カルシウムユニポーターによるミトコンドリアカルシウム取り込みの分子機構

山本 武範^{a,b,†}

The Molecular Mechanisms of Mitochondrial Calcium Uptake by Calcium Uniporter

Takenori Yamamoto^{a,b,†}^a*Institute for Genome Research, Tokushima University; 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan; and*^b*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University; 78-1 Shomachi-1, Tokushima 770-8505, Japan.*

(Received August 31, 2020)

Mitochondria play a role as intracellular calcium stores as well as energy conversion functions. Excessive calcium accumulation in mitochondria induces cell death and induces diseases such as ischemia-reperfusion injury. Mitochondrial calcium uptake is considered to be mediated by calcium uniporters, which have attracted much attention as potential drug targets. Although calcium uniporter was shown to function as an ion channel, the molecular mechanisms have long been unclear. In this decade, the molecular composition of the calcium uniporter complex was discovered; the calcium uniporter consists of the 7 subunits. Each subunit has no structural similarity to other Ca ion channels; thus, the novel molecular mechanism of the Ca^{2+} uptake by calcium uniporter is of interest. Although calcium uniporter is conserved in human to warm, yeast lack mitochondrial calcium uptake activity. In the previous study, various subunits of mammalian calcium uniporter were expressed in the yeast mitochondria. As a result, although the expression of each subunit alone did not affect on the mitochondrial calcium uptake activity, the co-expression of mitochondrial calcium uniporter (MCU) and essential MCU regulator (EMRE) enabled to reconstitute calcium uptake activity in yeast mitochondria. This indicated that MCU and EMRE are key factors of the calcium uptake activity in mitochondria. This yeast reconstitution technique has also enabled us to perform detailed structure-function analysis of the MCU and EMRE. In this paper, we will discuss the molecular mechanism of Ca^{2+} uptake and the prospects for drug discovery.

Key words—mitochondria; calcium; ion channel; yeast

1. はじめに

Ca^{2+} は生体内の様々な場面で重要な役割を果たすシグナリングイオンである。その働きは筋収縮や受精に始まり細胞死に至るまで多岐にわたり、“生と死をつかさどるイオン”といえることができる。このため、 Ca^{2+} の細胞内濃度は厳密に制御されている。真核細胞において最も重要な Ca^{2+} レギュレーターの1つはミトコンドリアであり、ミトコンドリアでの Ca^{2+} 動態の異常が虚血再灌流障害、ウルリッヒ型筋ジストロフィー、アルツハイマー病、ハンチントン病などの病態を引き起こすことが明らか

にされている。このため、その創薬標的としても注目が集まっている。しかしながら、ミトコンドリアにおける Ca^{2+} 濃度調節に係わる分子メカニズムは最近までほとんどわかっていなかった。ミトコンドリアによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節機構の中核となるのはミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みを行うカルシウムユニポーターによる単輸送機構である。50年以上にわたり不明であったカルシウムユニポーターを構成する分子群がここ数年の間に続々と同定された。これにより、カルシウムユニポーターはポア形成サブユニットとそれに結合する複数の調節サブユニットによって構成されることがわかってきた。関連分子の同定により、この複合体がどのように Ca^{2+} を取り込んでいるのか、さらにはなぜその取り込み機構が細胞や多くの器官の機能に重要なのか、といったより深い疑問に対してアプローチが可能になった。本稿では、われわれがこれまでに明らかにした知見やここ1–2年の立体構造をめぐる混乱

^a徳島大学先端酵素学研究所 (〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15), ^b徳島大学大学院薬科学教育部 (〒770-8505 徳島市庄町 1 丁目 78-1)

現所属: [†]国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部 (〒210-9501 川崎市川崎区殿町 3-25-26)

e-mail: tyamamoto@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第140年会シンポジウム S09 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. The Subunits of the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex, and the Physiological Roles in Mitochondrial Calcium Uptake

(Color figure can be accessed in the online version.)

