攪拌した。サンプルを室温で 210 × g, 5 分間遠心し、水層と有機層に分離した。水層をアスピレーターで取り除き、有機層に含まれている脂質を窒素ガス雰囲気下で乾燥させた後、80 μl の Chloroform に脂質を溶かし、25 μl を TLC 分析 (実験方法 : 2-2-14) 用のサンプルとした。

#### 2-2-12. <sup>32</sup>Pi を用いた細胞内リン脂質組成のタイムコース分析

YPD 培地で培養した対数増殖期の酵母細胞懸濁液 5 ml を遠心し、上澄みを除去した後、1 μCi/ml [<sup>32</sup>P]Pi を含む 5.5 ml YPD 培地に再度懸濁した。懸濁液 1 ml を 13,200 × g, 室温で 3 分間遠心し、沈殿を回収した後、細胞を 330 μl の Methanol に懸濁し、0 時間目のサンプルとして冷

凍庫で保存した。残りの培養液を 30°C で培養し、1 時間ごとに上記と同様にサンプルを回収した。Methanol 中で保存していた細胞に 100  $\mu$ l のガラスビーズを加えて 20 分間以上攪拌した。その後、600  $\mu$ l の Chloroform を加え、さらに 5 分間攪拌した。室温で 12,000  $\times$  g、室温で 10 分間遠心し、ビーズを吸わないように、上澄みを新しいエッペンチューブに移し、200  $\mu$ l の 0.1 M HCl/0.5 M NaCl を加え、5 分間攪拌した。サンプルを 210  $\times$  g、室温で 5 分間遠心し、水層と有機層に分離した。水層をアスピレーターで取り除き、有機層に含まれている脂質を窒素ガス雰囲気下で乾燥させた後、25  $\mu$ l の Chloroform に脂質を溶かし、全量を TLC 分析に使用した。

#### 2-2-13. $^{14}\text{C}$ -Serine を用いた細胞内リン脂質輸送分析

対数増殖期の酵母細胞懸濁液 20 ml を遠心し、上澄みを除去した後、3  $\mu\text{Ci/ml}$  L- $^{14}\text{C}$ ]serine を含む PBS 1 ml に懸濁し、20 分間 30°C でインキュベートした。細胞懸濁液を 2 回 YPD 培地で洗浄し、5.5 ml YPD 培地に再度懸濁した。懸濁液 1 ml を 13,200  $\times$  g、室温で 3 分間遠心し、沈殿を回収した後、細胞を 330  $\mu$ l の Methanol に懸濁し、0 時間目のサンプルとして冷凍庫で保存した。残りの培養液を 30°C で培養し、1 時間ごとに上記と同様にサンプルを回収した。Methanol 中で保存していた細胞に 100  $\mu$ l のガラスビーズを加えて 20 分間以上攪拌した。その後、600  $\mu$ l の Chloroform を加え、さらに 5 分間攪拌した。室温で 12,000  $\times$  g、室温で 10 分間遠心し、ビーズを吸わないように、上澄みを新しいエッペンチューブに移した。200  $\mu$ l の 0.1 M HCl/0.5 M NaCl を加え、5 分間攪拌した。サンプルを室温で 210  $\times$  g、5 分間遠心し、水層と有機層に分離した。水層をアスピレーターで取り除き、有機層に含まれている脂質を窒素ガス雰囲気下で乾燥させた後、25  $\mu$ l の Chloroform に脂質を溶かし、全量を TLC 分析に使用した。

#### 2-2-14. TLC 分析

1.8 % Boric Acid 100 % Ethanol 溶液に TLC プレート (Macherey-Nagel, 810123) を約 10 分間浸し、乾燥させた後、100°C のオーブンに入れて 15 分間放置した。Chloroform に溶かした脂質 20  $\mu$ l を TLC プレートに滴下し、Chloroform/Ethanol/Water/Triethylamine (30:35:5:35, v/v) を展開溶媒として用い、展開槽で 4 時間リン脂質を展開した。その後、展開した TLC プレートを完全に乾燥させ、ラップで包んでからイメージングプレートに 1 晩以上はさみ、Amersham Typhoon scanner (GE lifesciences) を用いて  $^{32}\text{P}$  もしくは  $^{14}\text{C}$  のシグナルを検出した。

#### 2-2-15. グリセロール密度勾配遠心解析

0.3 % のジギトニンを溶かした 3  $\times$  Gradient buffer (60 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 150 mM 6-aminohexanoic acid, 0.3 mM EDTA) を用いて、以下の表 2 のグリセロール溶液 (終濃度 0.10 % ジギトニン) を作製し、各濃度 800  $\mu$ l ずつ 5 ml 遠心チューブ積み上げた。その後、3 時間 4°C で静置し、密度勾配を作製した。(実験方法 2-2-9) で調製した粗ミトコンドリア膜画分 1 mg を、1.0 % ジギトニン溶液 (1.0 % ジギトニン, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 % (w/v) グリセロール, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF) 250  $\mu$ l で懸濁し、20 分間氷上に静置することで可溶性

した。20,630 × g, 4°C で 15 分間遠心し, 上澄み 200 μl を遠心チューブに加えた。最後に, 250,000 × g, 4°C で 15 時間遠心した。遠心後, 遠心チューブの上から先端を剃刀で切断したチップを使って 300 μl ずつ回収し, 1.5 % NaDOC を 14.4 μl 加えて懸濁した。その懸濁液に 20 % TCA を 300 μl を加えて懸濁した後, 15 分間氷上で静置した。静置したサンプルを 20,630 × g, 4°C で 5 分間遠心し, タンパク質を沈殿として回収した。この沈殿に冷アセトン 600 μl を加えて再度, 20,630 × g, 4°C で 10 分間で遠心し, 上澄みを除去した。アセトンを完全に飛ばした後に 40 μl の SDS サンプル buffer で懸濁した。この内 13 μl を SDS ゲルにロードした。

表.2 グリセロール溶液の組成

濃度	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %
3xGradient buffer	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
滅菌水	1 ml	1.25 ml	1.5 ml	1.75 ml	2 ml
60% グリセロール	1 ml	0.75 ml	0.5 ml	0.25 ml	0 ml
Total	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml

#### 2-2-16. フローサイトメトリー

酵母細胞を SCD 液体培地中で OD<sub>600</sub> = 1.0 程度まで 30°C で培養した。その酵母懸濁液 1 ml に終濃度 1 μg/ml PI (ヨウ化プロピジウム) (DOJINDO, P378) (滅菌水で溶解した 1mg/ml のストックを冷蔵保存)を加え, 15 分間室温遮光でインキュベートした。この細胞懸濁液を 100 μl 容量の Sorting Chip (SONY)を用いて Cell Sorter SH800S (SONY)に流した。Cell Sorter SH800S は Automatic setup beads for Cell Sorter SH800 を用いて励起波長を校正した。初めに, 励起波長 561 nm で PI 染色されない生細胞(蛍光強度が弱い)細胞群を選択し, その後, 励起波長 488 nm でソーティングした。

### 3. 結果と考察

#### 3-1. Split-GFP を用いたオルガネラ膜間近接検出系の開発

##### 3-1-1. 緒言

本研究のモデル生物である出芽酵母細胞をはじめとした真核細胞には、ミトコンドリア、小胞体や液胞、ペルオキシソームや脂肪滴などのオルガネラ膜構造が発達している。様々なオルガネラの機能を果たすためには、異なるオルガネラ間の物理的な結合が必須である。近年、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡などの科学技術の発展に伴って、異なるオルガネラ間を結ぶタンパク質の存在が相次いで報告されている。しかし、これまで任意のオルガネラ間の近接を可視化する実験系が存在しなかったため、オルガネラ間を結合する分子の実態は未解明な点が多い。さらに、これまでに報告されたオルガネラコンタクトサイトの結合領域が細胞状態に応じて変化するのか不明であった。そこで、本研究では、タンパク質間相互作用の検出に用いられてきた Split-GFP に着目し[11]、任意のオルガネラ間近接を評価する実験系の開発に取り組んだ。Split-GFP は緑色蛍光タンパク質 GFP の 11 本の  $\beta$  シートのうち、1~10 本目を Split-GFP1-10、11 本目を Split-GFP11 として分割したタンパク質である[11]。これらの Split-GFP 分子を異なるオルガネラ膜に局在する膜タンパク質との融合タンパク質として発現させた。これら Split-GFP はオルガネラ膜全体に発現しているが、コンタクトサイトが存在する膜間が近接している領域では Split-GFP 同士も接近し、GFP 分子を再構成すると期待される。この実験系が、異なるオルガネラ間のコンタクトの検出に有効であるのか検証するために、すでにコンタクトサイトを形成することが報告されているミトコンドリア外膜と小胞体膜に着目した。初めに、ミトコンドリア外膜と小胞体膜全体に Split-GFP をそれぞれ発現させ、その蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。さらに、ミトコンドリア、小胞体、液胞、脂肪滴、ペルオキシソームの全ての組み合わせにおいても Split-GFP をそれぞれ発現させ、コンタクトサイトが存在するのか検証した。加えて、既存の結合タンパク質を欠損させた細胞に Split-GFP を発現させ、既知の結合タンパク質がコンタクトサイトの形成に寄与しているのか検証した。

本研究で開発された Split-GFP を用いたオルガネラ間コンタクト可視化手法は、今後オルガネラ間コンタクトを推進する上で強力な実験ツールとなることを報告する。

##### 3-1-2. 結果

###### 3-1-2-1. ミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイトで Split-GFP 蛍光が検出される

オルガネラ膜間近接を可視化するために、これまでタンパク質間相互作用の検出に使用されている Split-GFP[11]の応用を試みた。本研究で使用した Split-GFP タンパク質を Fig.2B に示した。バレル型蛍光タンパク質 GFP の前半 10 本の  $\beta$  シート Split-GFP1-10 と、11 本目の  $\beta$  シート Split-GFP11 を異なるオルガネラ膜に局在する膜タンパク質に融合し、酵母細胞内で発現させた。Split-GFP は異なるオルガネラ膜全体に発現する一方で、膜が近接したオルガネラ間コンタクトサイトでは Split-GFP 同士も接近し、GFP が再構成され、GFP 蛍光シグナルを発すると期待される (Fig.2A)。

構築した Split-GFP によって膜間近接が評価できるか検証するために、ERMES 複合体によって直接結合することがよく知られている小胞体とミトコンドリア上に Split-GFP を発現させた。具体的には、Split-GFP 断片を小胞体膜タンパク質 Ifa38 とミトコンドリア外膜タンパク質 Tom71 の C 末端にそれぞれ融合し (Ifa38-GFP1-10, Tom71-GFP11), 出芽酵母細胞で発現させた。ERMES 複合体構成タンパク質 Mmm1 に蛍光タンパク質を結合させると、蛍光顕微鏡観察によって細胞内にドット状のパターンで検出される[12](Fig.2C)。ミトコンドリアと小胞体膜に発現させた Split-GFP と ERMES のシグナルパターンを比較したところ、Ifa38-GFP1-10+Tom71-GFP11 から生じる Split-GFP シグナルが、ERMES のドット状のパターンと類似したパターンを示した (Fig.2D)。ミトコンドリア内膜へ輸送されるプレ配列 Su9 に RFP を融合して可視化されたミトコンドリア上の特定の領域で、Split-GFP シグナルは検出された。これらの Split-GFP タンパク質が、小胞体膜全体に発現しているのか確認するために、Ifa38-GFP11 に mCherry タグを導入した Ifa38-mCherry-GFP11 と Tom71-GFP1-10 を共発現させ観察した。その結果、Ifa38-mCherry-GFP11 が ER 膜全体を染色した一方で、Split-GFP から生じる GFP シグナルは ER もしくはミトコンドリア上の一部分にドット状で観察された (Fig.2E)。以上の結果より、分断された GFP 断片の再構成が、ER-ミトコンドリア間の接触部位で生じていることが強く示唆された。

### 3-1-2-2. Split-GFP シグナルは既存のコンタクトサイトと共局在する

上述の結果から、小胞体 (Ifa38) とミトコンドリア (Tom71) に発現させた Split-GFP タンパク質によって、小胞体とミトコンドリア間の近接を可視化できることが強く示唆された。しかし、既存のオルガネラ間コンタクトサイトが存在する領域とは無関係に、Split-GFP 断片同士が集合し、GFP 分子が再構成される可能性を完全には排除できない。そこで Split-GFP のシグナルが、どの程度 ERMES のシグナルと共局在するのか検証した。ERMES 複合体は、その構成因子 Mdm34 と Mdm12 に RFP または mScarlet を融合することで可視化した。観察の結果、(Ifa38-GFP1-10+Tom71-GFP11) または (Ifa38-Flag-GFP11+Tom71-GFP1-10) から生じる GFP のシグナルのほぼ全てが、ERMES シグナルと共局在していた (Fig.3AB)。この結果より、Split-GFP の再構成が、ER-ミトコンドリア間の接触部位に依存していること、すなわち Split-GFP のシステムが、既存のオルガネラ間コンタクトの可視化に適した実験系であることがわかった。さらに、ERMES は小胞体とミトコンドリアの主要な接触部位であることも示唆された。しかしながら、その一方で、Split-GFP の発現によって、人工的なオルガネラコンタクトが促進している可能性も示唆された。具体的には、小胞体とミトコンドリアに Split-GFP を発現させると、*mdm12Δ* による増殖阻害を部分的に回復していた (Fig.3C)。これは、小胞体とミトコンドリアの間の人工的な結合タンパク質である ChiMERA を発現させた場合と同程度であった[12]。さらに、*mmm1Δ* では、Split-GFP の発現によって生育はわずかに回復するが、ChiMERA の発現では回復しなかった (Fig.3D)。Fig.3AB の結果より、Split-GFP の発現が既存のテザリングをわずかに安定化する可能性、もしくは人工的なオルガネラ間コンタクト形成促進している可能性が示唆された。

### 3-1-2-3. *mmm1Δ*株はミトコンドリアと小胞体に発現させた Split-GFP シグナルが検出される

出芽酵母細胞において、小胞体とミトコンドリア外膜が ERMES 複合体によってコンタクトしていることが知られている[12]。しかし、ERMES 複合体構成因子が欠損し、ERMES クラスター構造が形成できない細胞において、ミトコンドリアと小胞体間のコンタクトが消失するのかわは不明であった。そこで Split-GFP システムを用いて、ERMES 欠損による小胞体-ミトコンドリア間コンタクト形成への影響を検証した。ERMES 複合体サブユニットの一つである *mmm1Δ*細胞では、興味深いことに、野生株と同程度のドット上の Split-GFP シグナルが多く観察された。さらに、ボール状の Split-GFP シグナルもわずかに観察された(Fig.4AB)。この結果は、ミトコンドリアの輪郭に沿って Split-GFP が再構成していると考えられる。しかし、Split-GFP を発現していない細胞で、ミトコンドリアと小胞体をそれぞれ Mitotracker と GFP で染色し観察した場合、小胞体が球状のミトコンドリアを囲う細胞は観察されなかった(Fig.4C)ことから、Split-GFP の発現によって *mmm1Δ*細胞のミトコンドリア-小胞体間の結合が促進された可能性が示唆された。以上の結果より、ERMES 複合体はミトコンドリア-小胞体間のコンタクトの形成に必須な因子ではなく、ERMES 複合体以外にもこれらオルガネラ間を結合する因子が存在することが示唆された。実際、Fig.4C に示すように、*mmm1Δ*細胞でもミトコンドリアと小胞体が接触している様子が観察されていることも、この可能性を支持している。

### 3-1-2-4. Split-GFP 実験系による任意のオルガネラ膜近接検出

出芽酵母細胞において、小胞体-ミトコンドリア、ミトコンドリア-液胞、液胞-小胞体間などいくつかのオルガネラ間がタンパク質複合体を介して結合していることが報告されている[12-15]。しかし、これらオルガネラ間の他にも脂肪滴やペルオキシソームがコンタクトサイトを形成するのかわは、ほとんどわかっていない。そこで、本研究では、Split-GFP の実験系を用いて、任意のオルガネラ同士の組み合わせで、近接が検出できるのか検証した。Split-GFP 断片を Fig.2B で示したように融合タンパク質として発現させ、小胞体、ミトコンドリア、液胞、ペルオキシソーム、脂肪滴のすべてのオルガネラペアの組み合わせを蛍光顕微鏡で観察した(Fig.5)。

液胞(Vph1)とその他のオルガネラの組み合わせで発現させた Split-GFP のシグナルは、ドット上のパターンだけではなく、液胞内腔全体に拡散したシグナルで検出された(Fig.5BDIJ)。これらの拡散した Split-GFP シグナルは、融合タンパク質が液胞内に取り込まれたものであると考えられる。実際に、Split-GFP タンパク質をウェスタンブロットティングにより検出したところ、液胞-ミトコンドリア、液胞-小胞体、液胞-ペルオキシソームの組み合わせでは、分解物と考えられるバンドが検出された(Fig.6)。液胞(Vph1)と小胞体(Ifa38)の Split-GFP シグナルは、核膜周辺に局在する短いチューブ状の形態で観察された(Fig.5D)。このシグナルパターンは、液胞と小胞体膜を結合する NVJ 複合体のシグナルパターンと非常に似ている[15]。また、別の液胞膜局在タンパク質 Dpp1 を用いた組み合わせでは、NVJ に似たシグナルだけではなく、細胞膜周辺の小胞体にドット状のシグナルが観察された(Fig.5K)。これは Vph1 に比べ、Dpp1 を融合した Split-GFP の発現量が顕著に多かったことで、Vph1 では検出できなかったコンタクトが観察できたと考えられる(Fig.6)。

また、出芽酵母細胞において液胞とペルオキシソーム間のコンタクトは報告されていないが、Split-GFP を用いた本実験系によって GFP シグナルが検出された (Fig.5J)。この結果から、液胞-ペルオキシソーム間には、結合因子が存在する可能性が示唆された。

### 3-1-3.考察

オルガネラ間コンタクトサイトは、異なるオルガネラが協調して機能するために重要な構造である。これまでのオルガネラ間コンタクトサイト研究では分解能の低い蛍光顕微鏡を用いた解析が主であった。また PLA (Proximity ligation assay) や、分解能の高い電子顕微鏡解析はオルガネラ間コンタクトを観察する手法として有効ではあるが、固定化された細胞を用いなければならないため、生きた細胞を用いてその動態を解析することは困難であった。FRET (Fluorescence resonance energy transfer) によってタンパク質間の近接を可視化する方法も存在するが[16]、オルガネラ間コンタクトを検出するには感度が低いと言う問題点があった。そこで本研究では、オルガネラ間近接を可視化するために Split-GFP システムを利用し、生細胞における有用性を評価した。Split-GFP はオルガネラ膜全体に発現しているにも関わらず、そのシグナルはドットや短いチューブのパターンを示した (Fig.2DE)。また、ミトコンドリアと小胞体に発現させた Split-GFP シグナルは、それぞれのオルガネラ上にドット状のパターンで存在し、ほとんどのシグナルが ERMES 複合体と共局在していた (Fig.3AB)。これは、既存のコンタクトサイトが存在する領域で Split-GFP が接近していることを示唆している。さらに、小胞体 (Ifa38) と液胞 (Vph1) に発現させた Split-GFP シグナルは、核付近の小胞体領域に局在しており、既存のコンタクトサイトである NVJ の局在パターンが非常に似ている (Fig.5D)。以上の結果より、異なるオルガネラ間に Split-GFP を発現させても、オルガネラ間に新たな結合の形成を強く促進しない可能性が示唆された。

しかし、Split-GFP がオルガネラ間に人工的な結合を形成している可能性も否定できない。例えば、Split-GFP のシグナルサイズは、ERMES 複合体のシグナルサイズよりも大きい様子が観察された (Fig.3AB)。また、小胞体とミトコンドリアに発現させた Split-GFP によって、*mdm1 $\Delta$*  や *mmm1 $\Delta$*  細胞の生育阻害を若干回復させたことから、Split-GFP が人工的なオルガネラ間結合を仲介する可能性が考えられる (Fig.3CD)。さらに、ミトコンドリア-ペルオキシソーム、ミトコンドリア-脂肪滴の組み合わせで Split-GFP を発現させると、部分的にミトコンドリアの形態が異常になっている細胞が確認された (Fig.5CG)。これは、Split-GFP の発現によってオルガネラ間接触が誘導され、オルガネラ形態や機能に影響を与えている可能性が示唆された。

興味深いことに、ERMES 複合体サブユニットを欠損した細胞でも、ミトコンドリアと小胞体間の近接が検出された (Fig.4A)。これは、ERMES 複合体以外にミトコンドリアと小胞体の結合を担う因子が存在する可能性や、ERMES 欠損を補うために未知因子の発現が上昇している可能性が考えられる。今後、Split-GFP を応用することで、未知のオルガネラ間結合因子の同定につながることを期待される。実際に所属研究室では Split-GFP に分割したビオチン化酵素 TurboID をタンデムに結合した Split-GFP-TurboID タンパク質を開発している。MCS 周辺のタンパク質をビオチン化する



ことで、生化学的に MCS に集積するタンパク質を精製することで、オルガネラ間結合タンパク質の全容が解明されると期待される。

Vph1 より発現量が多い Dpp1 を液胞マーカーに用いると、Split-GFP のシグナルは細胞膜近傍の小胞体上に局在していた (Fig.5K, Fig.6)。少量の Split-GFP が NVJ 領域を標識したことから、NVJ が小胞体と液胞が相互作用する主要な部位であることが示唆された。しかしその一方で、これまでに全く注目されていない小胞体-液胞間コンタクトサイトの存在が示された事は興味深い。今後 NVJ 以外の小胞体-液胞間結合因子の探索により新しい MCS の機能が解明されると期待される。

開発された Split-GFP システムを応用して、小胞体、ミトコンドリア、液胞、ペルオキシソーム、脂肪滴間の全ての組み合わせでオルガネラ間近接を検出した (Fig.5)。この結果は、これらオルガネラ間に ERMES や NVJ のようなオルガネラ間結合タンパク質が存在している可能性を示唆している。今後、Split-GFP の発現によって人工的なオルガネラ結合が形成されている可能性を考慮しつつ、これらオルガネラ間結合因子の分子実態が明らかになれば、これまでの常識を覆す真のオルガネラ像が明らかになると期待される。

## 3-2. ERMES 複合体の解離は小胞体ストレスの緩和に重要である

### 3-2-1. 緒言

近年、真核生物に発達した多様な機能を持つオルガネラ同士が、タンパク質複合体を介して結合することが明らかになってきた。特に、出芽酵母細胞において、ミトコンドリア外膜と小胞体膜をつなぐ ERMES (ER-Mitochondria Encounter Structure) 複合体は小胞体膜に局在する Mmm1, ミトコンドリア外膜に存在する Mdm10, Mdm12, これらをつなぐ Mdm34 (Mmm2) の 4 つのコアタンパク質から構成されている[12]。ERMES 複合体は、ミトコンドリアと小胞体間のリン脂質輸送、ミトコンドリア分裂制御、オートファゴソーム形成など、細胞の機能維持に重要な機関であることが報告されている[7,18]。また ERMES 複合体の結合領域を制御する因子として Lam6 や Gem1 報告されている[19,20]。Lam6 は ERMES 以外のオルガネラ間コンタクトサイトの相互作用も調節することが報告されている[18]。また Gem1 は1細胞あたりの ERMES (小胞体-ミトコンドリア間コンタクトサイト) の数を調節すると考えられている[19]。これらの因子の存在は、オルガネラ間コンタクトサイトの制御が、細胞機能にとって重要であることを示唆している。哺乳類細胞においては、小胞体ストレス時にミトコンドリア外膜と小胞体膜の結合領域の大きさが増加することも報告されている[20]。ただし、哺乳類細胞においては出芽酵母における ERMES のような明確なミトコンドリア-小胞体間結合因子は不明であり、コンタクト領域の制御の解析は困難である。そこで、本研究では、ミトコンドリアと小胞体間コンタクトサイトの分子実態が明らかになっている出芽酵母細胞を用いて、小胞体ストレス時の ERMES 複合体の動的な変化を検証した。最終的には、小胞体ストレス時のミトコンドリアと小胞体間コンタクトサイトの機能の解明を目指した。