を踏まえながら、カルシウムユニポーターが Ca^{2+} を取り込む分子機構を中心に最新の動向を紹介するとともに、カルシウムユニポーターを標的とする創薬への展望を議論する。

2. ミトコンドリアカルシウムユニポーター

ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みに関する研究は、1960 年代に複数の研究グループが動物組織から高純度に精製したミトコンドリアが Ca^{2+} を取り込み内部に保持する性質を持つことを報告したことに端を発する。¹⁾ この Ca^{2+} の取り込みは一部の真菌を除く広い生物種のミトコンドリアで観察され、進化の過程を通じたその重要性が認識されてきた。その後、この取り込みはミトコンドリア内膜を介した膜電位を駆動力として起こること、他の陰イオンや陽イオンとの交換を必要としないことが示され、この輸送を担保する分子は“カルシウムユニポーター”と呼ばれるようになった (Fig. 1)。²⁾ カルシウムユニポーターはミトコンドリア外の Ca^{2+} 濃度が低いときには Ca^{2+} 取り込み活性を示さず、ミトコンドリア外 Ca^{2+} 濃度が高い ($> 10 \mu\text{M}$) と取り込み活性を示す、というユニークな性質を持ち、このシグモイド型の Ca^{2+} 応答性から複数のサブユニットタンパク質によって構成されると当初から考えられていた。2004 年、Kirichok らのミトコンドリア膜に対する電気生理学的解析から、高い Ca^{2+} 選択性を持つコンダクタンスが確認されたことにより、³⁾ こ

のカルシウムユニポーターがチャネル性の輸送様式を持つことが明らかにされた。しかしながら、この Ca^{2+} 取り込みに係わる分子は依然不明のままであった。

カルシウムユニポーターの生理的役割に関しては古くから多くの報告がなされている。1980 年代には、カルシウムユニポーターを介してミトコンドリアのマトリックス内に取り込まれた Ca^{2+} がマトリックス内に存在する 3 種類のデヒドロゲナーゼを活性化して代謝調節に係わることが報告された。⁴⁾ その後、カルシウムユニポーターは細胞質のカルシウムウェーブ (Ca^{2+} 濃度上昇の伝播) に影響を与えることも明らかにされた。⁵⁾ さらに、カルシウムユニポーターを介してミトコンドリア内に過剰な Ca^{2+} が取り込まれた場合には、ミトコンドリア内膜の物質透過性が上昇する現象 (透過性遷移) が誘起され、これが細胞死の引き金を引くこともわかった。⁶⁾ 透過性遷移は虚血再灌流障害、ウルリッヒ型

山本武範

2007 年徳島大学大学院薬科学教育部博士後期課程を修了、同大学の (現) 先端酵素学研究所の助教、2013 年より講師を経て、2019 年より国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官 (徳島大学・先端酵素学研究所・客員教授)、ミトコンドリアのカルシウム取り込みの制御機構とその疾患との係わりなどについて研究している。

筋ジストロフィー、アルツハイマー病、ハンチントン病を始めとする疾患の原因とされ、カルシウムユニポーターはこれらの疾患の治療標的として注目されている。

3. カルシウムユニポーターによる Ca^{2+} 取り込みの分子機構

カルシウムユニポーターの生理的な役割に関する研究が進展する一方で、カルシウムユニポーター自体が Ca^{2+} を取り込む分子機構の理解は 50 年以上の間停滞していた。状況が進展する契機となったのは、ミトコンドリアを構成するタンパク質のデータベース MitoCarta (2008 年) の公開であった。MitoCarta を基に、2010 年 Harvard 大学の Mootha らのグループは、ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み能を持たない酵母と Ca^{2+} 取り込み能を持つトリパノソーマの間でミトコンドリアを構成するタンパク質群を比較することにより、mitochondrial calcium uptake 1 (MICU1) を同定した。⁷⁾ この MICU1 の同定を皮切りに、mitochondrial calcium uniporter (MCU),^{8,9)} またそれらのパラログである、MICU2,¹⁰⁾ MICU3,¹⁰⁾ MCUB,¹¹⁾ さらに、2012 年には mitochondrial calcium uniporter regulator 1 (MCUR1),¹²⁾ 2013 年には essential MCU regulatory element (EMRE) といった関連分子が次々と同定された。¹³⁾ これらの中で脳選択的に存在する MICU3 以外のすべてのサブユニットは全身に分布している。現在、カルシウムユニポーターは 6-7 種のサブユニットで構成された複合体チャネルとして機能していると考えられている (Fig. 1)。これまでに、MCU がオリゴマー化してチャネル孔を形成し、他のサブユニットがそのチャネル孔の開閉を調節していると考えられているが、個々のサブユニットの機能に関してはいまだ不明な点が多く残されている。これらの分子群には生体内に存在する既知のカルシウムイオンチャネルとの構造的な類似性が認められないことから、カルシウムユニポーターは新しいカテゴリーのカルシウムイオンチャネルであり、その構造機能相関に興味を持たれる。また、欧州では MICU1 に点変異を持つ家系において遺伝性心筋症が認められることが報告され、ミトコンドリアカルシウム取り込みと疾患との係わりが分子レベルで明らかにされ始めている。¹⁴⁾