初めに、小胞体ストレス時に ERMES 複合体が変化するか検証した。ERMES 複合体構成因子 Mmm1 に GFP 分子を誘導し、細胞にツニカマイシン(以下、“Tm”と表記)やジチオトレイトール(以下、“DTT”と表記)を処理して小胞体ストレスを誘導した。細胞を観察した結果、Mmm1-GFP は細胞内でミトコンドリア上にドット状のパターン(以下、“ERMES ドット”と表記)で局在していた。さらに小胞体ストレスを誘導した細胞では、1細胞あたりの ERMES ドット数が倍増していた。超解像蛍光顕微鏡 SCLIM 解析によって、小胞体ストレス時に ERMES ドットが、複数回解離する様子を観察されたことから、小胞体ストレス時に ERMES クラスター構造が解離し、ERMES ドット数が増加していることが示唆された。

続いて、小胞体ストレス時に ERMES ドットが増加する生理的意義を検討した。小胞体ストレス時に ERMES ドット数が増加しない変異株 *mmm1-1* では、Tm に強い感受性を示し、小胞体ストレスの緩和に重要な小胞体伸長が抑制されていた。つまり、小胞体ストレス時の ERMES ドット数の増加は、小胞体ストレスの緩和に寄与していることが示唆された。さらに小胞体ストレス誘導時には、PS が蓄積し、ミトコンドリアから小胞体への PE の輸送が遅延していることを明らかにした。すなわち、ERMES 複合体がクラスター構造を解離することによって、リン脂質輸送を負に制御することにより小胞体膜の拡大が起こる可能性を示した。

さらに、本研究では Split-GFP を用いたオルガネラ膜間近接検出系を利用し、様々な細胞ストレス時のオルガネラコンタクトの挙動を検証した。これまでに、既存のオルガネラ間結合タンパク質に

蛍光タンパク質を融合してコンタクトサイトを可視化した細胞に、細胞ストレスを誘導すると結合領域が変化することが報告されている[20]。しかし、結合因子が同定されていないオルガネラ間において、細胞ストレス時のコンタクトサイトの挙動を網羅的に解析することは困難であった。そこで、本研究では、独自に開発した Split-GFP 実験系[2,5]を用いて、【ミトコンドリア-小胞体】、【ミトコンドリア-液胞】そして【小胞体-液胞】間のコンタクトサイトを可視化し、細胞ストレス誘導時に Split-GFP の蛍光パターンが変化するか検証した。その結果、飢餓、酸化、浸透圧、高温ストレスや細胞老化によってコンタクトサイトの結合領域が変化することを明らかにした。コンタクトサイトの動的な結合領域の変化が、細胞ストレス時のオルガネラの機能維持に重要である可能性を示唆している。

### 3-2-2. 結果

#### 3-2-2-1. 小胞体ストレス時に UPR 応答経路非依存的に ERMES ドット数が増加する

哺乳類細胞において小胞体ストレスを Tm 処理によって誘導すると、ミトコンドリアと小胞体間の結合領域が増加することが報告されている[20–22]。一方で、小胞体ストレスを誘導してもこれら結合領域が劇的には増加しないことも報告されており[23]、小胞体ストレス時にミトコンドリアと小胞体間の結合領域が変化するか明確なことはわかっていない。しかし、哺乳類細胞において、これらオルガネラ間コンタクトサイトを形成するタンパク質の分子実態は明らかにされておらず、検証は困難である。そこで本研究では、ミトコンドリア外膜と小胞体膜を物理的に結合するタンパク質複合体 (ERMES 複合体) が明確な出芽酵母細胞を用いて、小胞体ストレス時に ERMES 複合体の挙動が変化するか検証した。ERMES 複合体を可視化するために Mmm1-GFP を発現した細胞に、Tm もしくは DTT を加えた SCD 培地 (10 ml DMSO に 10 mg Tm を溶解し、1,000×ストックとして冷凍保存したものを終濃度 1 µg/ml となるように添加、もしくは濃度 1 M となるように滅菌水で溶解し、50 µl ずつ分注し、333×ストックとして冷凍保存したものを終濃度 3 mM となるように添加) で 2 時間 30°C で培養し、小胞体ストレスを誘導した。この細胞を、蛍光顕微鏡で観察したところ、1細胞あたりの Mmm1-GFP シグナル数が通常平均 5~6 個程度である一方、小胞体ストレス誘導時には Mmm1-GFP のドット数が倍増していた (Fig.7AB)。同様に、ERMES 複合体構成タンパク質である Mdm12 や Mdm34 (Mmm2) に GFP を融合した酵母株においても、小胞体ストレス誘導時には Mdm12-GFP や Mdm34-GFP のドット数が倍増していた (Fig.7EF)。これらの結果から、小胞体ストレス時には ERMES ドット数が増加していることが示唆された。

続いて、小胞体ストレス時の ERMES ドット数の増加が UPR 応答経路[24]に依存するか検証した。UPR 応答に関与する Ire1 や Hac1、リン脂質合成酵素の転写因子である Ino2 や Ino4 を欠損した細胞に Mmm1-GFP を発現させ、ER stress 条件下で ERMES ドット数が増加するか蛍光顕微鏡で観察した (Fig.7A-D)。その結果、*ire1Δ*、*hac1Δ*、*ino2Δ*、*ino4Δ*は、野生株と同程度まで ERMES ドット数が増加しており、ERMES ドット数の増加が Ire1 や Hac1 が担う UPR 経路や Ino2 や Ino4 に非依存的な現象であることが示された。

さらに小胞体ストレス時の ERMES ドット数の増加は、小胞体ストレス誘導剤を除去した場合に回復するか検証した。Mmm1-GFP を発現する細胞に DTT 処理を 2 時間行い、その後 DTT が含

まれない液体培地で培養して ERMES ドット数の変化を 1 時間ごとに蛍光顕微鏡で観察した。定量の結果, DTT を除去して 3 時間程度で ERMES ドット数が無処理の細胞と同程度まで減少した (Fig.7GH)。この結果は, 小胞体ストレス時の ERMES ドット数の増加が可逆的な現象であることを示している。

### 3-2-2-2. 小胞体ストレス時に ERMES 複合体クラスター構造が解離する

小胞体ストレス時に ERMES ドット数が増加したことから, ERMES 複合体構成タンパク質の発現量が増加している可能性が予想された。そこで, 野生株と Mmm1-GFP を発現する酵母株に Tm 処理をした細胞の粗ミトコンドリア膜画分を調製し, ERMES 複合体構成タンパク質 Mmm1, Mdm12 や小胞体ストレス時に発現量が増加することが報告されている Kar2 や Pdi1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果, Kar2 や Pdi1 は Tm 処理によって発現量が増加していた一方で, Mmm1-GFP や Mdm12 の発現量は増加していなかった (Fig.8A)。つまり, 小胞体ストレス誘導時の ERMES ドット数の増加は, ERMES 複合体の発現量の増加によるものではないことが示された。

小胞体ストレス時に ERMES 複合体の発現量が増加していなかったことから, 既存の ERMES 複合体のクラスター構造が解離している可能性が考えられた。この仮説を検証するため, 一つの ERMES ドットに含まれる Mmm1-GFP 分子数を定量した。具体的には, キネトコアタンパク質である Cse4 に GFP を融合し発現した細胞 (Cse4-GFP 株) に, BipN-mCherry (小胞体マーカー) をプラスミドで導入した細胞を作製した [26,27]。同時に Mmm1-GFP を発現する細胞 (Mmm1-GFP) に Su9-RFP (ミトコンドリアマーカー) を導入し, Cse4-GFP 株と Mmm1-GFP 株を混合して蛍光顕微鏡で観察した。Cse4-GFP の一ドットには約 80 分子含まれることが報告されているため [26], この Cse4-GFP ドットの蛍光強度を指標に ERMES ドットに含まれる Mmm1-GFP の分子数を定量した。その結果, 無処理の細胞では ERMES ドット 1 つ当たり 100~250 分子数の GFP シグナルが含まれる一方で, Tm 処理をした酵母株では, ERMES ドット 1 つ当たりの GFP 数が 100 分子程度に減少していた (Fig.8BC)。この結果は小胞体ストレス誘導時に, GFP シグナルの分子数が減少したことを示しており, 小胞体ストレス時に ERMES クラスターが解離している可能性が示唆された。

さらにこの仮説を検証するため, 超解像蛍光顕微鏡 SCLIM [8,9] を用いて, 小胞体ストレス誘導時の Mmm1-GFP をライブセルイメージングで観察した。Mmm1-GFP を発現し, Isd11-mCherry (ミトコンドリアマーカー) を導入した細胞に Tm 処理を 60 分間行い, 小胞体ストレスを誘導した。この細胞を Z 軸方向に 0.2  $\mu\text{m}$  間隔で約 70 枚の画像を 10 秒間隔で撮影することで, Mmm1-GFP ドットの三次元の蛍光画像を取得した。観察の結果, Tm を処理して 60 分後の細胞の GFP シグナルは, 複数回分裂と融合を繰り返す様子が観察された (Fig.8D)。この結果から, 小胞体ストレス時に ERMES ドット数が増加する要因は, ERMES クラスター構造が複数回分裂するためであると考えられた。

### 3-2-2-3. 小胞体ストレス時の ERMES クラスター構造解離のメカニズムの検討

続いて、小胞体ストレス時に ERMES クラスター構造が解離するメカニズムの解明を目指した。ERMES 複合体構成タンパク質 Mdm34 (Mmm2) は、C 末の PY モチーフに E3 リガーゼ Rsp5 が結合することで、ユビキチン化されることが報告されている[27]。そこで、Mdm34 のユビキチン化が ERMES クラスター構造の解離に関与しているのか検証するために、PY モチーフを変異させた Mdm34-3PA (PPPY→AAAY) 株を作製し、小胞体ストレス時の ERMES ドット数の変化をモニターした。その結果、Mdm34-GFP 株と同様に、Mdm34-3PA-GFP 株でも ERMES ドット数が増加している様子が観察された (Fig.9A) さらに、1細胞あたりの GFP ドットに含まれる分子数を定量した結果、野生株では Fig.8C と同様に小胞体ストレス時に分子数が少なくなっていた。Mdm34-3PA-GFP 株では小胞体ストレス時に分子数は変化していなかった (Fig.9B)。これらの結果から、Mdm34 のユビキチン化は小胞体ストレス時の ERMES ドット数の増加に関与しないことが示唆された。

さらに、スフィンゴ脂質合成不全が小胞体ストレス時の ERMES クラスター構造の解離に関与しているのか検証した。スフィンゴ脂質生合成に関与するセリンパルミトイル化転移酵素を阻害するミリオシン (Myr) と IPC 生合成を阻害するオーレオバシジン A (Aba) を処理して ERMES ドット数をモニターした。Mmm1-GFP を発現する細胞に Aba (50 ng/ml) を 2 時間処理した後、蛍光顕微鏡で観察した結果、Aba 処理した細胞の ERMES ドットは無処理と比較して変化していなかった。さらに Tm と Aba 処理をした細胞でも、Tm 処理をした細胞と同様に ERMES ドット数が増加していた (Fig.9C)。この結果から、オーレオバシジン A 処理によるスフィンゴ脂質の合成阻害は、ERMES ドット数の増加に関与しないことが示唆された。

Mmm1-GFP を発現する細胞に Myr (0.25~0.5 µg/ml) を 5 時間処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Tm 処理細胞と同程度まで ERMES ドット数が増加していた (Fig.9CD)。この結果から、ミリオシン処理によって小胞体ストレスが誘導され、ERMES ドット数が増加している可能性が考えられた。そこで、小胞体ストレス時に発現量が増加することが報告されている Kar2 や Pdi1 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、小胞体ストレスが誘導されているのか検証した。その結果、ミリオシン処理細胞では、Tm 処理細胞と同程度まで Kar2 や Pdi1 の発現量が増加していた (Fig.9E)。Fig.9E の結果より、ミリオシン処理による ERMES ドット数の増加は、小胞体ストレスが誘導されたためであると考えられる。

さらに、ERMES 複合体の数を制御することが報告されている Gem1 や Mco6 が、ERMES 複合体クラスター構造の解離に関与しているのか検証した。gem1Δ や mco6Δ に Mmm1-GFP を導入し、Tm や DTT 処理によって小胞体ストレスを誘導して、蛍光顕微鏡で観察した。gem1Δ の無処理の細胞では、先行研究の報告通り、1細胞あたりの ERMES ドット数が減少していた (Fig.10AB)。さらに小胞体ストレス時にも野生株と比較して、ERMES ドット数の増加が抑制されていた (Fig.10AB)。しかし、mco6Δ では無処理の条件下でも、ERMES ドット数は野生株と比較して変化しておらず、小胞体ストレス時にも野生株と同程度まで増加していた (Fig.10AB)。この結果より、小胞体ストレス時の ERMES クラスターの解離に Gem1 が関与している可能性が示唆された。

ERMES 複合体が Ire1 や Hac1 に依存せず、どのように小胞体ストレスを感知し、クラスター構造が解離しているのか疑問に思った。2011 年に Kornmann らの研究グループによって、Mmm1 がシャペロンタンパク質 Kar2 と相互作用していることが報告された[19]。この報告より、異常タンパク質に結合する Kar2 が、小胞体ストレス時に Mmm1 と結合を解消することで、ERMES が小胞体ストレスを感知すると仮説を立てた。Kar2 は小胞体内腔に局在するため、Mmm1 の内腔ドメインが ERMES クラスター構造の解離に影響を与えるのか検証した。そこで、Mmm1 内腔ドメインを 15~30 残基ずつ欠損した Mmm1-GFP プラスミドを 11 種類作製し、Mmm1 欠損株に発現させた (Fig.11A)。作製した酵母株を観察した結果 (Fig.11B), Mmm1 の 84-99 残基を欠損した No.0, No.6, No.11 酵母株は、ERMES ドットが検出されなかった。ERMES ドットが検出されなかったことから、ERMES の発現量が減少していることが予想された。そこで、ERMES の発現量をウエスタンブロッティングで調べたところ (Fig.11C), Mmm1 の発現量は、欠損領域が膜貫通ドメインに近いほど減少する傾向が見られ、Mmm1(65-83), (84-99) 領域が欠損した株では、Mmm1 が分解されたようなバンドが検出された。さらに ERMES クラスターが形成不全は、生育阻害を引き起こすのか検証するためリアルタイムスクリーニングを行なった。その結果 (Fig.11D), No.0 と No.6 酵母株は、野生株や他の欠損株と比較して生育阻害を示した。Mmm1 の 84~99 残基が ERMES 複合体クラスタリングに必須であることが示唆された。

#### 3-2-2-4. 小胞体ストレス時の小胞体の伸長に ERMES ドット数の増加が必要である

小胞体ストレス時の ERMES クラスターの解離する生理的意義を検討した。小胞体ストレス状態において、小胞体内のタンパク質のフォールディング能力を増加させるため、リン脂質合成量を増加させることで小胞体体積が拡大することが知られている[28]。この小胞体体積の拡大に ERMES 複合体のクラスター解離が影響を与えるのか検証した。ERMES 複合体構成因子 Mmm1 の温度感受性株である *mmm1-1* [29] は、リン脂質 PS が結合する SMP ドメインの D252 がセリンに変異している。*mmm1-1* はミトコンドリアの形態異常を引き起こす遺伝子のスクリーニングで単離された [3]。33°C で培養すると、細胞致死となり、30°C では生育阻害がみられミトコンドリアの形態がボール状となる。23°C で培養するとミトコンドリアは野生型と同じチューブ状の形態となり、生育阻害も見られない [29]。*mmm1-1* に Mdm12-GFP を発現させた酵母株を 30°C で培養し蛍光顕微鏡観察すると、Mdm12-GFP シグナルは検出されなかったことから、Mmm1 の変異による生育阻害が ERMES 複合体の局在やクラスタリングに影響を与えることがわかった (Fig.12AB)。一方、23°C で培養すると Mdm12-GFP のドット状のシグナルを検出することができたことから、23°C では、ERMES のクラスター構造が安定していることがわかった。興味深いことに、23°C で小胞体ストレスを誘導すると、野生株と比較して Mdm12-GFP ドット数の増加が抑制されていた (Fig.12AB)。この結果は、*mmm1-1* 変異によって、小胞体ストレスに依存した ERMES ドット数の増加が抑制されることを示している。そこでこの変異株を用いて、ERMES クラスターが解離する生理的意義を検証した。野生株に Sec63-GFP (小胞体マーカー) を導入した株に小胞体ストレスを誘導し、蛍光顕微鏡観察を行った結果、野生株では小胞体がサイトゾルの領域にチューブ状、網目構造状伸長してい

の様子を観察された。一方, *mmm1-1* 株では, 小胞体ストレス時の小胞体のチューブ状, 網目構造状伸長している細胞数が優位に減少していた (Fig.12CD)。この結果より, 小胞体ストレスの緩和に Mmm1 が関与している可能性が示唆された。そこで *mmm1-1* が Tm への感受性が高くなるかを検討した。YPD 寒天培地と YPD+Tm (1 µg/ml) 寒天培地に, 野生株と *mmm1-1* 株をスポットし, 6 日間 23°C で培養した結果, *mmm1-1* 株は野生型に比べ Tm へ強い感受性を示した (Fig.12E)。さらに, YPD 液体培地と YPD+Tm (1 µg/ml) 液体培地において細胞増殖をモニターした結果, 寒天培地の結果と同様に, *mmm1-1* は Tm 存在下では増殖が大きく遅延していた (Fig.12F)。

さらに, 小胞体ストレス時に ERMES ドット数の増加が抑制された *gem1Δ* において, Tm への感受性が変化するのか検証した。YPD 寒天培地と YPD+Tm (1~1.5 µg/ml) 寒天培地に野生株と *gem1Δ* をスポットし, 6 日間 23~37°C で培養した結果, Tm 感受性は *gem1Δ* は野生株と同程度であった (Fig.13A)。さらに, YPD 液体培地と YPD+Tm (1~1.5 µg/ml) 液体培地において細胞増殖をモニターした (Fig.13B)。Tm (1 µg/ml) 条件では, *gem1Δ* は野生株と同程度の Tm 感受性を示したが, Tm (1.5 µg/ml) 条件では, *gem1Δ* は野生株よりも弱い Tm 感受性を示した。これらの結果は, *gem1Δ* によって ERMES 複合体が担うリン脂質輸送能が低下することを示唆するのかもしれない。実際に, *gem1Δ* の小胞体ストレス時の小胞体の拡大の様子を観察した結果, *gem1Δ* は無処理の条件下でも野生型に比べ伸長した小胞体を含む細胞の割合が多かった (Fig.13CD)。この結果は, *gem1Δ* では ERMES のクラスター状態に関わらず, 通常条件においても ERMES によるリン脂質輸送能が低下し, 小胞体が伸長することを示唆する。

### 3-2-2-5. ERMES 複合体クラスターの解離は, リン脂質輸送活性を阻害する

小胞体膜の伸長に ERMES 複合体が関与していることから, ERMES 複合体の小胞体からミトコンドリアへのリン脂質輸送機能が小胞体ストレスの緩和に関与していると仮説を立てた。この仮説を検証するために, <sup>32</sup>Pi を用いてラベルしたリン脂質を抽出し, TLC で展開することで, 小胞体ストレス時にリン脂質組成が変化するか検証した。興味深いことに, 小胞体ストレス時には, 他のリン脂質の組成が変化しなかったのにも関わらず, 全体のリン脂質量に対する PS の割合が減少していた (Fig.14AB)。一方で, ERMES ドット数が増加しない *mmm1-1* 株では, PS の割合は小胞体ストレス誘導の有無で変化していなかった (Fig.14CD)。Fig.14A-D の結果から二つの可能性が示唆された。一つ目は, 小胞体ストレス時に PS が減少することによって ERMES 複合体クラスター構造が解離する可能性と, もう一つは, ERMES 複合体クラスター構造の解離が PS の代謝を促進, すなわち PS の PE, PC への変換が亢進している可能性である。一つ目の仮説を検証するために, PS 合成酵素 *Cho1* シャットオフ株において ERMES ドット数の挙動が変化するのか観察した。遺伝子 *Cho1* のプロモーター領域を GAL プロモーターに変換した酵母株に Mmm1-GFP 導入し, グルコース存在化で 24 時間培養した後, 蛍光顕微鏡で観察した。その結果, 野生株と比較して *Cho1* の発現が抑制された株 (Mmm1-GFP/*Cho1* ↓) では ERMES ドットの数に変化は見られなかった (Fig.14EF)。この結果から, PS の減少が ERMES 複合体クラスターの解離を引き起こすわけではないことがわかった。次に, 小胞体ストレス時の ERMES 複合体のリン脂質輸送活性を比較するた

めに,  $^{14}\text{C}$ -serine を用いたパルスチェイス実験を行った。具体的には, ER で合成された PS を前駆体として, ミトコンドリア膜でのみ PE を合成する *psd2Δdpl1Δ* 株 (Psd2 はゴルジ体に局在する PE 合成酵素であり, Dpl1 は PE の前駆体リン脂質合成酵素である[4]) を一時的に  $^{14}\text{C}$ -serine で処理をすることによって PS をパルスラベルし, その後の PS の運命 (PE, PC への変換) をチェイスした。その結果, 放射性物質  $^{32}\text{P}$ i ラベルによって得られたリン脂質組成の結果 (Fig.14AB) と同様に, Tm や DTT 処理によって PS 合成量が減少していた。また, 小胞体ストレス時には全体のリン脂質量に対する PC 量も減少しており, ミトコンドリアから小胞体への PE 輸送が遅延していることが示唆された (Fig.15)。

ERMES クラスターの解離によってミトコンドリア膜から小胞体膜への PE 輸送が遅延している可能性をさらに検証するため, ミトコンドリア誘導因子である Fzo1 に着目した。Fzo1 欠損株では ERMES クラスター構造が小さくなることから[30], *fzo1Δpsd2Δdpl1Δ* 株に  $^{14}\text{C}$ -serine を短時間添加して PS を放射線ラベルし, リン脂質輸送活性をモニターした。コントロールとしてミトコンドリア DNA を保持しない *psd2Δdpl1Δrho<sup>0</sup>* 株を用いた。実験の結果, 小胞体ストレスを誘導した結果 (Fig.15) と同様に *fzo1Δpsd2Δdpl1Δ* 株は PS の減少が *psd2Δdpl1Δrho<sup>0</sup>* 株と比較して遅いことから, PS 輸送が遅延することを見出した。さらに *fzo1Δpsd2Δdpl1Δ* 株は, PC の増加が遅延していたが, PE の増加速度は *psd2Δdpl1Δrho<sup>0</sup>* 株と同程度であった (Fig.16AB)。すなわち, ミトコンドリアから小胞体への PE の輸送 (PC/PE) が *fzo1Δ* によって遅くなっていた。この結果から, ERMES 複合体クラスターの解離が小胞体からミトコンドリアへのリン脂質輸送の遅延を引き起こしていることが強く示唆された。すなわち, Fig.12 と Fig.15 より, 小胞体ストレス時の ERMES クラスターの解離によって小胞体からミトコンドリアへのリン脂質輸送が阻害されることにより, 小胞体に脂質が蓄積し, 小胞体が拡大しているのかもしれない。

### 3-2-2-6. Split-GFP 実験系を用いた細胞ストレス応答モニター

上述の結果から, 小胞体ストレスに応答して, ERMES 複合体クラスター構造が変化することで, 小胞体ストレスの緩和に寄与していることが明らかになった。また, 核膜と液胞膜を結合する NVJ 領域が飢餓に応答して, その結合領域を増加させることが報告されており, オルガネラ膜コンタクトサイトが細胞状態に応じて結合領域を変化させることで, 細胞の恒常性の維持に寄与している可能性が示唆されている。そこで, 任意のオルガネラ間近接を可視化できる Split-GFP 実験系<sup>[2, 5]</sup>を用いて, 細胞ストレス時に Split-GFP 蛍光パターンが変化するか検証した。Split-GFP をミトコンドリア外膜 (Tom71)-小胞体膜 (Ifa38), ミトコンドリア外膜 (Tom71)-液胞膜 (Dpp1), 小胞体膜 (Ifa38)-液胞膜 (Dpp1) の組み合わせで酵母ゲノムから発現する出芽酵母株を用いた (Fig.17)。

初めに, NVJ 領域が拡大することが既に報告されている飢餓ストレスに着目した。Split-GFP を酵母ゲノムから発現する酵母株を対数増殖期まで  $30^{\circ}\text{C}$  で培養した後, 窒素や炭素を除いた液体培地で 9 時間培養し, 蛍光顕微鏡で観察した。さらに, 飢餓状態の細胞をセルソーターに流し, Split-GFP の蛍光強度を測定した。その結果, ミトコンドリア外膜 (Tom71) と小胞体膜 (Ifa38) に発



現させた Split-GFP のシグナルパターンは通常状態と比較して、窒素や炭素飢餓状態では変化がなかったが (Fig.18A), 窒素飢餓状態の細胞群の Split-GFP の蛍光強度が増加した (Fig.18B)。

ミトコンドリア外膜 (Tom71) と液胞膜 (Dpp1) の組み合わせでは、窒素や炭素飢餓状態では、ミトコンドリア上に局在する Split-GFP のドット状シグナルの数が増加し (Fig.18C), GFP の蛍光強度も飢餓状態で増加した (Fig.18D)。

また、小胞体膜 (Ifa38) と液胞膜 (Dpp1) の組み合わせでは、窒素や炭素飢餓状態において核膜側に局在するパッチ状の Split-GFP シグナル領域が拡大し (Fig.18E), GFP の蛍光強度も増加した (Fig.18F)。以上のように、Split-GFP を用いることで任意のオルガネラコンタクトサイトの環境に応じた動的な変化を検出することができたことから、Split-GFP 実験系は細胞ストレス状態におけるオルガネラ膜コンタクトサイトの観察に有用な系であることが示唆された。またこれらの結果から、栄養飢餓ストレスに応答して、ミトコンドリア-液胞間コンタクトサイトや小胞体-液胞間のコンタクトが変化すること、すなわち、これらのオルガネラ間コンタクトサイトが、飢餓ストレスに対して何らかの役割を持つことが示唆された。

次にオルガネラ間コンタクトが酸化ストレス時に変化するかを調べるために、Split-GFP 発現酵母細胞を対数増殖期まで培養した細胞懸濁液に  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) を加えて 2~4 時間培養後、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、小胞体膜 (Ifa38) と液胞膜 (Dpp1) の組み合わせでは、 $\text{H}_2\text{O}_2$  存在化において Split-GFP のシグナル領域が増加し (Fig.19A), GFP の蛍光強度も増加した (Fig.19B)。また、ミトコンドリア外膜 (Tom71) と液胞膜 (Dpp1) の組み合わせでは、 $\text{H}_2\text{O}_2$  存在化において Split-GFP のドット状のシグナル数が増加し (Fig.19C), GFP の蛍光強度も増加した (Fig.19D)。これらの結果から、小胞体-液胞間やミトコンドリア-液胞間コンタクトサイトが酸化ストレスに対して何らかの役割を持つことが示唆された。

続いて、浸透圧ストレスを検証した。Split-GFP を発現する酵母株の懸濁液に終濃度 0.5 M~1.5M となるようにソルビトール添加した後、30°C で 0.5~1 時間培養し蛍光顕微鏡で観察した。ミトコンドリア外膜 (Tom71) と小胞体膜 (Ifa38) の組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株に、0.5 M ソルビトールを添加して浸透圧ストレスを誘導した結果、無処理の細胞と比較して Split-GFP シグナルや蛍光強度に大きな変化は検出されなかった (Fig.20A)。一方、1.5 M ソルビトール処理によって、Split-GFP のシグナルサイズが大きくなっていた (Fig.20A)。しかし、セルソーターを用いた蛍光強度測定では、無処理の細胞群と比較して蛍光強度に差がなかった (Fig.20B)。ミトコンドリア外膜 (Tom71) と液胞膜 (Dpp1) の組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株に、0.5 M~1.5 M ソルビトールを添加して浸透圧ストレスを誘導した結果、無処理の細胞と比較してドット状の Split-GFP シグナルの数が増加した (Fig.21A)。セルソーターを用いた蛍光強度測定においても、無処理の細胞群と比較して蛍光強度が大きくなっていた (Fig.21B)。小胞体 (Ifa38) と液胞膜 (Dpp1) の組み合わせでは、浸透圧ストレスを誘導すると、Split-GFP のシグナルサイズが大きくなっていた (Fig.22A)。しかし、この細胞をセルソーターにソートしても、無処理の細胞と比較して蛍光強度のピークに大きな差はなかった (Fig.22B)。浸透圧ストレスに応答して、ミトコンドリア-液胞間コンタクトサイト領域が増加したことから、浸透圧ストレスに対して何らかの役割を持つことが示唆された。

さらに、高温ストレスで Split-GFP シグナルが変化するか検証した。Split-GFP を発現する酵母株を 37°C で 24 時間培養した後、蛍光顕微鏡で観察した。ミトコンドリア外膜 (Tom71) と小胞体膜 (Ifa38) の組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株では、30°C で培養した細胞と比較して、1細胞あたりのドット状の Split-GFP シグナルの数が増加していた (Fig.23A)。また、ミトコンドリア外膜 (Tom71) と液胞膜 (Ifa38) の組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株では、30°C で培養した細胞と比較して、1細胞あたりのドット状の Split-GFP シグナル数が増加し、ドットサイズが大きくなっていた (Fig.23B)。さらに、小胞体膜 (Ifa38) と液胞 (Dpp1) の組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株では、30°C で培養した細胞と比較して、細胞膜側に局在するドット状の Split-GFP シグナルが減少し、核膜側に蓄積していた (Fig.23C)。これらの結果から、ミトコンドリア-小胞体間、ミトコンドリア-液胞間や小胞体-液胞間コンタクトサイトは高温ストレスに応答して結合領域を増加させることで、細胞の恒常性維持に寄与することが示唆された。特に小胞体-液胞間コンタクトサイトは、核膜側の小胞体と液胞間のコンタクトサイトの領域が増加していたため、NVJ 領域が温度ストレスに重要である可能性が示唆された。

ミトコンドリアの機能不全が老化によって誘導されることが報告されている。具体的には、膜電位の減少やミトコンドリア内の ROS の産出、ミトコンドリアの断片化が挙げられる。よって老化によって、オルガネラ膜コンタクトサイトの挙動が変化するかを検証した。老化は、Calcofluor 染色によって可視化された細胞分裂回数を基準に評価した。ミトコンドリア外膜 (Tom71) と小胞体膜 (Ifa38) の組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株では、細胞分裂が多い細胞と少ない細胞で細胞あたりの Split-GFP シグナルの数や蛍光強度は大きく変化していなかった (Fig.24AB)。また、ミトコンドリア外膜 (Tom71) -液胞膜 (Dpp1) の組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株でも、細胞分裂の回数によって蛍光強度や Split-GFP シグナルの数は変化していなかった (Fig.24CD)。さらに、小胞体膜 (Ifa38) -液胞 (Dpp1) の組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株では、細胞分裂の回数が多いほど細胞面積あたりの蛍光強度が大きかった (Fig.24EF)。細胞内不要物を分解するために、液胞内の酸性度を保つことは重要であり、液胞は老化によって融合が促進されることが報告されており、液胞の機能や動態は老化と関連があることが報告されている[31-33]。また、老化によってミトコンドリアの膜電位の減少によって断片化することから、ミトコンドリア-液胞間コンタクトが変化することが予想されたが、変化していなかった。本研究では、分裂回数が多い細胞を分取する方法を確立することができず、適切な条件で観察ができなかったことが原因と考えられる。細胞分裂回数が多い細胞を分取するシステムの開発し、老化と MCS の関係を明らかにすることが今後の課題である。

### 3-2-3. 考察

本研究では、小胞体ストレス誘導時に1細胞あたりの ERMES ドット数が増加することを明らかにした。先行研究では、哺乳類細胞において Split-GFP 実験系によって可視化されたミトコンドリア-小胞体間結合領域が増加することが報告されており[20]、小胞体ストレス時のミトコンドリア-小胞体間コンタクトの増加が、出芽酵母細胞においても保存された表現系であることが示された。興味深

いことに、蛍光顕微鏡観察によって小胞体ストレス時に、一ドットあたりに含まれる Mmm1-GFP の分子数が減少していたことや、超解像蛍光顕微鏡 SCLIM を用いたライブセルイメージング観察によって、一つの ERMES ドットが複数回分裂する様子の撮影に成功しており、既存の ERMES 複合体クラスター構造が解離することで、ERMES ドットのサイズが小さくなり、ERMES ドット数が増加することを突き止めた。これらの現象は、UPR 応答を担う Ire1 や Hac1、またリン脂質合成酵素量の増加に重要な Ino2 や Ino4 に依存しなかったことから、新しい小胞体ストレス応答である可能性を強く示唆している。

ERMES 複合体は小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送を担う MCS であり、リン脂質輸送が細胞増殖に重要であることが報告されている。本研究では、ERMES が担うリン脂質輸送能が小胞体ストレスの緩和にも重要であることを明らかにした (Fig.25)。小胞体ストレス時にはミトコンドリアから小胞体への PE の輸送が阻害されていることが分かった (Fig.15)。加えて、ERMES ドット数の増加によって、PS が減少していること示唆された (Fig.14AB)。小胞体ストレス時には、小胞体内のフォールディング能力を増加させるためリン脂質合成量を増加させることで、小胞体が拡大することが知られている。小胞体ストレス時に ERMES ドット数が増加しない変異株 *mmm1-1* は、小胞体ストレス時の小胞体の伸長が抑制されており、Tm に強い感受性を示した (Fig.12)。すなわち、小胞体の伸長には、小胞体ストレス時に活性化する転写因子 Ino2/Ino4 によって増加したリン脂質が、ERMES 複合体クラスター構造の解離によってリン脂質輸送能が遅延することで小胞体に蓄積することが重要であり、ERMES 複合体が Ire1-Hac1 が担う一般的な UPR 応答と協調して小胞体ストレスの緩和に寄与している可能性を示唆している (Fig.25)。

現在は、ERMES 構成タンパク質 Mmm1 の内腔ドメインに着目し、ERMES クラスター解離のメカニズムの検討を続けている。小胞体ストレスセンサーである Ire1 は、異常タンパク質を検知したシャペロンタンパク質 Kar2 が Ire1 から分離することで、オリゴマー化し UPR 応答を進行している。さらに、Mmm1 と Kar2 が直接相互作用することが報告されていることから [19]、Mmm1 の小胞体内腔ドメインが Kar2 との相互作用を担っており、Kar2 との相互作用が ERMES 複合体クラスター構造の解離に重要であると仮説を立てた。実際、Mmm1(85-99)領域を欠損した細胞では、ERMES クラスター構造が形成されず (Fig11B)、生育阻害となることを示唆している (Fig11D)。今後 ERMES のクラスター化における Mmm1 の内腔ドメインの役割の詳細を明らかにしていく必要がある。

本研究で開発した Split-GFP システムは、これまで検出できなかったオルガネラ間の近接を検出することに成功した。しかし、Split-GFP の発現によって、コンタクトが促進されている可能性があった。そこで、Split-GFP を酵母ゲノムに導入することで細胞間の発現量のばらつきを軽減し、オルガネラ結合因子のスクリーニングや MCS の動的な変化をモニターする有効な実験系を開発した [5]。この改良された Split-GFP 実験系を用いて、細胞ストレス時のオルガネラ間近接が動的に変化するのか検証した。これまでに窒素や炭素飢餓状態において、NVJ 領域が増大し、オートファジーを促進することが報告されていた。

本研究では新たに酸化ストレス, 浸透圧ストレス, 高温ストレス, 老化ストレス時に Split-GFP 実験系によって可視化された小胞体膜 (Ifa38) -液胞膜 (Dpp1) 間のコンタクトが増大することを示した (Fig.19C, Fig.22, Fig.23C, Fig.24EF)。酸化ストレスなどによって変性したタンパク質やオルガネラは, オートファジーによって分解されることが報告されている。ストレス処理をした結果, オートファジーが誘導され NVJ 領域が拡大しているのかもしれない。今後の研究によって, NVJ 領域が拡大する生理的意義に関して明らかにする必要がある。

また, 窒素炭素飢餓, 酸化ストレス, 浸透圧ストレス, 高温ストレス時にミトコンドリア外膜 (Tom71) -液胞膜 (Dpp1) 間のコンタクトが増大することを示した。これらオルガネラ膜の MCS である vCLAMP 複合体は, 複合体構成タンパク質 Vps39 変異株において窒素・炭素飢餓状態において細胞増殖が遅延することが報告されているが, 飢餓ストレス条件下における vCLAMP 複合体の生理的意義は不明である[34]。本研究では, 新たに vCLAMP 複合体が様々なストレスに応答する可能性を示した。さらに, Split-GFP 実験系によって可視化されたミトコンドリア外膜 (Tom71) -小胞体膜 (Ifa38) 間の結合領域が, 浸透圧ストレスや高温ストレスに応答して増加することを示した (Fig.20, Fig.23A)。vCLAMP 領域や ERMES 複合体はリン脂質輸送を担う可能性が示されていることから, これらのストレス応答の際に, オルガネラコンタクトサイトが動的に変化することで, 細胞内の脂質の流れが変化している可能性が考えられる。脂質膜の流動性は脂質の脂肪酸組成によって大きく変化することが知られている。すなわち高温ストレス時には, 脂肪酸が不飽和脂肪酸から飽和脂肪酸に変化するが, この様な脂質組成の変化にオルガネラコンタクトサイトの再編成が重要なかもしれない。本研究によって, 複数の MCS が同時に変化することで, 様々なストレス応答に関与する可能性が示唆されたため, 今後細胞内の脂質輸送経路に着目した研究をすすめることで, 細胞ストレス応答における脂質輸送機構制御の新しい役割が明らかになっていくことが期待される。

最後に, MCS の結合領域の制御メカニズムを明らかにすることは医学的にも重要である。ミトコンドリア-小胞体間の結合領域の変化は, 出芽酵母細胞や哺乳類細胞だけではなく, 神経変性疾患の神経細胞でも報告されている。具体的には, 若年性アルツハイマー病ではミトコンドリア-小胞体間の結合領域が増加することが報告された[35]。さらにアルツハイマー病関連タンパク質 PS1 と PS2 がミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイトに多く局在しており, これらタンパク質の変異も結合領域の増加を引き起こし, ミトコンドリアへの  $Ca^{2+}$  流入を増加させる[36]など, これらコンタクトサイト機能とアルツハイマー病の関連が示唆されている。さらに, ミトコンドリアと液胞間テザリング因子である Vps13 は酵母から哺乳類細胞まで幅広く保存されている。哺乳類細胞では Vps13A~D までホモログが存在し, 全てが神経変性疾患の原因遺伝子である[37-40]。特に Vps13A と Vps13C は小胞体膜関連コンタクトサイトに局在し, オルガネラ間の脂質輸送を担うと考えられている[41]。このように, オルガネラ間コンタクトサイトの分子実態や結合領域の調節メカニズム, 機能を解明することは, 神経変性疾患の病態の解明や治療法の開発に貢献できると考えられる。本研究で明らかにした, ERMES 複合体の新たな役割は, 神経変性疾患に新たな知見を提供する研究結果となった。

#### 4. 参考文献

- [1] Hieter, R. S. S. and P. & Department. “A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Genetics* **122**, 19–27 (1989).
- [2] Kakimoto, Y., Tashiro, S., Kojima, R., *et al.* “Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-Targeted split-GFP system”. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
- [3] Shawn M. Burgess, Michael Delannoy, R. E. J. “MMM1 Encodes a Mitochondrial Outer Membrane Protein Essential for Establishing and Maintaining the Structure of Yeast Mitochondria”. *J. Cell Biol.* **126**, 1375–1391 (1994).
- [4] Tamura, Y., Onguka, O., Aiken Hobbs, A. E., *et al.* “Role for two conserved intermembrane space proteins, Ups1p and Up2p, in intra-mitochondrial phospholipid trafficking”. *J. Biol. Chem.* **287**, 15205–15218 (2012).
- [5] Tashiro, S., Kakimoto, Y., Shinmyo, M., *et al.* “Improved Split-GFP Systems for Visualizing Organelle Contact Sites in Yeast and Human Cells”. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–17 (2020).
- [6] Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., *et al.* “Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Yeast* **14**, 953–961 (1998).
- [7] Kojima, R., Endo, T. & Tamura, Y. “A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro”. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
- [8] Kurokawa, K., Ishii, M., Suda, Y., *et al.* “Live cell visualization of golgi membrane dynamics by super-resolution confocal live imaging microscopy”. *Methods in Cell Biology* vol. 118 (Elsevier Inc., 2013).
- [9] Kurokawa, K., Okamoto, M. & Nakano, A. “Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER”. *Nat. Commun.* **5**, 3653 (2014).
- [10] Istvan R. Boldogh, D. W. N. & Hyeong-Cheol Yang,† Haesung Chung, Sharon Karmon, Patrina Royes, and L. A. P. “A Protein Complex Containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p Links Mitochondrial Membranes and DNA to the Cytoskeleton-based Segregation Machinery”. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4618–4627 (2003).
- [11] Cabantous, S., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. “Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein”. *Nat. Biotechnol.* **23**, 102–107 (2005).
- [12] Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., *et al.* “An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen”. *Science (80-. )*. **325**, 477–481 (2009).
- [13] Elbaz-Alon, Y., Rosenfeld-Gur, E., Shinder, V., *et al.* “A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast”. *Dev. Cell* **30**, 95–102 (2014).

- [14] Hönscher, C., Mari, M., Auffarth, K., *et al.* “Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria”. *Dev. Cell* **30**, 86–94 (2014).
- [15] Pan, X., Roberts, P., Chen, Y., *et al.* “Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p”. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2445–2457 (2000).
- [16] Huang, X., Jiang, C., Yu, L., *et al.* “Current and Emerging Approaches for Studying Inter-Organelle Membrane Contact Sites”. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–19 (2020).
- [17] Kawano, S., Tamura, Y., Kojima, R., *et al.* “Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm 1-Mdm 12 of ERMES”. *J. Cell Biol.* **217**, 959–974 (2018).
- [18] Elbaz-Alon, Y., Eisenberg-Bord, M., Shinder, V., *et al.* “Lam6 Regulates the Extent of Contacts between Organelles”. *Cell Rep.* **12**, 7–14 (2015).
- [19] Kornmann, B., Osman, C. & Walter, P. “The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14151–14156 (2011).
- [20] Cieri, D., Vicario, M., Giacomello, M., *et al.* “SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition”. *Cell Death Differ.* **25**, 1131–1145 (2018).
- [21] Bravo, R., Vicencio, J. M., Parra, V., *et al.* “Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress”. *J. Cell Sci.* **124**, 2511 (2011).
- [22] Zhao, Y. G., Chen, Y., Miao, G., *et al.* “The ER-Localized Transmembrane Protein EPG-3/VMP1 Regulates SERCA Activity to Control ER-Isolation Membrane Contacts for Autophagosome Formation”. *Mol. Cell* **67**, 974-989.e6 (2017).
- [23] Yang, Z., Zhao, X., Xu, J., *et al.* “A novel fluorescent reporter detects plastic remodeling of mitochondria-ER contact sites”. *J. Cell Sci.* **131**, (2018).
- [24] Cox, J. S., Chapman, R. E. & Walter, P. “The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane”. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1805–1814 (1997).
- [25] Lawrimore, J., Bloom, K. S. & Salmon, E. D. “Point centromeres contain more than a single centromere-specific Cse4 (CENP-A) nucleosome”. *J. Cell Biol.* **195**, 573–582 (2011).
- [26] Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., *et al.* “Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation.”. *J. Cell Biol.* **198**, 219–233 (2012).
- [27] Belgareh-Touzé, N., Cavellini, L. & Cohen, M. M. “Ubiquitination of ERMES components by the E3 ligase Rsp5 is involved in mitophagy”. *Autophagy* **13**, 114–132 (2017).

- [28] Schuck, S., Prinz, W. A., Thorn, K. S., *et al.* “Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response”. *J. Cell Biol.* **187**, 525–536 (2009).
- [29] Meisinger, C., Pfannschmidt, S., Rissler, M., *et al.* “The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major  $\beta$ -barrel assembly pathway of mitochondria”. *EMBO J.* **26**, 2229–2239 (2007).
- [30] Kojima, R., Kakimoto, Y., Shinmyo, M., *et al.* “A non-canonical unfolded protein response pathway and mitochondrial dynamics control the number of ER-mitochondria contact sites”. *bioRxiv* (2019) doi:10.1101/684753.
- [31] Aufschnaiter, A. & Büttner, S. “The vacuolar shapes of ageing: From function to morphology”. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1866**, 957–970 (2019).
- [32] Goodrum, J. M., Lever, A. R., Coody, T. K., *et al.* “Rsp5 and Mdm30 reshape the mitochondrial network in response to age-induced vacuole stress”. *Mol. Biol. Cell* **30**, 2141–2154 (2019).
- [33] Hughes, C. E., Coody, T. K., Jeong, M. Y., *et al.* “Cysteine Toxicity Drives Age-Related Mitochondrial Decline by Altering Iron Homeostasis”. *Cell* **180**, 296-310.e18 (2020).
- [34] González Montoro, A., Auffarth, K., Hönscher, C., *et al.* “Vps39 Interacts with Tom40 to Establish One of Two Functionally Distinct Vacuole-Mitochondria Contact Sites”. *Dev. Cell* **45**, (2018).
- [35] Area-Gomez, E., Del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, M. D., *et al.* “Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease”. *EMBO J.* **31**, 4106–4123 (2012).
- [36] Area-Gomez, E., De Groof, A. J. C., Boldogh, I., *et al.* “Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria”. *Am. J. Pathol.* **175**, 1810–1816 (2009).
- [37] Arruda, A. P., Pers, B. M., Parlakgöl, G., *et al.* “Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity”. *Nat. Med.* **20**, 1427–1435 (2014).
- [38] Lesage, S., Drouet, V., Majounie, E., *et al.* “Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy”. *Am. J. Hum. Genet.* **98**, 500–513 (2016).
- [39] Kolehmainen, J., Black, G. C. M., Saarinen, A., *et al.* “Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport”. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1359–1369 (2003).