4. Ca^{2+} 取り込みに必要なサブユニットの最小単位の決定

これまでにミトコンドリア Ca^{2+} 取り込みに係わる 7 つのサブユニットが同定されたものの、 Ca^{2+} 取り込みに必要なサブユニットはどれか? という疑問は残されたままだった。そこでまず、研究の焦点を絞るために、われわれはこの疑問に解答を得ることを試みた。

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

このような考えの下、われわれは酵母にマウスのカルシウムユニポーターのサブユニットを発現させ、ミトコンドリアに Ca^{2+} 取り込み活性が認められるかを調べた。その結果、MCU を始めとする各サブユニットはいずれも単独で発現させても Ca^{2+} 取り込み活性を示さず、当時はコンセプトが間違っているのかと不安になったが、その後発見されたサブユニットについてすべての組み合わせで共発現実験を行ったところ、MCU と EMRE を共発現させた場合にのみ顕著な Ca^{2+} 取り込み活性を示すことが明らかになった (Fig. 2)。このことは、既知の 7 つのサブユニットの中で、MCU と EMRE の 2 つが Ca^{2+} 取り込みを行う最小単位であることを示している。¹⁵⁾ また、これによりこの 2 つのサブユニット

Fig. 2. Relative Calcium Uptake of the Yeast Mitochondria with Mammalian Calcium Uniporter Subunit (s)

The activities of calcium uptake in the mitochondria isolated from yeast with mammalian calcium uniporter subunit (s) were compared. As a positive control, the activities of calcium uptake in the mitochondria isolated from wild-type yeast treated by a calcium ionophore, ETH129, was examined. (Color figure can be accessed in the online version.)

に対する詳細な構造機能解析への道が拓かれた。

5. ミトコンドリア Ca^{2+} 取り込みにおける EMRE の役割

これまでの知見から、MCU はチャネル孔を形成することが示唆されている。しかしながら、EMRE はロックアウトした場合に Ca^{2+} 取り込み機能が消失することがわかっていたのみで具体的な役割は不明であった。そこでわれわれは、まず EMRE に焦点をあて、酵母発現系を使ってその構造と機能を調べた。¹⁵⁾

5-1. EMRE の構造機能解析 まず、EMRE がミトコンドリアでの MCU のタンパク質安定性に寄与する可能性について検討した。その結果、MCU を単独で発現させた場合と EMRE と共発現させた場合とで、ミトコンドリアでの MCU の存在量は変化しなかった。したがって、EMRE は MCU のタンパク質安定性に寄与する因子ではないと考えられた。

一般に、イオンチャネルに存在するいくつかの酸性アミノ酸が、基質となる陽イオンの集積や結合に

寄与する。そこで、種間でよく保存された EMRE の酸性アミノ酸について変異体を構築し、 Ca^{2+} 取り込みに及ぼす影響を調べた。その結果、いずれの変異体を発現させたミトコンドリアも野生型 EMRE と同等の Ca^{2+} 取り込み活性を示した。このことは、EMRE は直接 Ca^{2+} と結合して Ca^{2+} 取り込みに寄与するのではないことを示唆している。一方で、酸性アミノ酸以外についても、様々な変異体を構築して解析を行ったところ、Pro60 の変異体 (P60A) と Ser85-Asn90 を欠損した変異体 (Δ 85-90) では、 Ca^{2+} 取り込みがまったく観察されなくなることがわかった [Fig. 3 (A)]。

5-2. EMRE と MCU の相互作用の重要性

P60A や Δ 85-90 ではなぜ機能が消失したのであろうか？ EMRE は MCU と相互作用するタンパク質として同定されたので、機能を失った EMRE 変異体と MCU との相互作用に影響がないか免疫沈降法により調べた。その結果、P60A と Δ 85-90 はいずれも MCU と相互作用しないことが明らかになった。この結果から、ミトコンドリアへの Ca^{2+} の取り込みには EMRE と MCU の相互作用が必須であり、その相互作用には EMRE のマトリックス側に位置する Pro60 と細胞質側に位置する Ser85-Asn90 が関与することがわかった [Fig. 3 (B)]。EMRE は 1 回膜貫通型タンパク質であり、Pro60 は EMRE のマトリックス側に位置し、Ser85-Asn90 は細胞質側に位置している [Fig. 3 (C)]。このことから、EMRE と MCU は内膜を介した両側で相互作用していることが示唆される。この両者の密接な相互作用様式から、われわれは EMRE は MCU が形成するチャネル孔を“開孔状態に固定する構造因子”として機能していると考えられると結論した [Fig. 3 (D)]。