- [40] Gauthier, J., Meijer, I. A., Lessel, D., *et al.* “Recessive mutations in VPS13D cause childhood onset movement disorders”. *Ann. Neurol.* **83**, 1089–1095 (2018).
- [41] Kumar, N., Leonzino, M., Hancock-Cerutti, W., *et al.* “VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites”. *J. Cell Biol.* **217**, 3625–3639 (2018).

## 5. 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、厚大な御指導と御助言を賜りました田村康教授に厚く御礼申し上げます。さらに、博士後期課程に進学するに当たり、研究の機会を与えてくださいました指導教官の藤井順逸教授に厚く御礼申し上げます。また、学位審査に当たりまして、多大なご助言を賜りました中島修教授と高木理彰教授に感謝申し上げます。そして、特任助教の田代晋也博士、小島理恵子博士、卓越研究員助教の河合寿子博士、河合文啓博士、助教の野村真未博士、講師の渡邊康紀博士には様々な御指導や御協力をいただきました。誠に有難うございました。さらに、ディスカッションやリトリートなどを通して厚大な御指導と御助言を賜りました京都産業大学遠藤斗志也教授を始めとする遠藤研究室関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

超解像蛍光顕微鏡SCLIMを用いたライブセルイメージング研究におきましては、理化学研究所生細胞超解像イメージングチーム、チームリーダーの中野明彦先生、専任研究員の黒川量雄先生には、多大な御協力と御助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。

また、技術補佐員の橋下美智子さん、佐々木知美さん、秘書の高橋祥子さん、そして研究室の学生には実験への御協力や御助言など感謝申し上げます。

最後に、どんな時でも支えてくれた家族と、愛娘を預かり研究活動をサポートしてくださいました小白川キャンパス保育所の職員の皆様に感謝を申し上げ謝辞とさせていただきます。

## 6. 略語

ER : endoplasmic reticulum

OM : outer membrane

IMS : intermembrane space

IM : inner membrane

CL : cardiolipin

PA : phosphatidic acid

PI : phosphatidylinositol

PS : phosphatidylserine

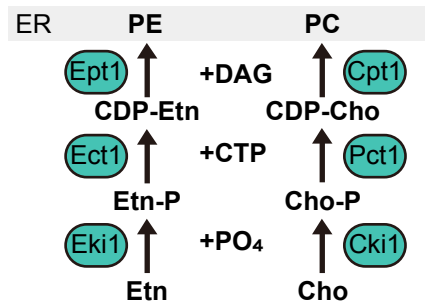
PE : phosphatidylethanolamine

PC : phosphatidylcholine

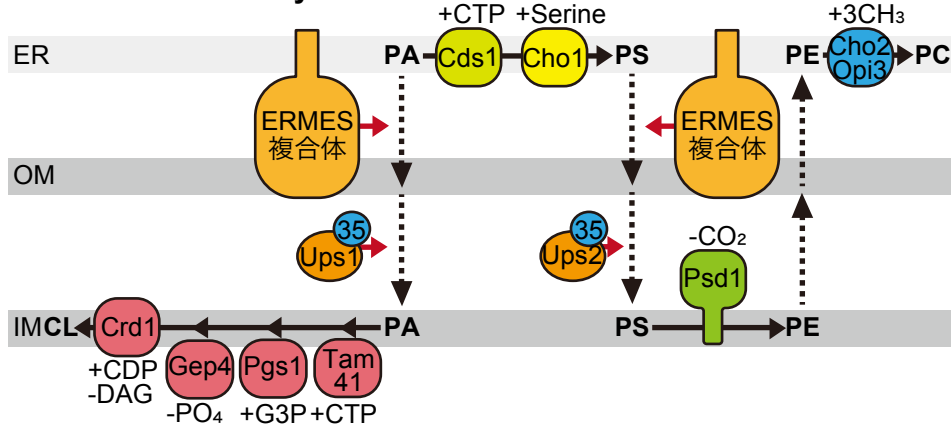


PDME : phosphatidyl-*N, N*-dimethylethanolamine  
DNA : deoxyribonucleic acid  
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid  
PCR : polymerase chain reaction  
SDS : sodium dodecyl sulfate  
ER : endoplasmic reticulum  
DTT : dithiothreitol  
GFP : green fluorescent protein  
MOPS : 3- (N-morpholino) propanesulfonic acid  
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis  
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride  
SDS : sodium dodecylsulfate  
Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane  
CTP : citidine triphosphate  
ERMES : endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria encounter structure  
vCLAMP : vacuole and *mitochondria* patch  
NVJ : nucleus-*vacuole* junction  
RFP : red fluorescent protein  
DIC : Differential Interference Contrast  
SCLIM : Super-resolution confocal live imaging microscopy  
TLC : thin-layer Chromatography  
WT : wild type  
Tm : Tunicamycin  
CTRL : control  
TBST : Tris Buffered Saline with Tween 20  
v/v : volume per volume  
w/v : weight per volume  
kDa : kilodalton

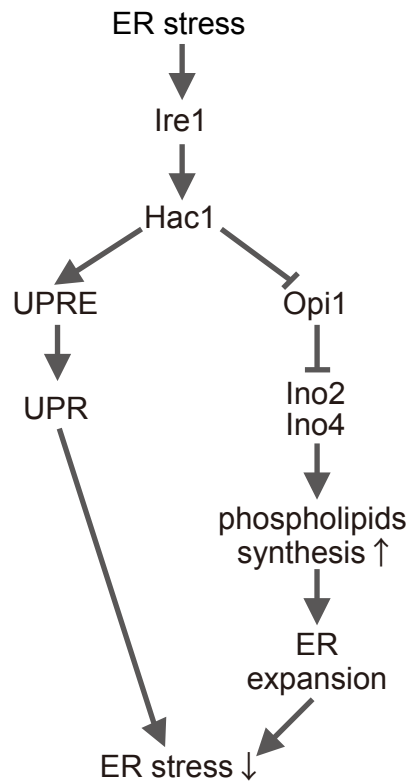
### A The Kennedy Pathway



### B The CDP-DAG Pathway

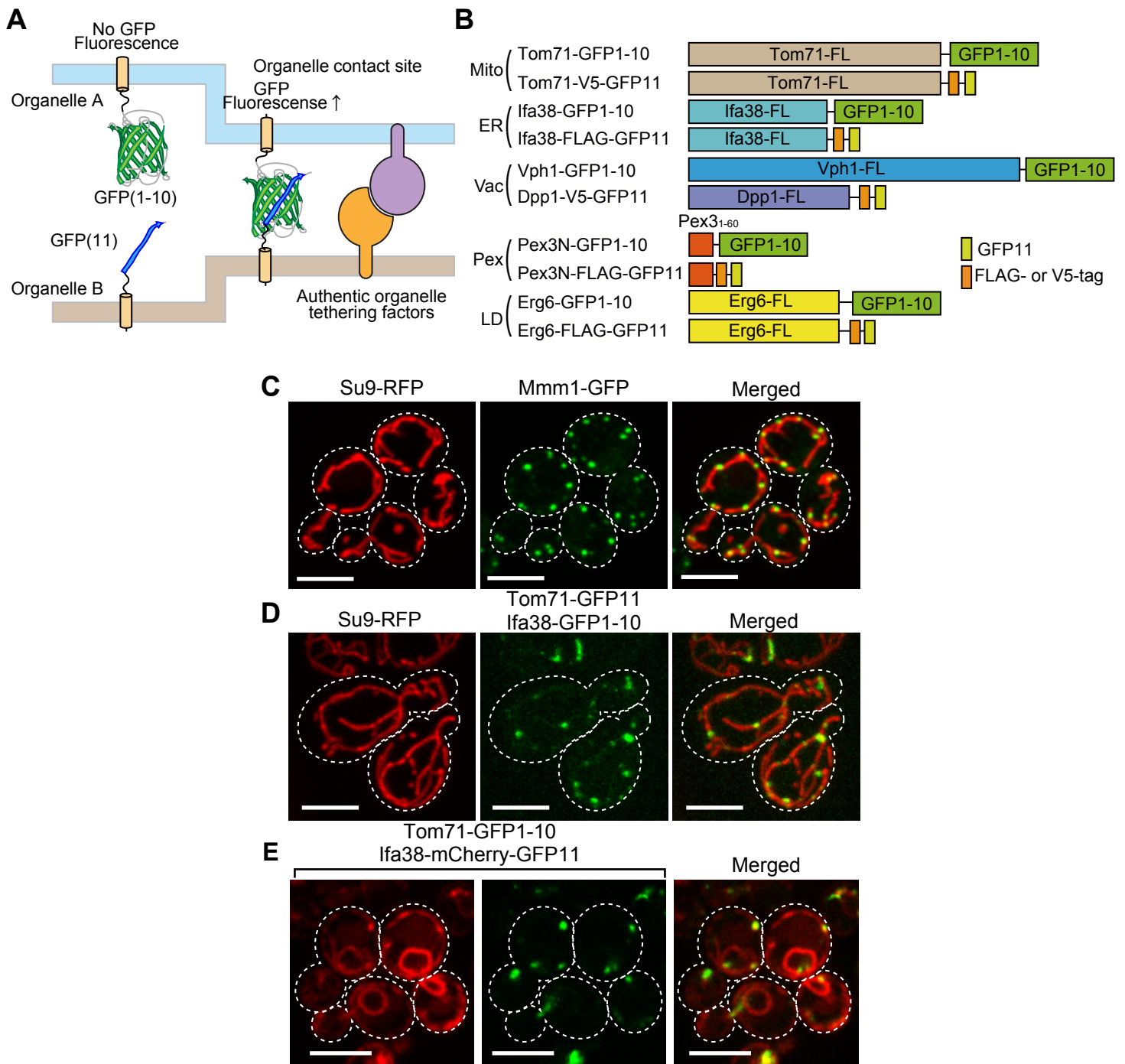


### C



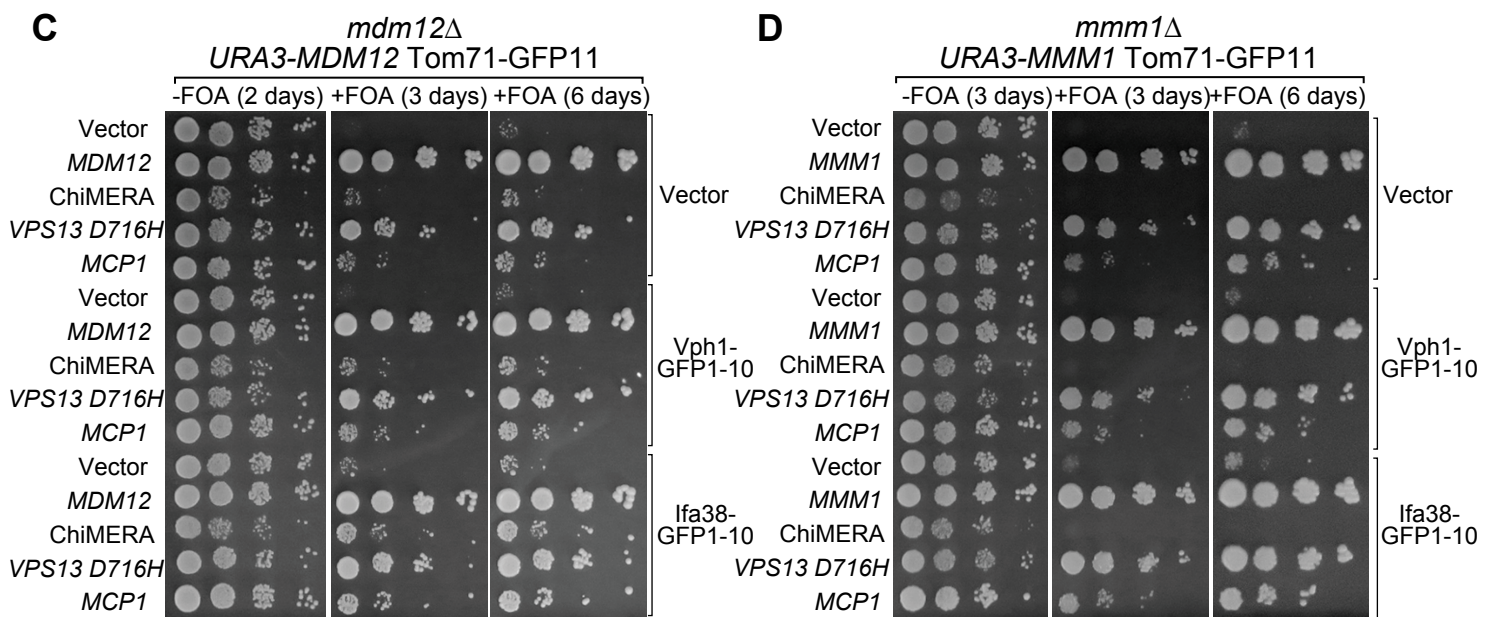
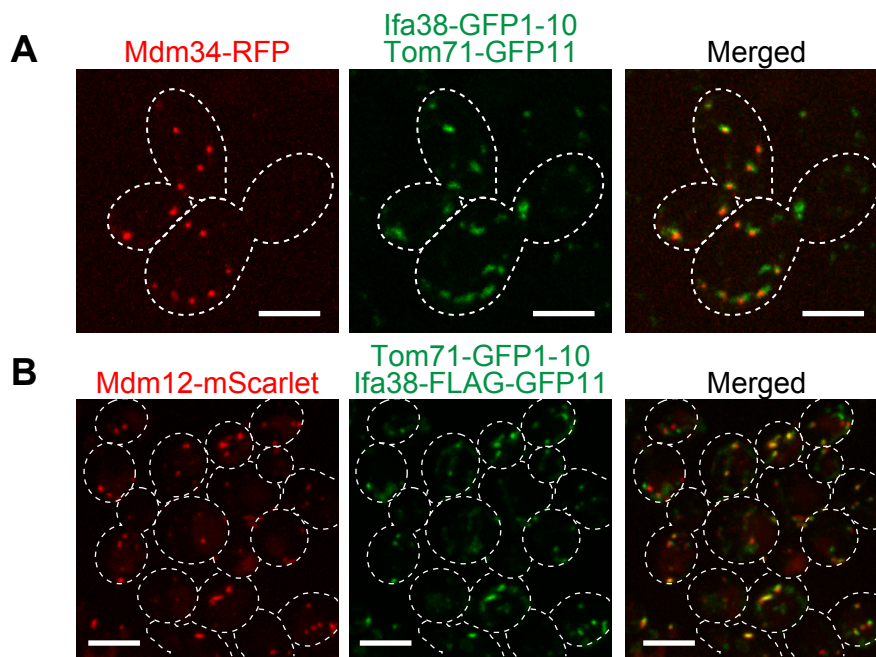
**Figure.1 リン脂質合成・輸送と出芽酵母細胞のUPR 応答**

(A)Kennedy 経路、(B)CDP-DAG 経路を示す。PA はホスファチジン酸、PC はホスファチジルコリン、PE はホスファチジルエタノールアミン、PS はホスファチジルセリン、PI はホスファチジルイノシトール、PG はホスファチジルグリセロール、CL はカルジオリピンを示す。(C) 出芽酵母細胞に ER stress が誘導されると、Ire1 がオリゴマー化し、転写因子 Hac1 の mRNA をスプライシングすることで Hac1 が発現する。Hac1 は核内に移行し、UPRE 配列に結合することで、UPR 応答に必要なタンパク質の発現を活性化する。また、Opi1 が小胞体膜にトラップされ、核内の Ino2/Ino4 から分離することでリン脂質合成酵素の転写が活性化される。そして、リン脂質合成量が増加することで小胞体の伸長が引き起こされ、異常タンパク質のフォールディング能力が増加する。

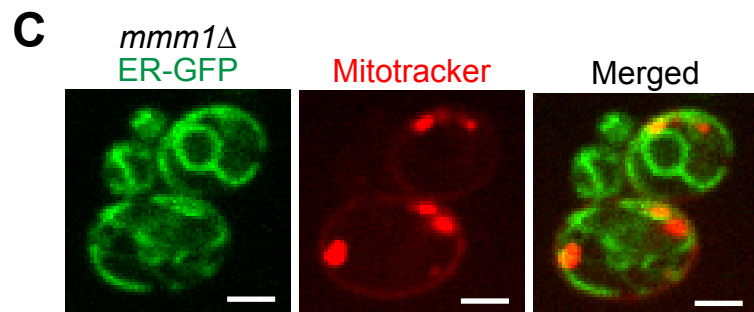
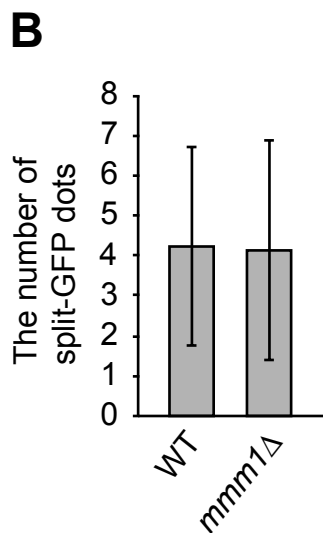
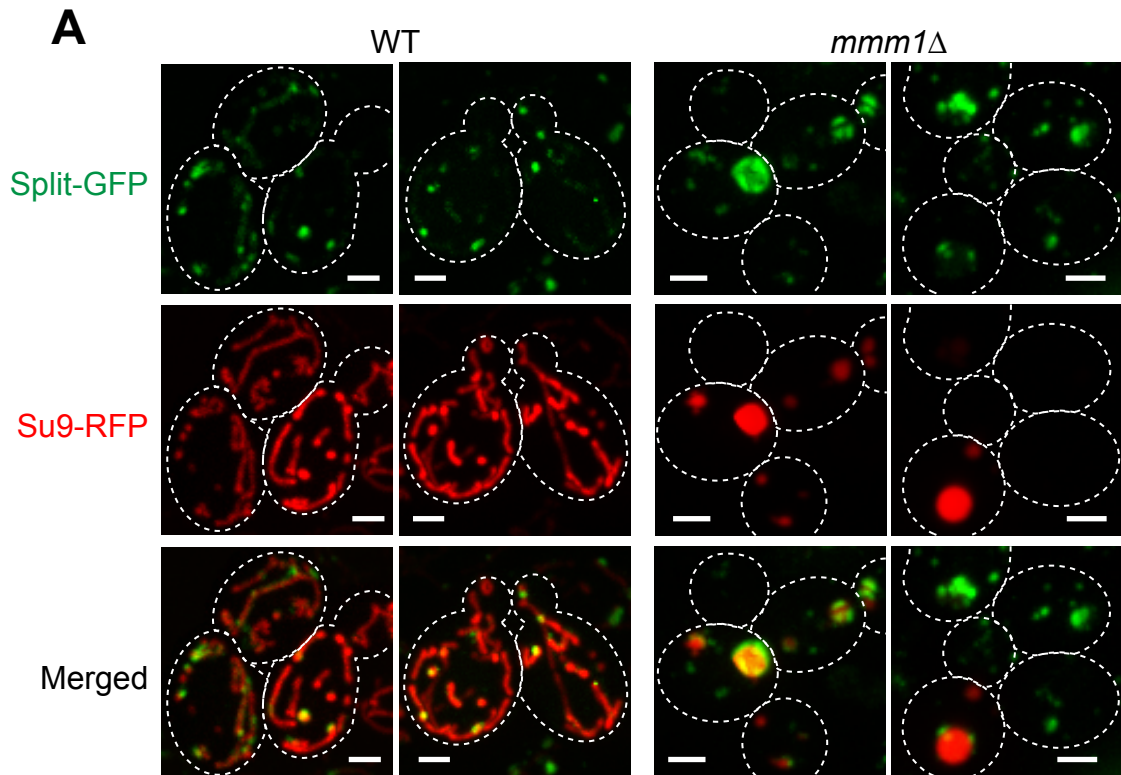


**Figure.2 ミトコンドリア - 小胞体間コンタクトサイトで Split-GFP シグナルが検出される**

(A) GFP の 11 本のβシートの前半 1~10 本を Split-GFP(1-10)、11 本目を Split-GFP(11) として異なるオルガネラ膜全体に発現させる。このオルガネラ間にテザリング因子が存在する場合、オルガネラ膜間が接近しているため Split-GFP 同士も接近し GFP 分子を再構成し、蛍光を発すると考えられる。(B) オルガネラ膜タンパク質と Split-GFP の融合タンパク質を示すミトコンドリア外膜 (Mito) に局在する Tom71、小胞体膜 (ER) に局在する Ifa38、液胞膜 (Vac) に局在する Vph1 または Dpp1、ペルオキシソーム膜 (Pex) に局在する Pex3 の N 末端、脂肪滴膜 (LD) に局在する Erg6 に Split-GFP(1-10) もしくは Split-GFP(11) を融合し、融合タンパク質として発現させた。(C) Mmm1-GFP とミトコンドリア局在化シグナル Su9-RFP、(D) Ifa38-GFP1-10 Tom71-GFP11 とミトコンドリア局在化シグナル Su9-RFP、(E) Ifa38-mCherry-GFP11 Tom71-GFP1-10 を発現させた出芽酵母細胞を蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5 μm



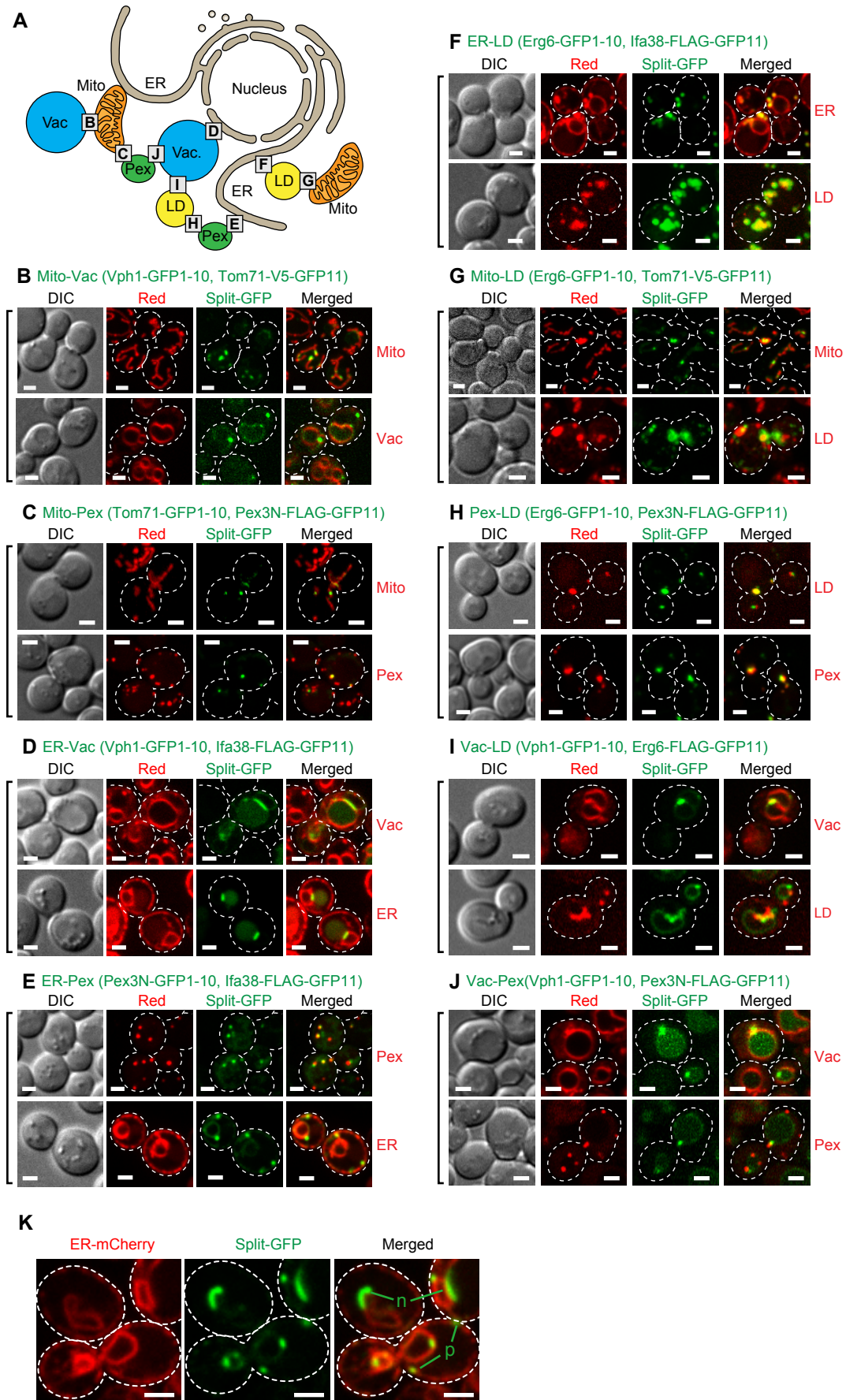
**Figure.3 ミトコンドリア - 小胞体間 Split-GFP シグナルは ERMES サブユニットと共局在する**  
 (A) Mdm34-RFP, (B)Mdm12-mScarlet を発現する細胞に、Ifa39-GFP1-10 Tom71-GFP11 または、Ifa38-GFP11 Tom71-GFP1-10 を導入し蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5  $\mu$ m(C) *mdm12Δ* (D) *mmm1Δ*株に Mdm12 や Mmm1 を発現する CEN-URA プラスミドと Tom71-GFP11 を導入した出芽酵母細胞に、示した Split-GFP プラスミドまたは Vps13D716H, Mcp1,ChiMERA を発現するプラスミドを導入した。この細胞を FOA が含まれる選択培地にスポットした。



**Figure.4 *mmm1* $\Delta$ のミトコンドリア - 小胞体間 Split-GFP シグナル**

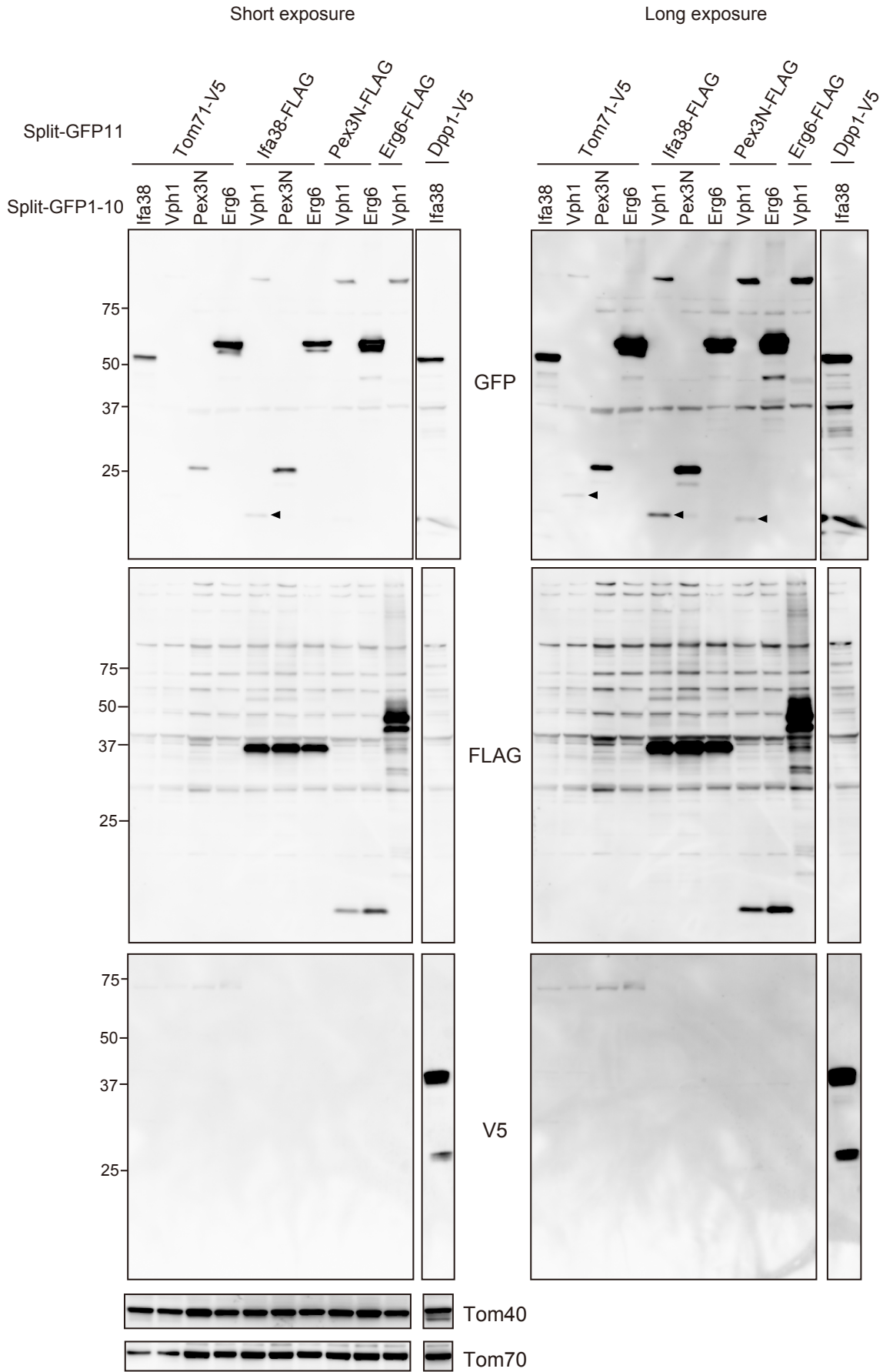
(A) WT と *mmm1* $\Delta$  に Ifa38-GFP11 Tom71-GFP1-10 ミトコンドリアシグナル配列 Su9 に RFP 融合し発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。(B) 一細胞あたりの Split-GFP シグナル数を定量した。WT n=87cells, *mmm1* $\Delta$  n=115cells (C) *mmm1* $\Delta$  に ER-GFP を発現させた出芽酵母細胞を Mitotracker でミトコンドリアを染色し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 2  $\mu$ m





**Figure.5 Split-GFP は任意のオルガネラ膜間近接の検出に有効である**

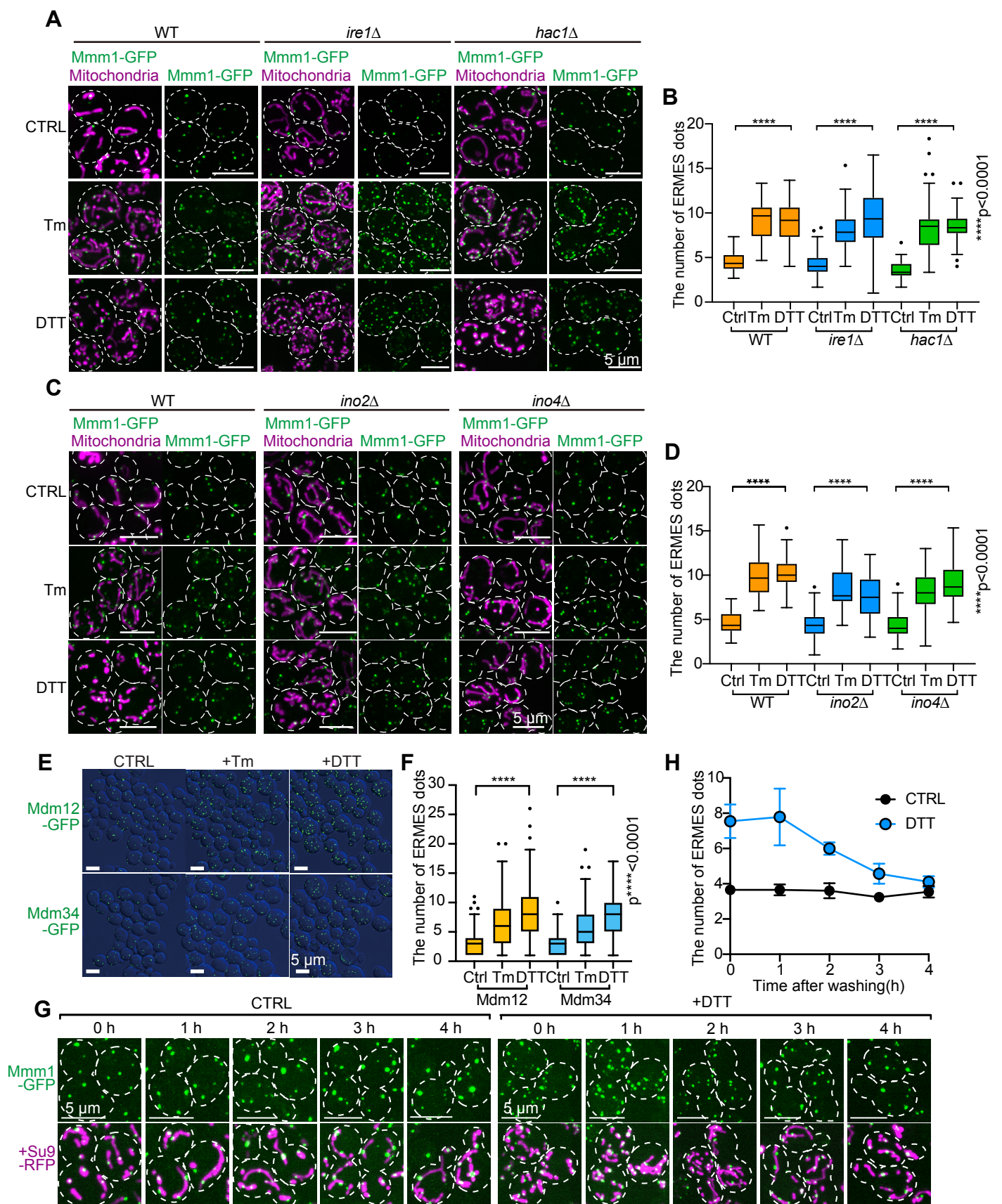
(A) 検証した Split-GFP を発現させるオルガネラの組み合わせを示した。Mito: ミトコンドリア、ER: 小胞体、Vac: 液胞、Pex: ペルオキシソーム、LD: 脂肪滴 (B)~(J) 示した組み合わせで Split-GFP を発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。(K) Ifa38-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11 を発現させた酵母株。n は核膜近傍の小胞体に局在し、p は細胞膜近傍の小胞体に局在する Split-GFP シグナルを示す。スケールバー 2  $\mu$ m



**Figure.6 Split-GFP の発現量**

示したオルガネラの組み合わせで Split-GFP を発現する酵母株からトータルライセートを調製し、GFP,FLAG,V5,Tom40,Tom70 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。矢印は Vph1-GFP1-10 の分解物と考えられるバンドを示す。

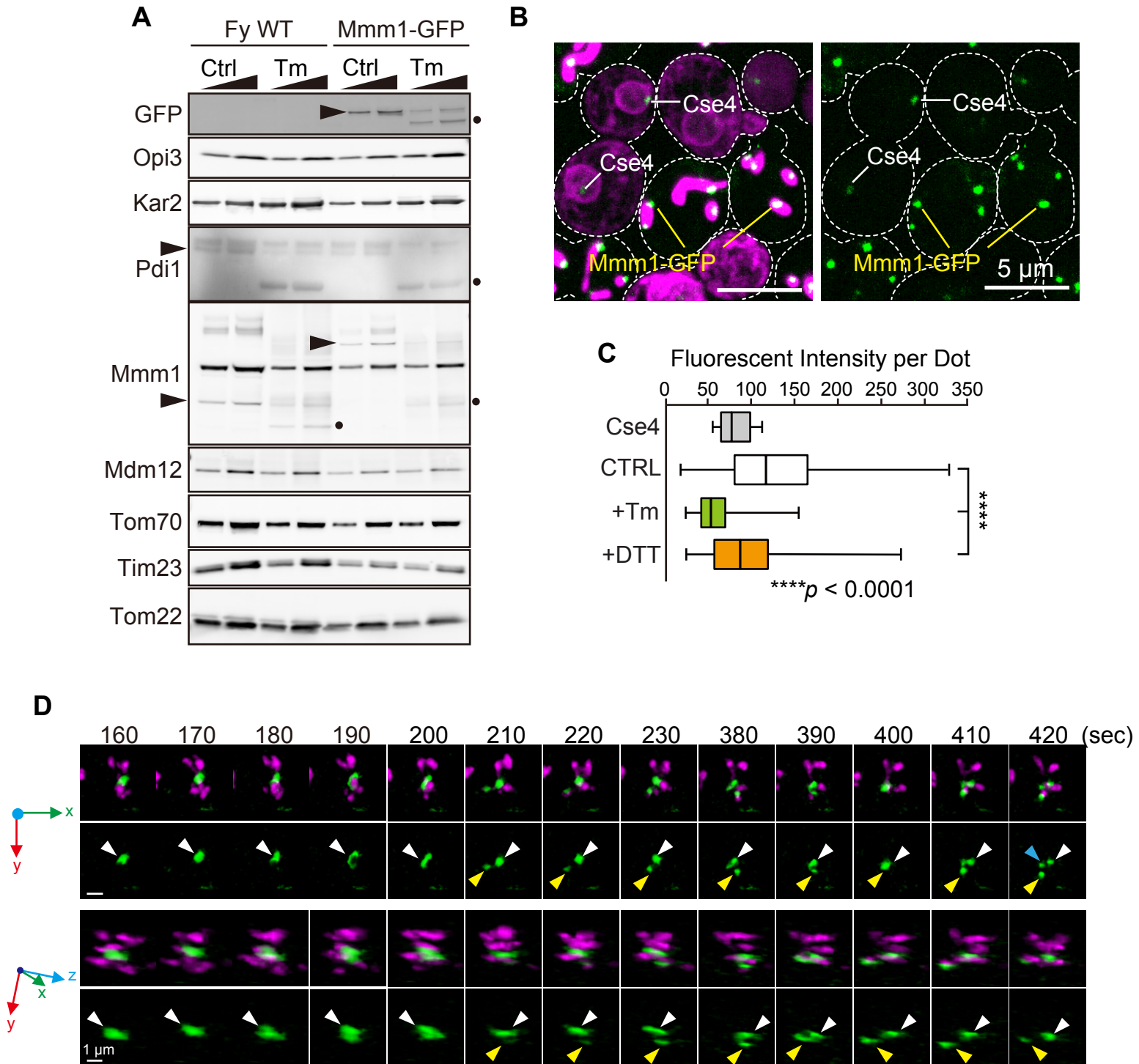




**Figure.7 小胞体ストレス時に UPR 非依存的に ERMES ドット数が増加する**

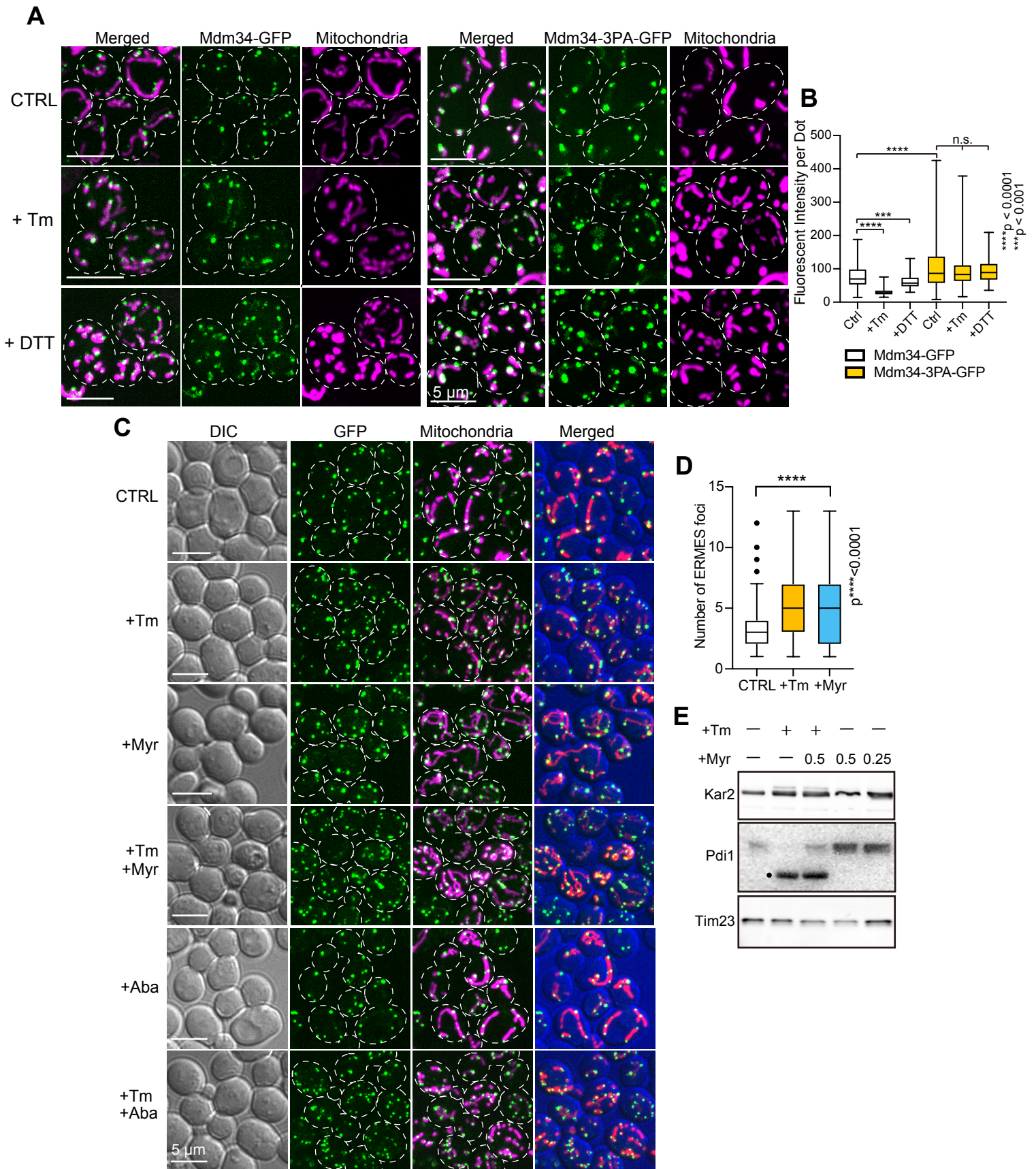
(A) Fy833, *ire1Δ*, *hac1Δ* (C) Fy833, *ino2Δ*, *ino4Δ* に Mmm1-GFP pRS316-Su9-RFP (E) Mdm12-GFP, Mdm34-GFP を導入し, SCD-Ura 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1 μg/ml) または DTT (3 mM) 処理を 2 時間行い, 蛍光顕微鏡で観察した。(B)(D)(F) 一細胞あたりの ERMES ドット数を定量した。Fy833 (Ctrl, Tm, DTT)=150, 150, 131 cells, *ire1Δ* (Ctrl, Tm, DTT)=150, 150, 141 cells, *hac1Δ* (Ctrl, Tm, DTT)=150, 150, 150 cells、Fy833 (Ctrl, Tm, DTT)=147, 147, 147 cells, *ino2Δ* (Ctrl, Tm, DTT)=159, 138, 142 cells, *ino4Δ* (Ctrl, Tm, DTT)=162, 138, 139 cells、Mdm12-GFP (Ctrl, Tm, DTT)=153, 171, 172 cells, Mdm34-GFP (Ctrl, Tm, DTT)=133, 190, 190 cells 数えた。(G) Fy833 に Mmm1-GFP pRS316-Su9-RFP を導入し, SCD-Ura 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。DTT (3 mM) 処理を 2 時間行い, SCD-Ura 培地で wash して 1 時間ごとに蛍光顕微鏡で観察した。(H) 一細胞あたりの ERMES ドット数を定量した。Ctrl (0h, 1h, 2h, 3h, 4h)=332, 373, 399, 427, 313 cells, DTT (0h, 1h, 2h, 3h, 4h)=342, 298, 270, 364, 350 cells 数えた。スケールバー 5 μm