つい最近、クライオ電子顕微鏡により、ヒトの MCU と EMRE の複合体の立体構造が解明された。¹⁶⁾ この構造の中で、EMRE は、筆者らが生化学的な解析から予想した通り、開孔状態を固定するように MCU の形成するチャネル孔に相互作用して存在していることが明らかになった。

6. 構造機能解析から明らかになった MCU における Ca^{2+} 取り込みの調節機構

6-1. MCU のコイルドコイルドメインの機能的な重要性 カルシウムユニポーターのチャネル孔

Fig. 3. Functional Analysis of EMRE Using Yeast Expression System

(A) Identification of amino acid regions in mouse EMRE critical for Ca^{2+} uptake. The activities of calcium uptake of the mitochondria isolated from the yeast with various mouse EMRE mutants were investigated; the relative Ca^{2+} uptake activities were shown in the histograms. (B) Identification of amino acid regions in the interaction between EMRE and MCU by immunoprecipitation of MCU and EMRE mutants with FLAG antibody. Mitochondria from yeast with MYC-tagged EMRE mutants with or without FLAG-tagged MCU were lysed (Lysate) and then subjected to immunoprecipitation by FLAG antibody conjugated to agarose gel; and the precipitant fractions (IP) were analyzed by immunoblotting. PiC (mitochondrial phosphate carrier) was used as loading controls for mitochondria. (C) The amino acid residue(s) playing an important role in the functions of EMRE. (D) Functional model of the roles of EMRE in mitochondrial calcium uptake. (Color figure can be accessed in the online version.)

を形成するサブユニットである MCU に関してはこれまで最も精力的に研究が進められてきた。MCU は生物種間で広く保存されているが、2つの膜貫通領域 (TM1 と TM2) とその間に Asp と Glu で構成された DXXE モチーフ、さらに2つの膜貫通領域を挟むようにコイルドコイルドメイン (CC1 と CC2) を有している [Fig. 4 (A)].¹⁷⁾ これまでの研究から、DXXE モチーフがイオンチャネルに必須な構造である Ca^{2+} 選択性フィルターとして機能することが明らかにされた。しかし、DXXE モチーフ以外のドメインの機能や、 Ca^{2+} が細胞質側の DXXE モチーフによって選別された後、どのよう

に内膜中やマトリックスに位置するドメインを通過してマトリックス内に流入するのはいまだ不明であった。われわれは、先に確立した酵母再構成系を使って、MCU の持つ種々のドメインに対する構造機能解析を行った。

まず、マウス MCU の種々のアミノ酸領域を欠損させた変異体を EMRE とともに酵母に発現させ、ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み活性を調べた。その結果、2つのコイルドコイルドメイン (CC1 及び CC2) をそれぞれ欠損させた場合に Ca^{2+} 取り込み機能が消失することが分かった [Figs. 4 (B) and (C)]. そこで、CC1 と CC2 におけるコイルドコイ

Fig. 4. Identification of Amino Acid Regions in Mouse MCU Critical for Ca^{2+} Uptake

(A) Domains/motifs and topology in mitochondrial inner membrane (IM) of mouse MCU. NTD, N-terminal domain; CC, coiled-coil domain; TM, trans-membrane region. (B) Schematic representation of full-length MCU and its deletion mutants, showing predicted domains and motif. (C) The activities of calcium uptake in the mitochondria isolated from yeast with each MCU deletion mutant were compared. (Color figure can be accessed in the online version.)

ル構造の形成が Ca^{2+} 取り込み機能に必要なのかを調べるために、コイルドコイル構造の形成を阻害する点変異を CC1 又は CC2 に導入したところ、いずれも Ca^{2+} 取り込み機能が消失した。このことから、 Ca^{2+} 取り込みには MCU の CC1 と CC2 がそれぞれコイルドコイル構造を形成することが必要であることが示唆された。続いて、なぜ MCU のコイルドコイル構造が Ca^{2+} 取り込みに必要なのかを調べた。過去に、MCU は調節サブユニットである MCUR1 及び EMRE と相互作用することが報告されている。しかしながら、われわれの解析から、両ドメインの機能的重要性に MCUR1 や EMRE は無関係なことが分かった。このことから、MCU の CC1 と CC2 は調節サブユニットとコイルドコイル構造を形成するのではなく、CC1 と CC2 の間でコイルドコイル構造を形成し、その構造が MCU のチャネル孔形成に重要であることを示唆していた。¹⁸⁾