**Figure.8 小胞体ストレス時に ERMES クラスター構造が解離する**

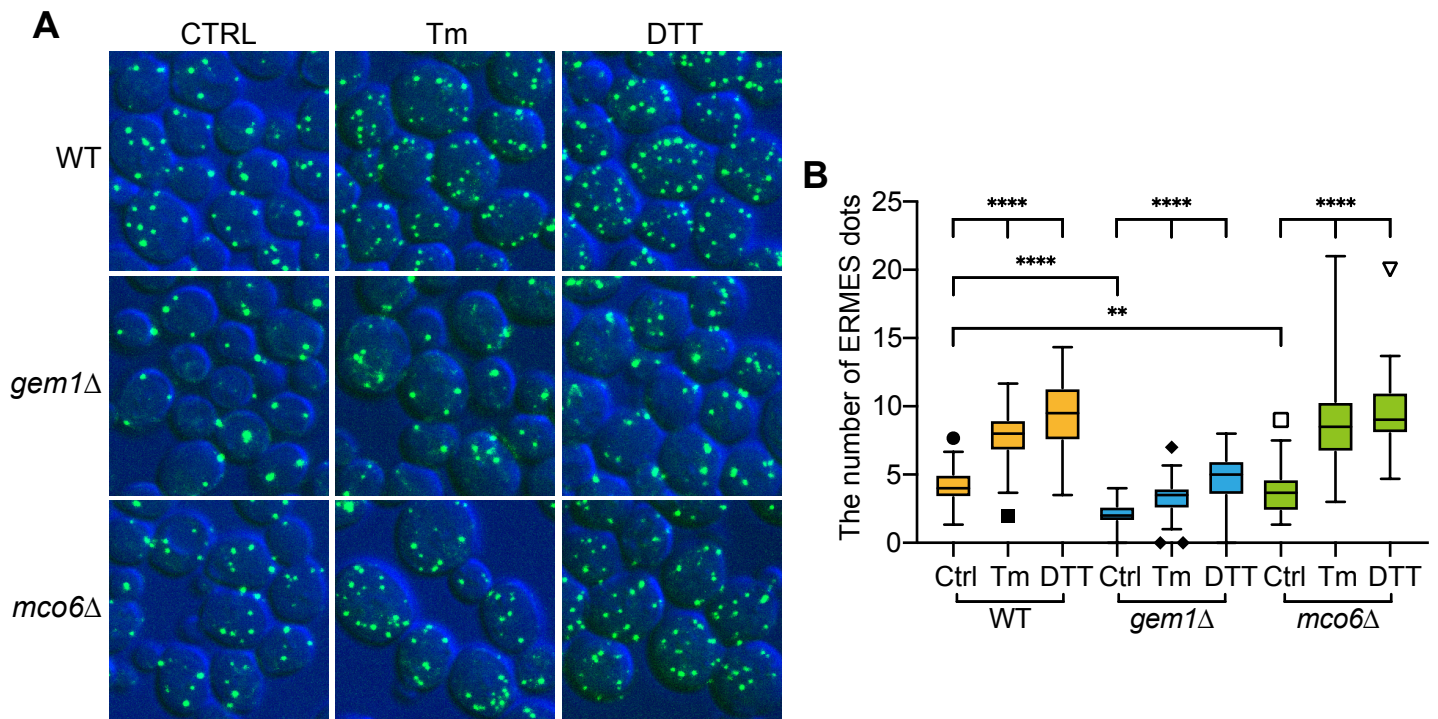
(A) 野生株、Mmm1-GFP を発現する酵母株を、SCD 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 処理を 2 時間行った後、細胞を集菌して粗ミトコンドリア膜を調製した。ERMES 複合体構成タンパク質である Mmm1, Mdm12 抗体や小胞体ストレスマーカー Kar2, Pdi1 抗体、ローディングコントロールとして Tom70, Tim23, Tom22 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。矢印で示したバンドは Mmm1-GFP, Pdi1, Mmm1 を示し、ドットは Tm 処理によって糖鎖切断された各々のバンドを示した。(B) Mmm1-GFP pRS316-Su9-RFP を導入し、SCD-Ura 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) または DTT (3 mM) 処理を 2 時間行い、Cse4-GFP pRS316-BipN-mCherry を発現する酵母株と混合して蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5  $\mu\text{m}$  (C) 一細胞あたりの Mmm1-GFP 分子数を定量した。(D) Mmm1-GFP Isd11-mCherry を導入し、SCD 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 処理を 1 時間行い、超解像蛍光顕微鏡 SCLIM で 10 秒間隔に Z 軸方向に 0.2  $\mu\text{m}$  間隔で約 70 枚撮影し、3 次元画像を取得した。スケールバー 1  $\mu\text{m}$



**Figure.9 ERMES クラスター構造が解離するメカニズムの検討**

(A) Mdm34-GFP、Mdm34-3PA-GFP を発現する株に pRS316-Su9-RFP を導入し、SCD-Ura 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1 μg/ml) または DTT (3 mM) 処理を 2 時間行い、蛍光顕微鏡で観察した。(B) 一細胞あたりの Mdm34-GFP 分子数を定量した。(C) Mmm1-GFP pRS316-Su9-RFP を発現する酵母株を 30°C で対数増殖期まで培養した。ミリオシン (0.5 μg/ml) を 5 時間、オーレオバシジン A (50 ng/ml) を 2 時間、または Tm (1 μg/ml) を 2 時間処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5 μm (D) 一細胞あたりの Mmm1-GFP ドット数を定量した。(E) Mmm1-GFP pRS316-Su9-RFP を発現する酵母株を 30°C で対数増殖期まで培養した。ミリオシン (0.5 μg/ml) を 5 時間、または Tm (1 μg/ml) を 2 時間処理した後、細胞を集菌して SDS サンプルとして調製した。小胞体ストレスマーカー Kar2、Pdi1 抗体、ローディングコントロールとして Tim23 抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。ドットは Tm 処理によって Pdi1 の糖鎖切断された各々のバンドを示した。

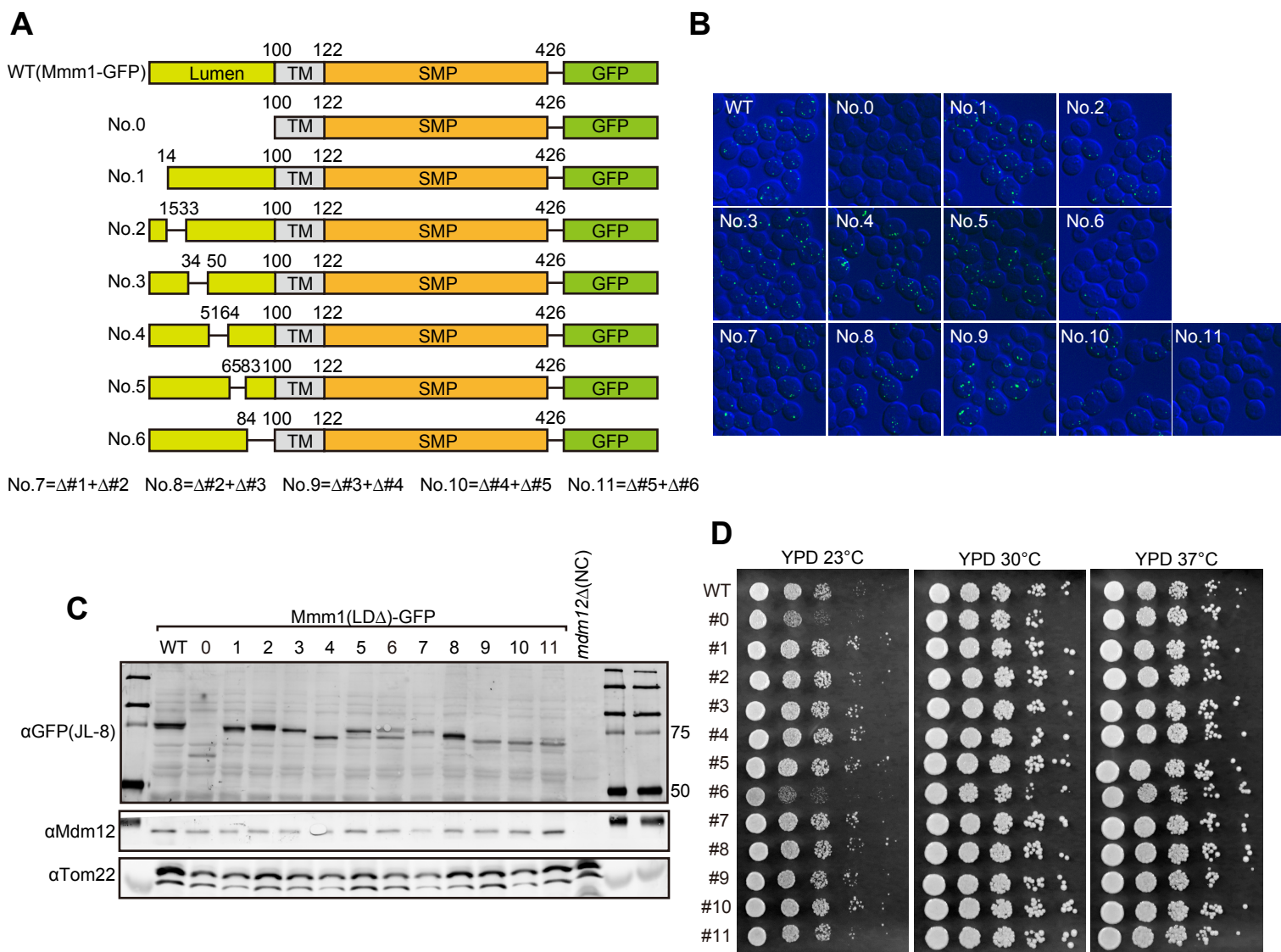




**Figure.10 *gem1*Δにおいて小胞体ストレス時に ERMES ドット数の増加が抑制される**

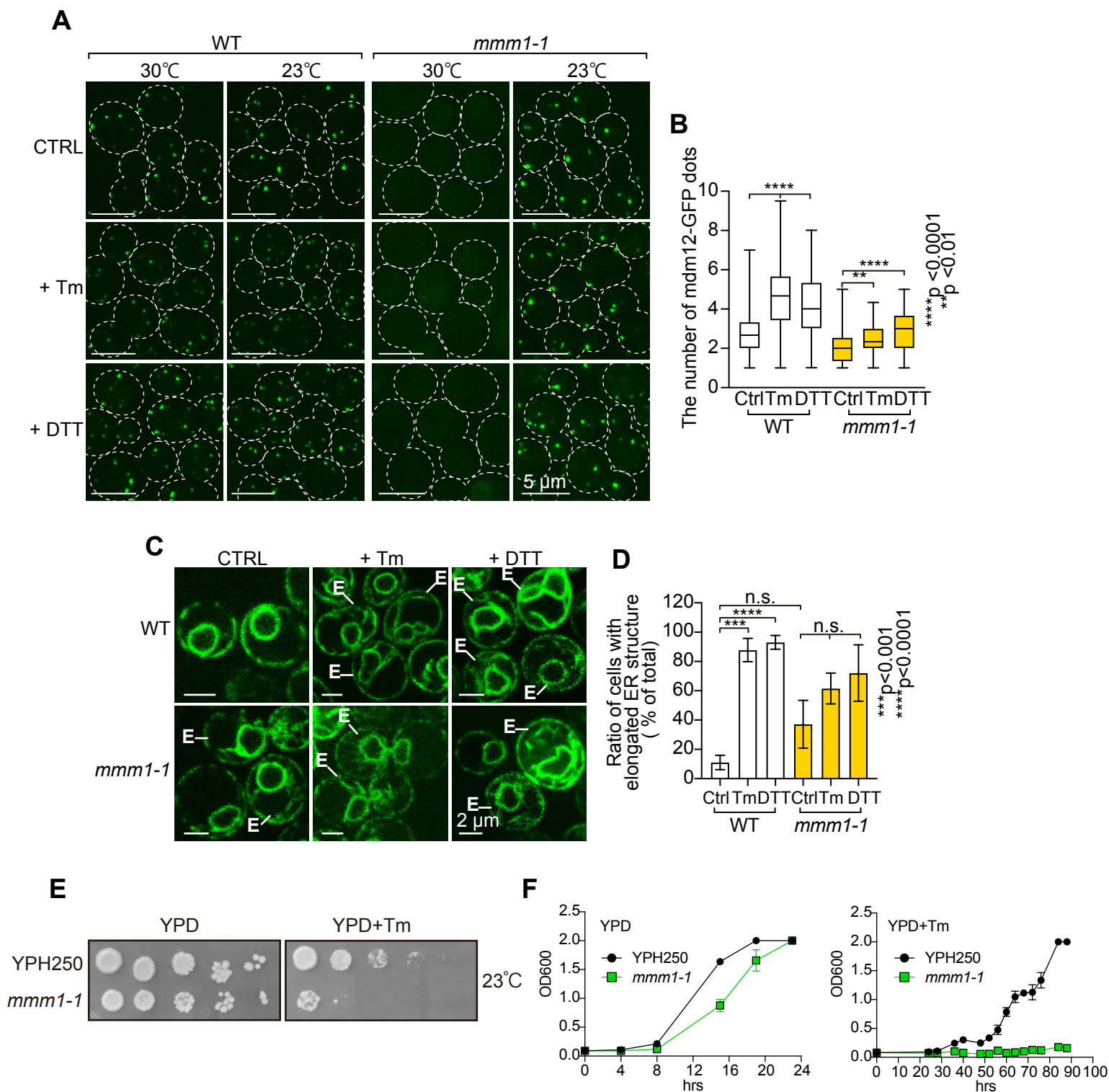
(A) Fy833, *gem1*Δ, *mco6*Δに Mmm1-GFP を導入し, SCD-Trp 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1 μg/ml) または DTT (3 mM) 処理を 2 時間行い, 蛍光顕微鏡で観察した。(B) 一細胞あたりの ERMES ドット数を定量した。

Fy833(Ctrl,Tm,DTT)=225,226,219 cells, *gem1*Δ(Ctrl,Tm,DTT)=281,242,233 cells, *mco6*Δ(Ctrl,Tm,DTT)=259,206,212 cells 数えた。



**Figure.11 Mmm1(85-99) は ERMES 複合体クラスター構造形成に重要**

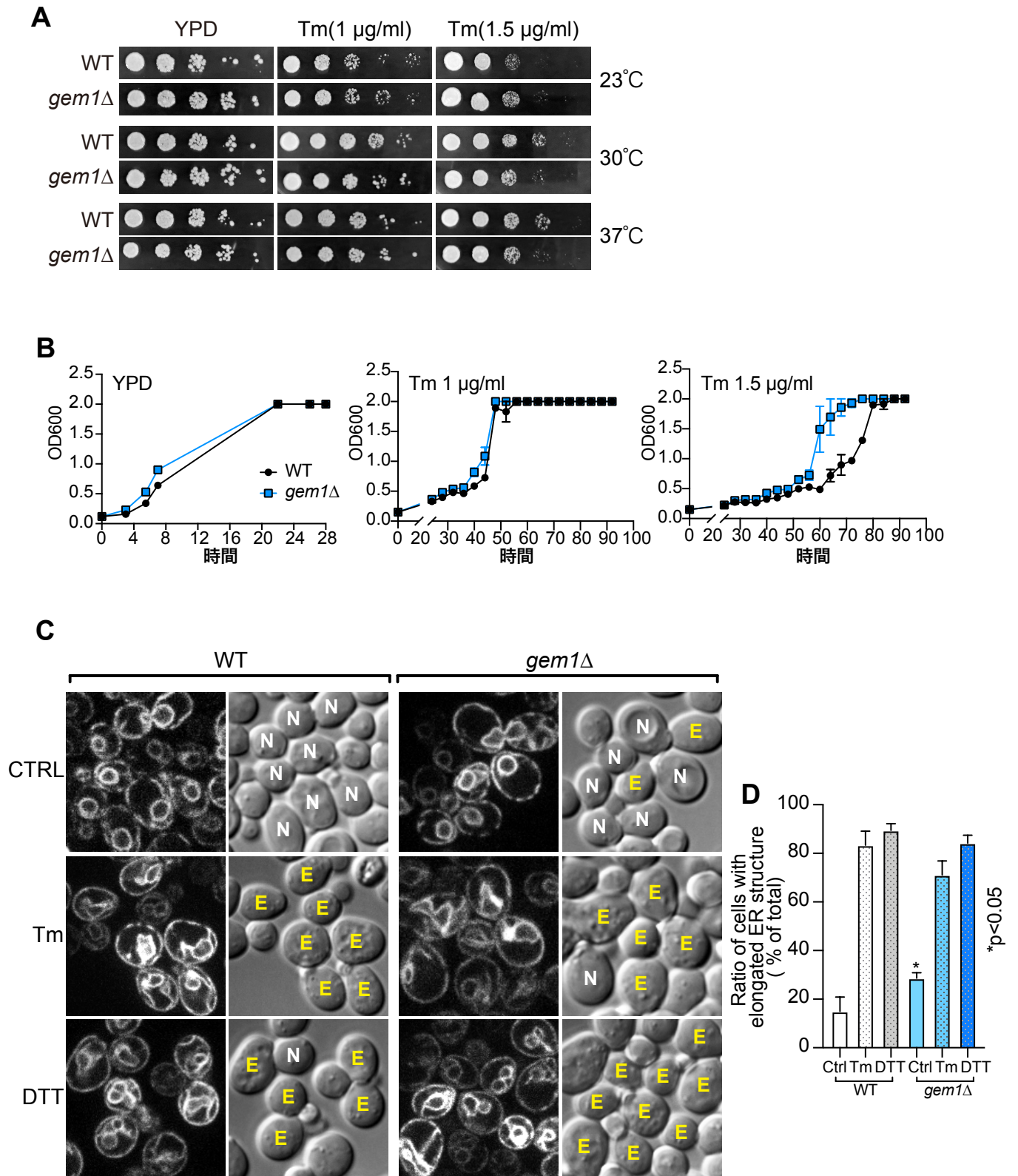
(A) Mmm1 の内腔ドメイン 15~30 残基を欠損した Mmm1-GFP を発現するプラスミドを作製した。  
 (B) (A) で作製した内腔ドメイン欠損 Mmm1-GFP を発現する酵母株を SCD 液体培地、30°C で対数増殖期まで培養し、蛍光顕微鏡で観察した。  
 (C) 内腔ドメインを欠損した Mmm1-GFP を発現する酵母株を、SCD 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。細胞を集菌してウエスタンブロッティングサンプルとして調製した。ERMES 複合体構成タンパク質である Mdm12 抗体や、GFP 抗体、ローディングコントロールとして Tom22 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。矢印で示したバンドは Mmm1-GFP を示した。  
 (D) 内腔ドメインを欠損した Mmm1-GFP を発現する酵母株を YPD 培地で培養し、YPD 寒天培地にシリアルダイリューションした。スポットした培地を 23°C、30°C、37°C で培養した。



**Figure.12 *mmm1-1* は小胞体ストレス時の小胞体の伸長や増殖が抑制される**

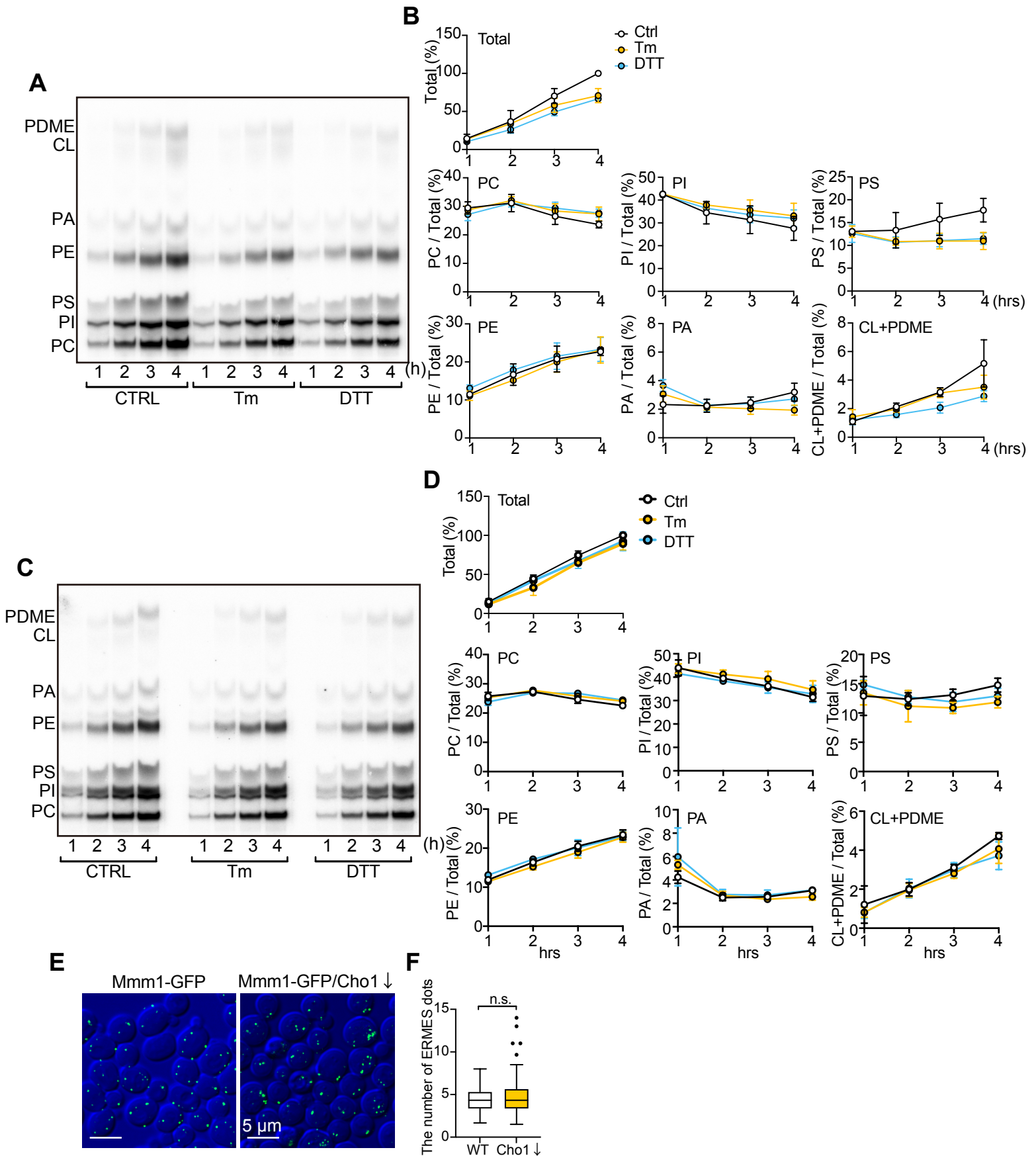
(A) YPH250, *mmm1-1* に Mdm12-GFP を導入し, SCD-Trp 培地で 30°C、23°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1 μg/ml) または DTT (3 mM) 処理を 2 時間行い, 蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5 μm (B) 23°C で培養した YPH250 と *mmm1-1* の一細胞あたりの ERMES ドット数を定量した。YPH250 (Ctrl,Tm,DTT)=246,189,219cells, *mmm1-1*(Ctrl,Tm,DTT)=218,233,176cells 数えた。(C) 野生株, *mmm1-1* に小胞体マーカー pRS316-Sec63-GFP を導入し, SCD-Ura 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1 μg/ml) または DTT (3 mM) 処理を 2 時間行い, 蛍光顕微鏡で観察した。E は小胞体が伸長している細胞を示す。スケールバー 2 μm (D) 小胞体が伸長している細胞の割合を定量した。WT(Ctrl,Tm,DTT)=304,245,177cells, *mmm1-1*(Ctrl,Tm,DTT)=220,200,205cells 数えた (E) YPH250,*mmm1-1* 株を YPD 培地で培養し, YPD 寒天培地と YPD+Tm (1 μg/ml) 寒天培地にシリアルダイリューションした。スポットした培地を 23°C で 6 日間培養した。(F) YPH250,*mmm1-1* 株を YPD 培地で培養した細胞を, 100 ml の YPD 液体培地と YPD+Tm (1 μg/ml) 液体培地に OD=0.1 程度になるように懸濁し, タイムコースで細胞濁度を測定した。





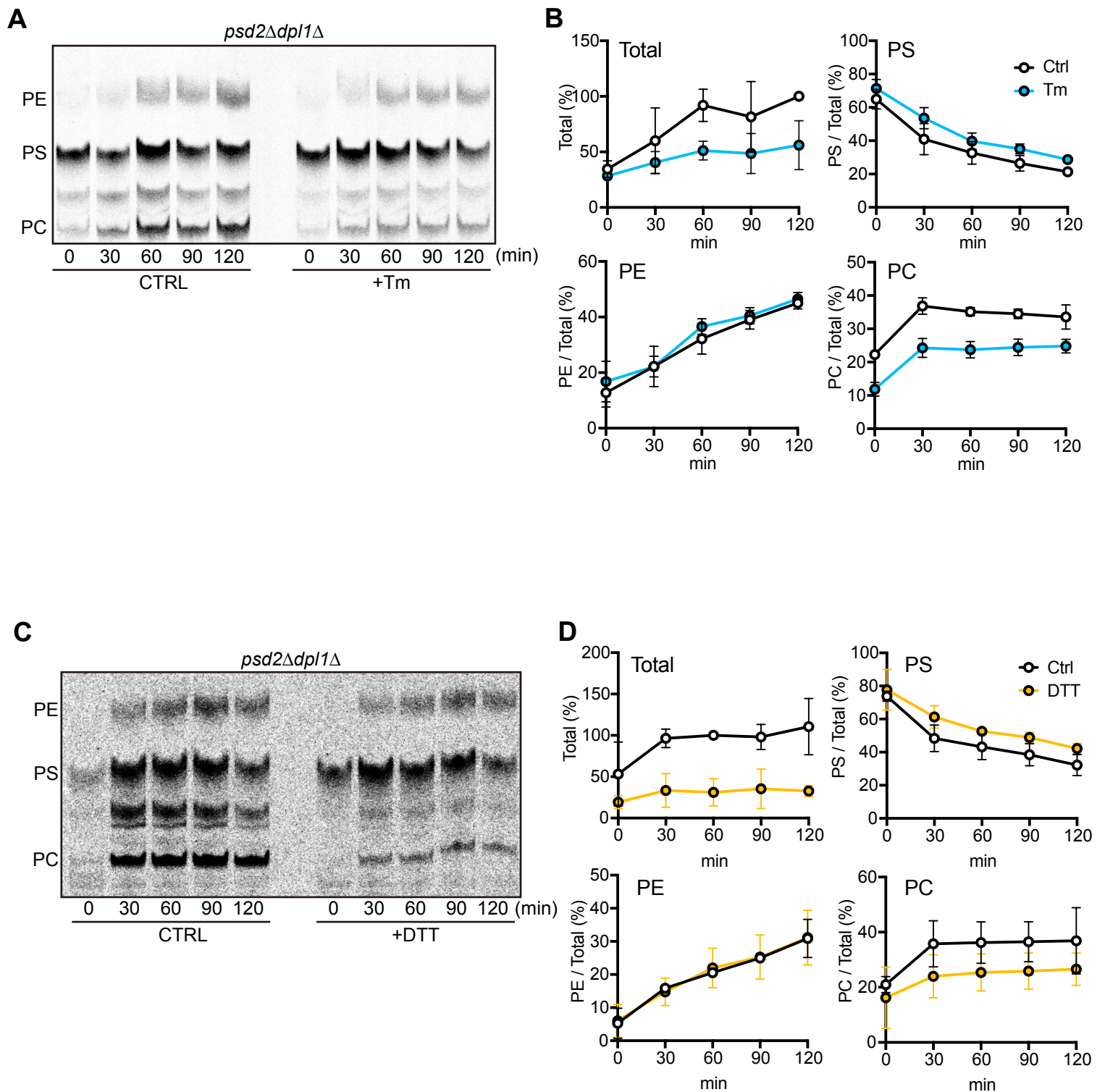
**Figure.13 *gem1* $\Delta$ は小胞体ストレス感受性が弱い**

(A) WT, *gem1* $\Delta$ を YPD 培地で培養し、YPD 寒天培地と YPD+Tm (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 寒天培地にシリアルダイリューションした。スポットした培地を 23~37°C で 6 日間培養した。  
 (B) WT, *gem1* $\Delta$ を YPD 培地で培養した細胞を、100ml の YPD 液体培地と YPD+Tm (1~1.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 液体培地に OD=0.1 程度になるように懸濁し、タイムコースで細胞濁度を測定した。(C) 野生株と *gem1* $\Delta$ に pRS316-Sec63-GFP を導入し、SCD-Ura 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。Tm (1  $\mu\text{g/ml}$ ) または DTT (3 mM) 処理を 2 時間行い、蛍光顕微鏡で観察した。E は小胞体が伸長している細胞を示す。スケールバー 2  $\mu\text{m}$  (D) 小胞体が伸長している細胞の割合を定量した。



**Figure.14** 小胞体ストレス時に PS/Total が減少する

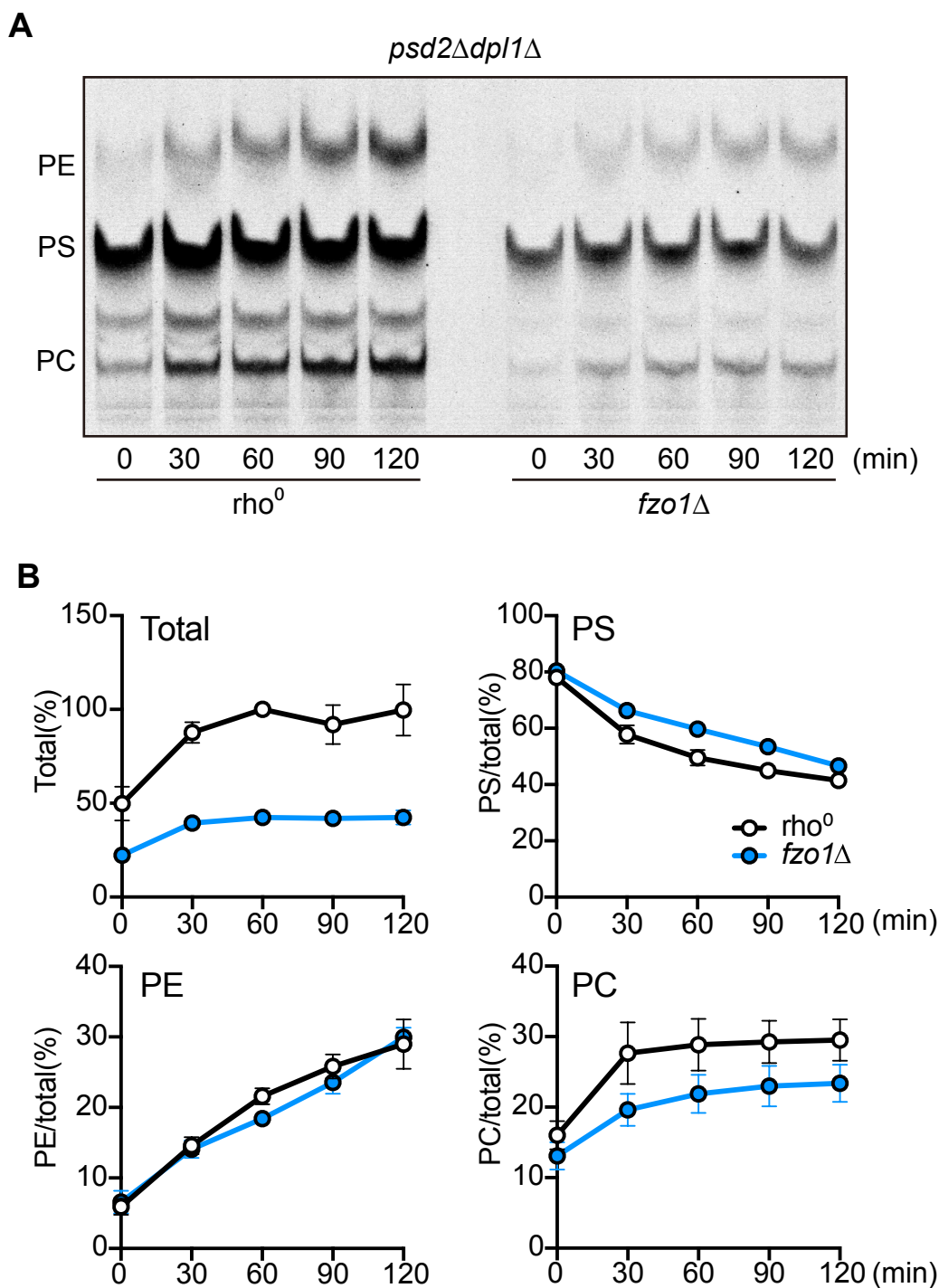
(A) YPH250(C)*mmm1-1* を SCD 培地で 30°C で対数増殖期まで培養し、<sup>32</sup>Pi でリン脂質をラベルした。Tm (1 μg/ml) または DTT (3 mM) を含む培地で培養し、1 時間ごとにリン脂質を抽出し、TLC で展開して検出した。PA はホスファチジン酸、PC はホスファチジルコリン、PE はホスファチジルエタノールアミン、PS はホスファチジルセリン、PI はホスファチジルイノシトール、CL はカルジオリピン、PDME はホスファチジルジメチルエタノールアミンを示す。(B) (D) 各リン脂質 / Total (%) を定量した。(E) *cho1Δ* に Mmm1-GFP pRS316-Galp-Cho1 を導入し、SCD 培地で 30°C で 24 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5 μm (F) 一細胞あたりの ERMES ドット数を定量した。



**Figure.15** 小胞体ストレス時に PE 輸送が遅延する

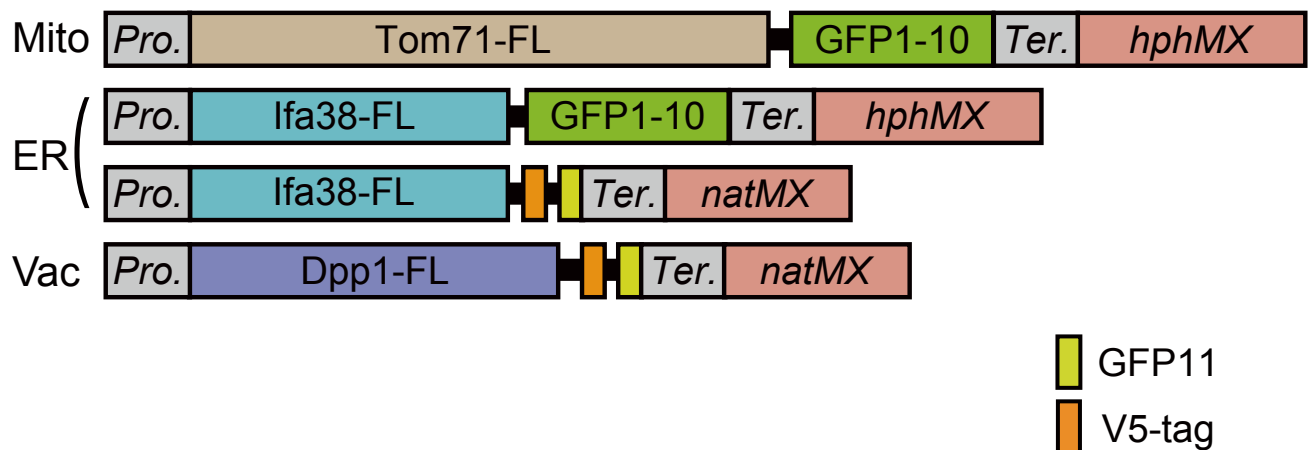
(A) (C) *psd2Δdpl1Δ* を YPD 培地 30°C で OD=1.0 程度まで培養し、Tm (1 μg/ml) または DTT (3 mM) 添加しさらに 2 時間 30°C で培養した。その後 PBS に懸濁し <sup>14</sup>C-Serine を加え 30 分間 30°C で培養した。さらに YPD+Tm 培地に懸濁し 30 分ごとにリン脂質を抽出して TLC 展開を行った。PC はホスファチジルコリン、PE はホスファチジルエタノールアミン、PS はホスファチジルセリンを示す。(B)(D) リン脂質 / Total (%) を定量した。Total は無処理 120 min のリン脂質量を 100 % とした。





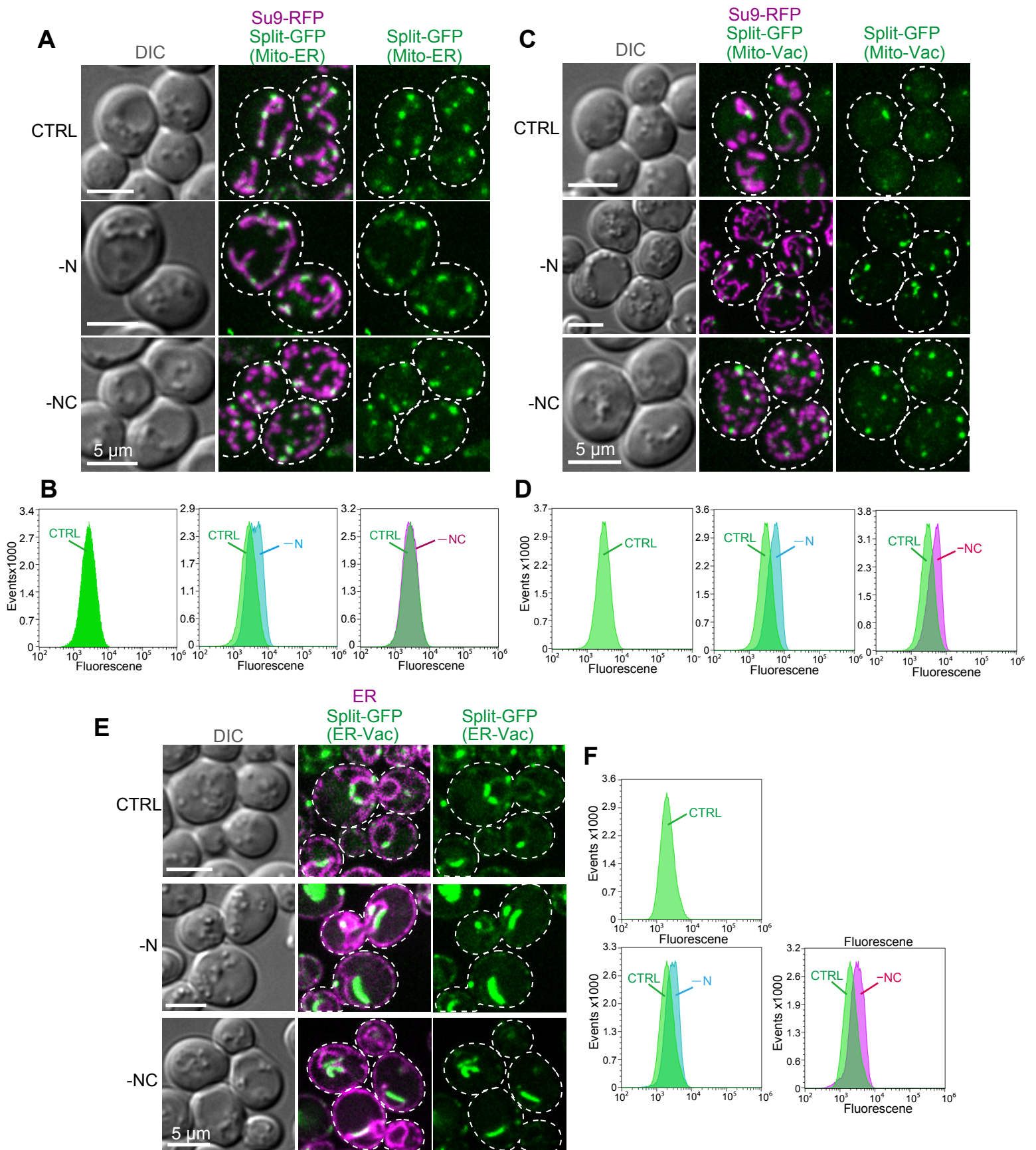
**Figure.16 *fzo1Δ*はミトコンドリアから小胞体へのPE輸送が遅延する**

(A) *psd2Δdpl1Δrho<sup>0</sup>*, *psd2Δdpl1Δfzo1Δ*をYPD培地 30°CでOD=1.0程度まで培養し、その後PBSに懸濁して<sup>14</sup>C-Serineを加えて30分間30°Cで培養した。さらにYPD培地に懸濁し30分ごとにリン脂質を抽出してTLC展開を行った。PCはホスファチジルコリン、PEはホスファチジルエタノールアミン、PSはホスファチジルセリンを示す。(B) リン脂質/Total(%)を定量した。Totalは無処理120minのリン脂質量を100%とした。



**Figure.17** オルガネラ膜タンパク質と Split-GFP の融合タンパク質

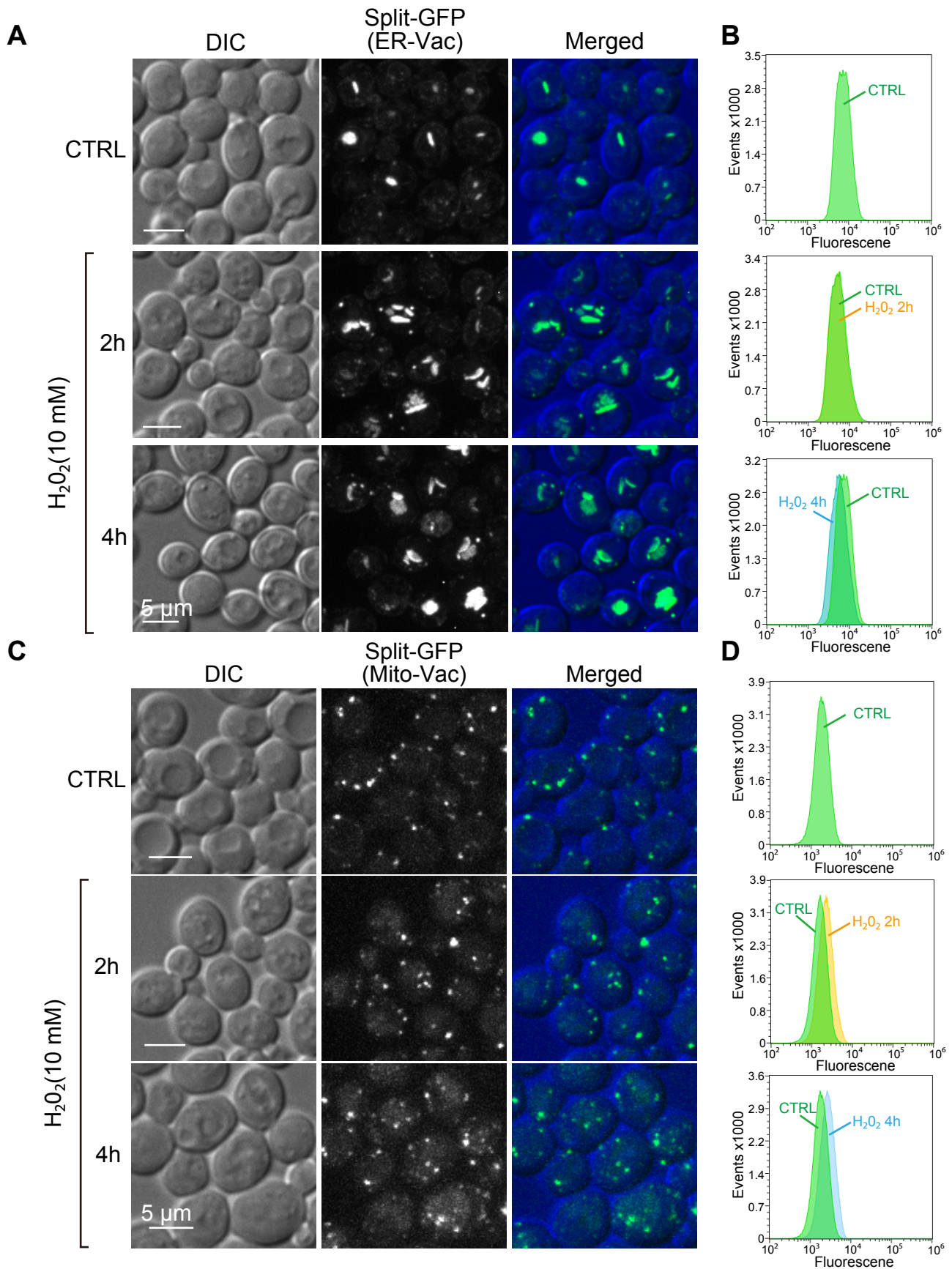
ミトコンドリア (Mito) 外膜に局在する Tom71, 小胞体 (ER) 膜に局在する Ifa38, 液胞 (Vac) 膜に局在する Dpp1 に Split-GFP(1-10) もしくは Split-GFP(11) を融合し、融合タンパク質として発現させた。*Pro.* はプロモーター、*Ter.* はターミネーター配列を示す。



**Figure.18 窒素飢餓条件下におけるオルガネラ間コンタクト**

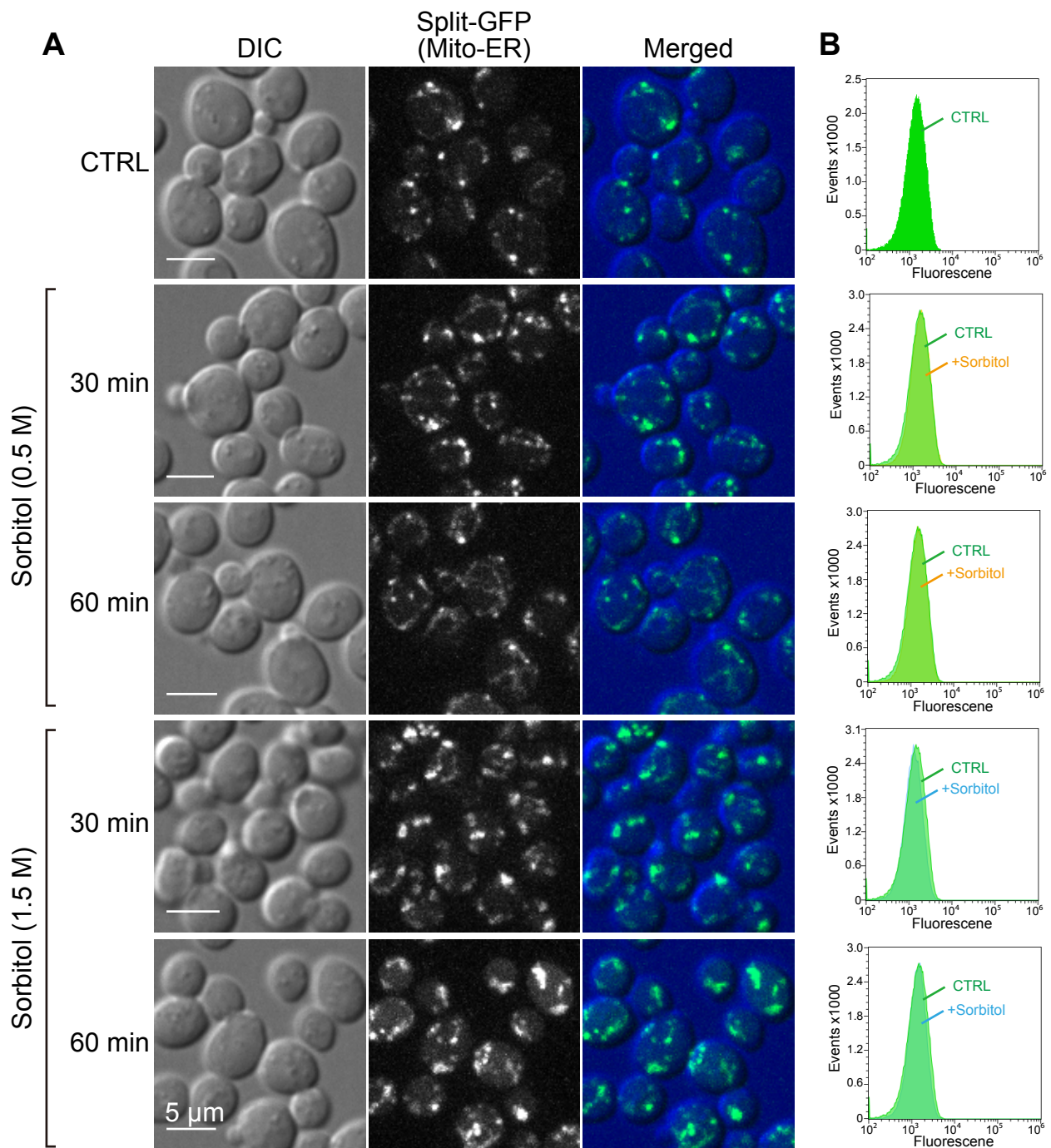
(A) Tom71-GFP1-10 Ifa38-V5-GFP11(C)Tom71-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11(E) Ifa38-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11 を酵母ゲノムに導入し、ミトコンドリアマーカー 316-Su9-RFP もしくは、小胞体マーカー 316-BipN-mCherry を発現する酵母株を SCD-Ura 培地で 30°C で対数増殖期まで培養した。窒素 (-N) もしくはグルコース (-C) を含まない液体培地で 9 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5  $\mu$ m  
 (B) (D)(F) 細胞をセルソーターでソーティングして蛍光強度を測定した。





**Figure.19 酸化ストレス条件下におけるオルガネラ間コンタクト**

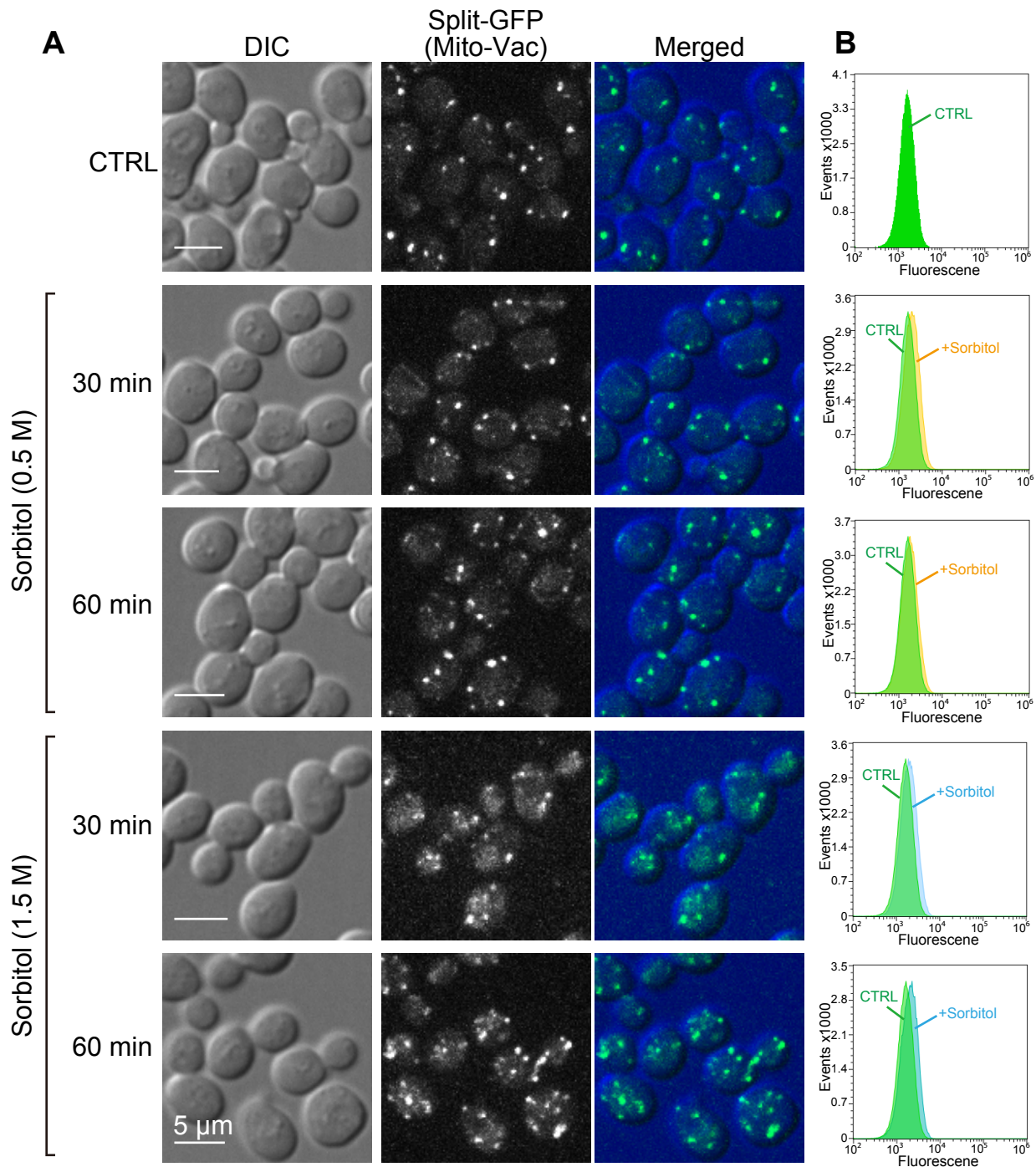
(A) Ifa38-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11(C)Tom71-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11 を酵母ゲノムから発現する酵母株を 30°C で対数増殖期まで培養した。過酸化水素 10 mM を加えて、2~4 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5  $\mu$ m (B) (D) 細胞 (A)(C) をセルソーターでソーティングして蛍光強度を測定した。



**Figure.20 浸透圧ストレス条件下におけるミトコンドリア膜と小胞体膜間コンタクト**

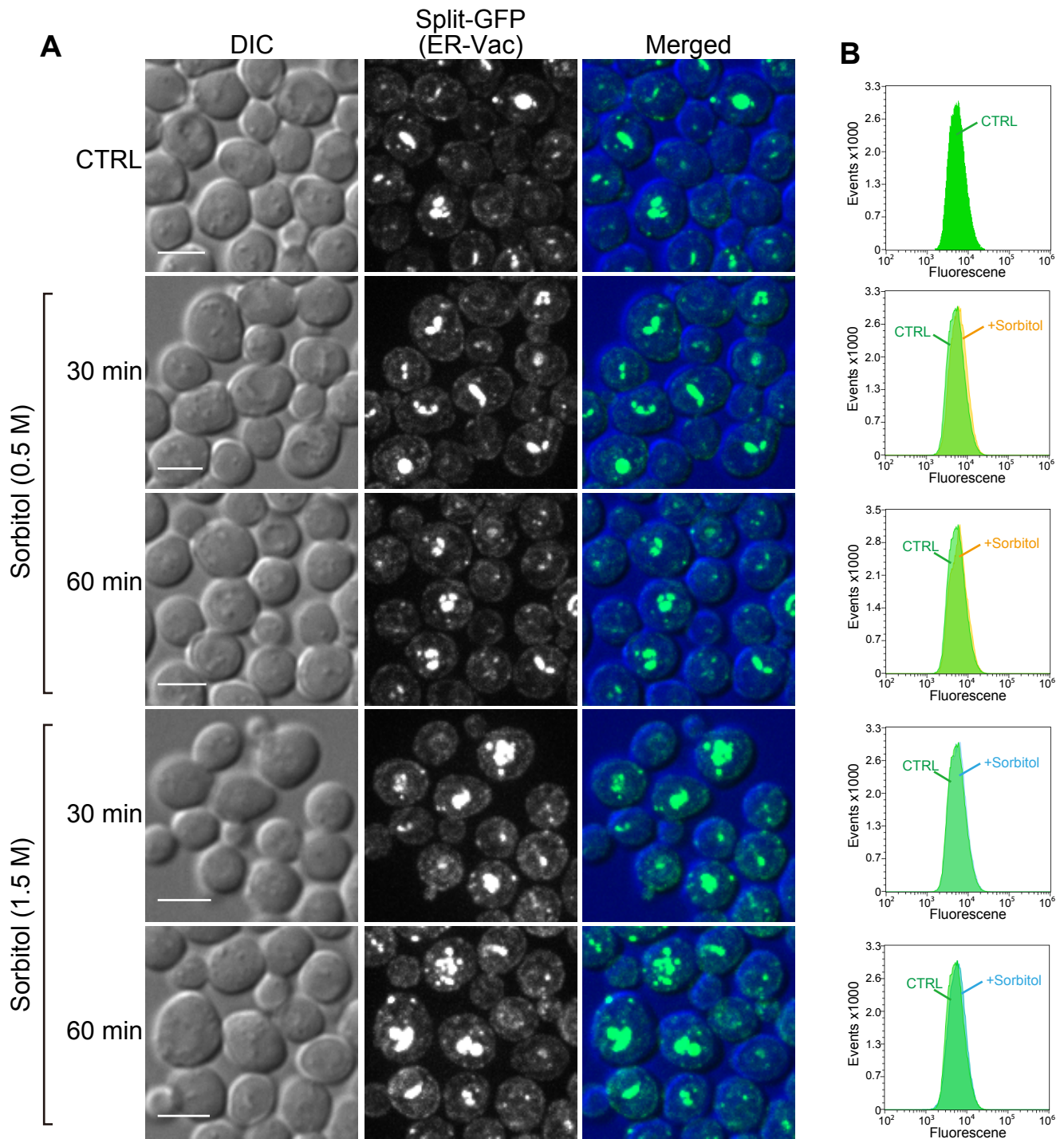
(A) Tom71-GFP1-10 Ifa38-V5-GFP11 を酵母ゲノムから発現する酵母株を 30°Cで対数増殖期まで培養した。ソルビトール(0.5 M or 1.5 M)加えて0.5~1時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5 μm (B) 細胞(A)をセルソーターでソーティングして蛍光強度を測定した。





**Figure.21 浸透圧ストレス条件下におけるミトコンドリア膜と液胞膜間コンタクト**

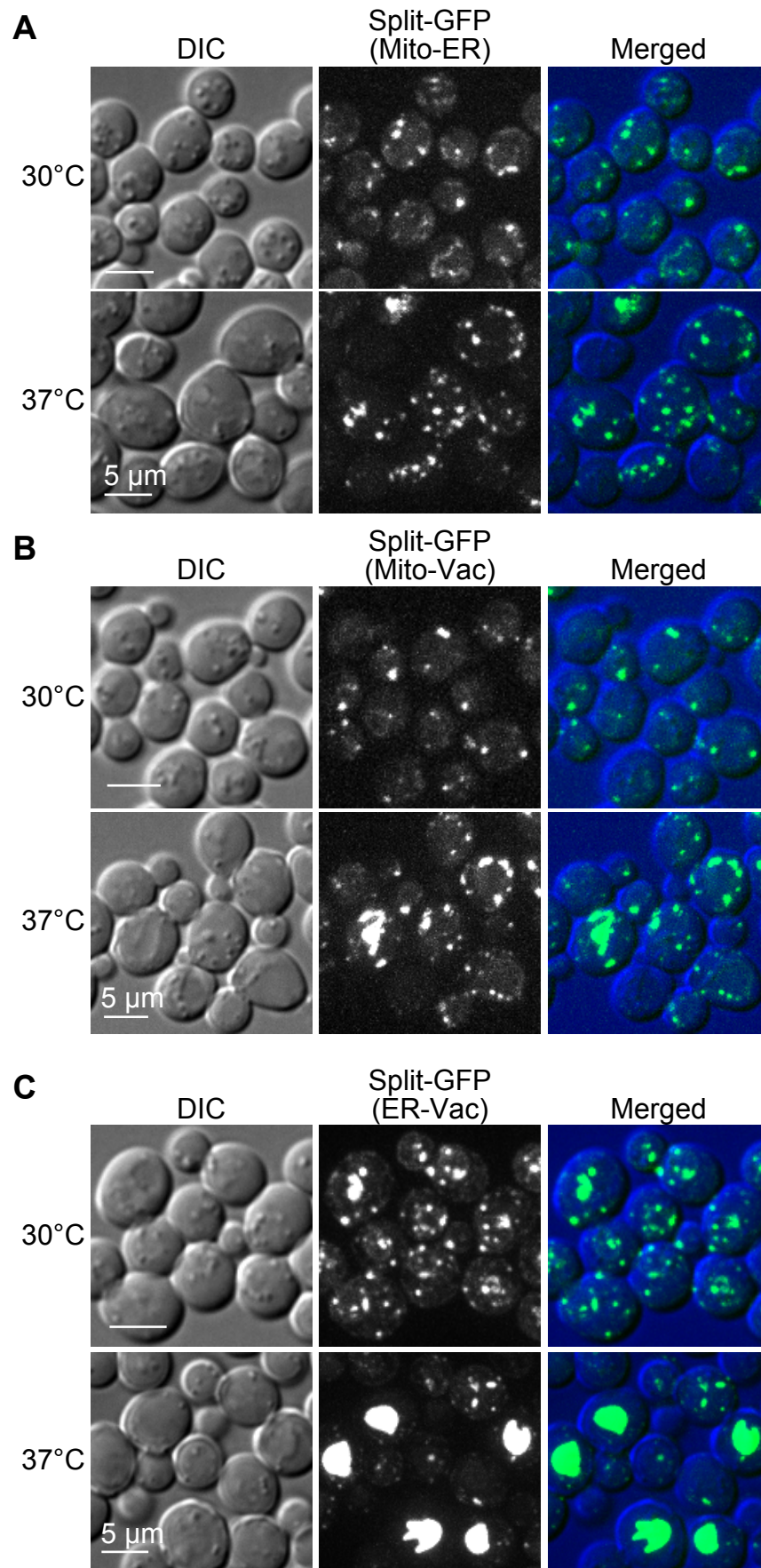
(A) Tom71-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11 を酵母ゲノムから発現する酵母株を 30°C で対数増殖期まで培養した。ソルビトール (0.5 M or 1.5 M) 加えて 0.5~1 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5 μm (B) 細胞 (A) をセルソーターでソーティングして蛍光強度を測定した。



**Figure.22 浸透圧ストレス条件下における小胞体膜と液胞膜間コンタクト**

(A) *Ifa38-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11* を酵母ゲノムから発現する酵母株を 30°C で対数増殖期まで培養した。ソルビトール (0.5 M or 1.5 M) 加えて 0.5~1 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5  $\mu$ m (B) 細胞 (A) をセルソーターでソーティングして蛍光強度を測定した。

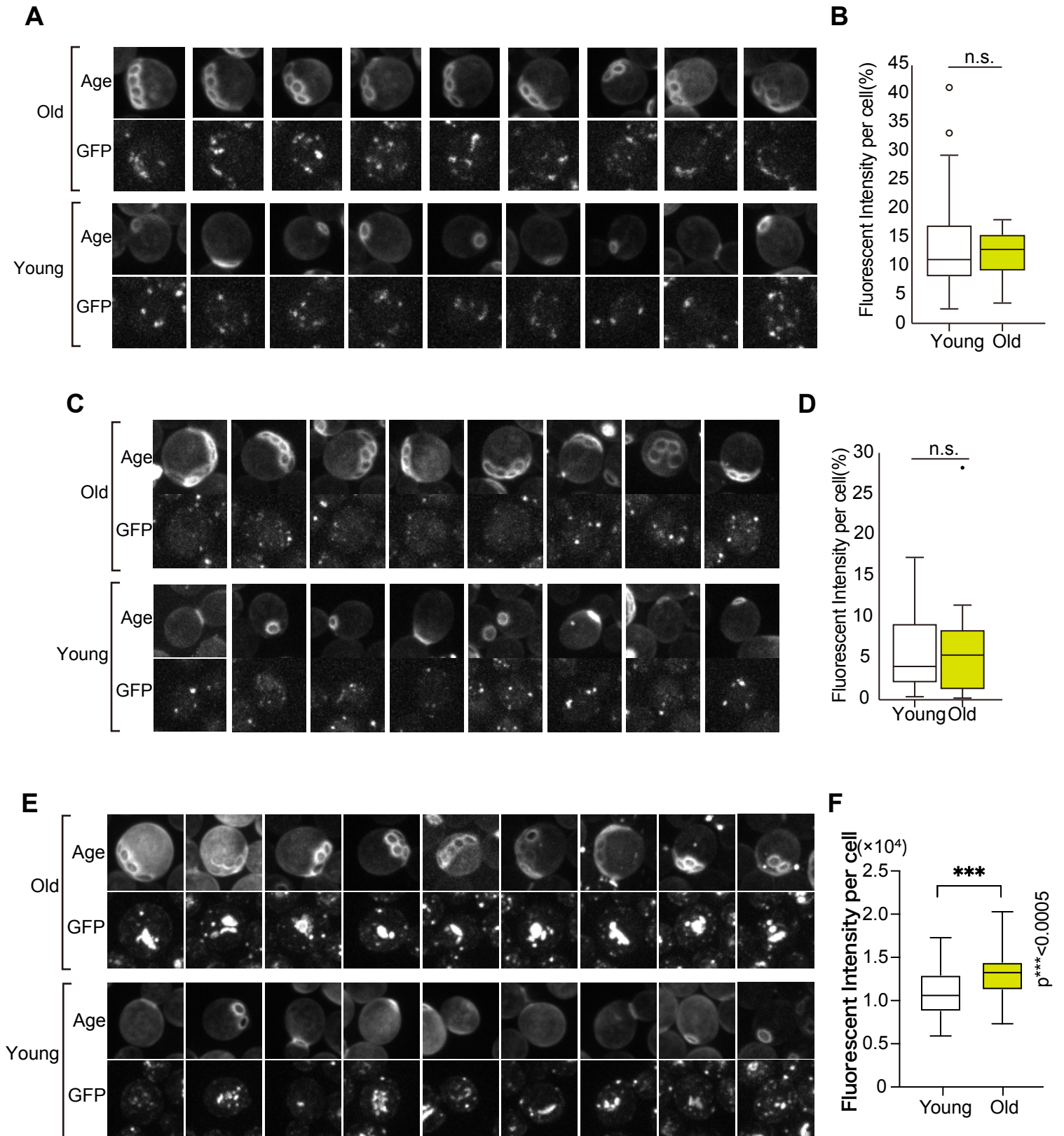




**Figure.23** 高温ストレス条件下におけるオルガネラ間コンタクトサイト

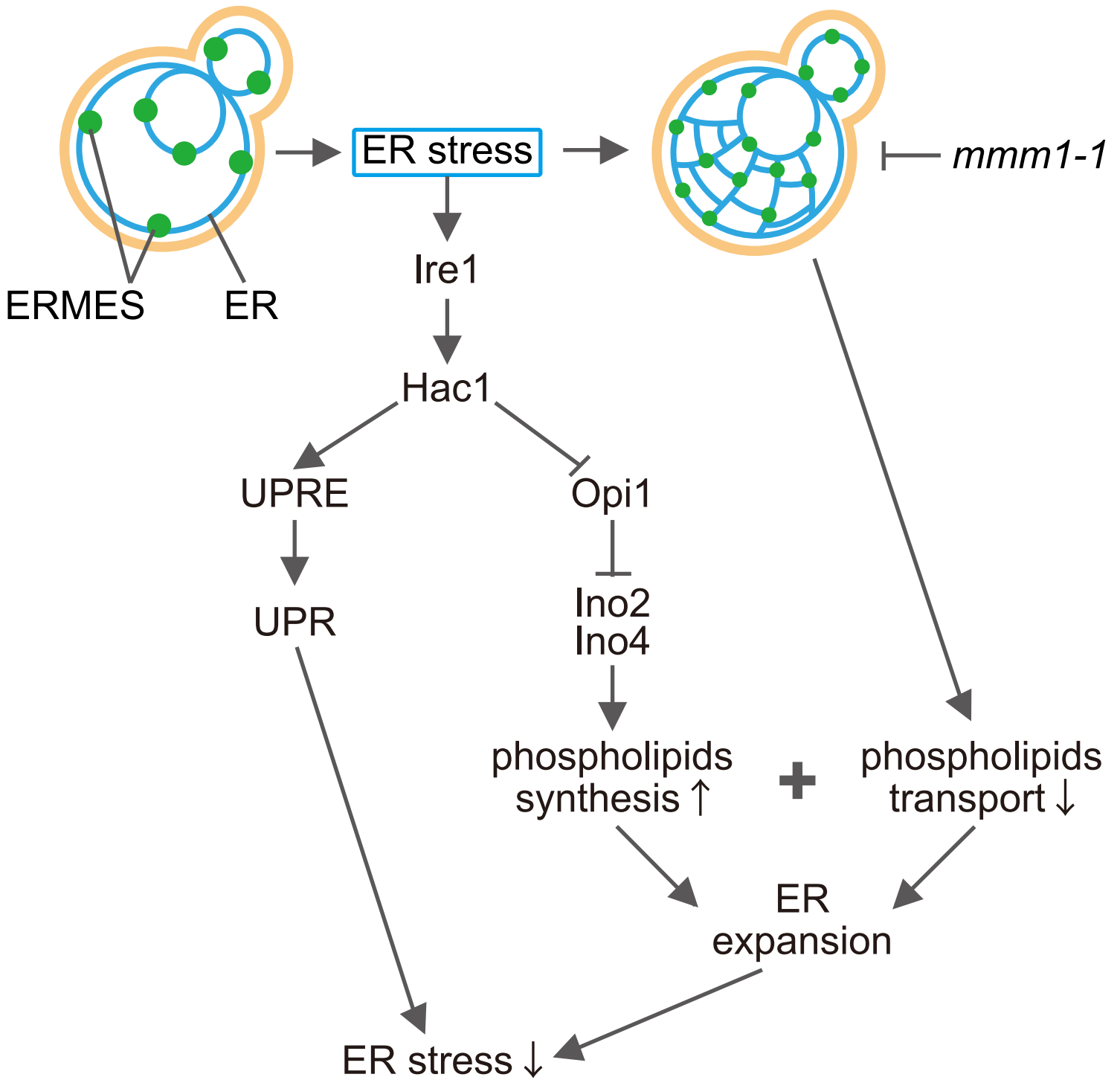
(A) Tom71-GFP1-10 Ifa38-V5-GFP11, (B) Tom71-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11, (C) Ifa38-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11 を酵母ゲノムから発現する酵母株を 30°C, 37°C で 24 時間培養した。その後、細胞を集菌し、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー 5 μm





**Figure.24 老化状態におけるオルガネラ間コンタクト**

(A) Tom71-GFP1-10 Ifa38-V5-GFP11、(C)Tom71-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11、(E) Ifa38-GFP1-10 Dpp1-V5-GFP11 を酵母ゲノムから発現する酵母株を 30°Cで培養した。分裂回数をモニターするため Calcofluor White を加えて 30 分間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。(B) 1 細胞あたりの蛍光強度を定量した。分裂回数 5 回以上の細胞を Old とした。(A)Young = 30 cells, Old= 20 cells、(C)Young = 30 cells, Old= 29cells、(E)Young = 94 cells, Old= 41cells



**Figure.25 ER stress 誘導時の ERMES クラスターの解離は新しい小胞体ストレス応答である**  
 小胞体ストレス時には、ERMES 複合体のクラスター構造が解離し、細胞あたりの ERMES ドット数が増加する。この増加によって、小胞体からミトコンドリアへのリン脂質輸送が阻害され小胞体の伸長に寄与している。ERMES ドット数の増加は、既知の UPR 応答とは独立した現象であり、新しい小胞体ストレス応答であると考えられる。