6-2. MCU の立体構造からみたコイルドコイル構造の機能的役割 この 2 年間に、MCU の立体構造が複数のグループにより相ついで報告された。Oxenoid らは N 末端ドメインを欠損させた線虫

MCU の立体構造を NMR で解析したところ、5 量体でチャネル孔を形成していた。¹⁹⁾ しかし、この構造モデルにおいて、コイルドコイルドメインは 5 本の CC2 が 1 本の超らせん構造を形成する pentameric coiled coil を形成しており、CC1 はコイルドコイル構造をとらない状態で CC2 の pentameric coiled coil の周囲に存在していた。われわれの生化学的な研究からは CC1 も CC2 もコイルドコイル構造をとっていることが示されており、5 量体モデルはわれわれの結果を反映していなかった。混乱した状況がしばらく続いたが、その 2 年後、4 つの独立した研究グループから N 末端ドメインを含む真菌 MCU の立体構造が報告された。²⁰⁻²³⁾ これら 4 つの報告では、一転、いずれの MCU も 4 量体としてチャネル孔を構成していた。また、これらの構造中では 2 つのコイルドコイルドメイン CC1 と CC2 がアンチパラレルに配向してコイルドコイル構造を形成していた。この MCU4 量体の構造的な特徴はわれわれの生化学的知見と一致していた。さらに、われわれはこの真菌 MCU の立体構造を基に、マウス MCU の立体構造モデルを構築し、これまでの獲得した生化学的解析の結果と照合を行った。その結

Fig. 5. Coiled-coil Structure in Mouse MCU Model

(Left) whole view of mouse MCU model based on the structure of *C. europaea* MCU determined by using SWISS MODEL. (Middle) and (Right) Close-up views of the coiled-coil structure. The hydrophobic amino-acid residues located at the position where CC1 and CC2 were the closest to one another are shown in orange. (Color figure can be accessed in the online version.)

Fig. 6. Functional Model of Coiled-coil Domains of MCU

(Left) Structural model of mouse MCU. (Middle) there is ample space possible for Ca^{2+} to diffuse between the transmembrane region and coiled-coil domain; thus, Ca^{2+} which has passed the Ca^{2+} selective filter is considered to mainly enter into matrix through this space. (Right) when the formation of the coiled coil is inhibited by the deletion and point mutation, the space for Ca^{2+} diffusion would become narrow, as in the case of an umbrella that is closed, resulting in a probable decrease in Ca^{2+} uptake activity. (Color figure can be accessed in the online version.)

果、点変異解析で活性が消失した6つのアミノ酸残基はすべてコイルドコイル構造を形成する2本の α ヘリックスの接合点に位置していることが確認された (Fig. 5). このことから、筆者らは、ミトコンドリア内膜上でMCUのとっている構造に関して、少なくとも Ca^{2+} 取り込みを行っている状態のMCUの場合には、4量体構造モデルが生理的な構造を反映していると考えている。線虫MCUが5量体として観察された理由は不明であるが、MCUが

コンフォメーションを変化させる可能性、N末端ドメインの欠損による影響の可能性などが議論されている。

マウスの立体構造モデルから、MCU4量体のミトコンドリア内部に露出した領域の中ほどに空洞が観察され、ミトコンドリア外からイオン選択性フィルターを透過して侵入した Ca^{2+} はチャンネル内腔からこの空洞を通してミトコンドリア内腔に拡散することが示唆された (われわれはこの空洞を Ca^{2+} -

diffusion space と呼ぶ)。CC1 と CC2 が相互作用して形成されるコイルドコイル構造はあたかも開いた傘の骨組みを止めるストッパーの位置に当たり、チャンネルの出口に当たる Ca^{2+} -diffusion space を広げる役割を果たしていることが推測される (Fig. 6).¹⁸⁾ 他のイオンチャンネルのコイルドコイル構造が機能に果たす役割の知見を基に考えると、MCU のコイルドコイル構造はチャンネル孔の開閉を調節するスイッチとして機能している可能性も考えられる。その場合、このコイルドコイルドメインはミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みを制御する創薬を考える上での有望な標的部位となり得ると考えられ、現在このコイルドコイル構造を標的とした阻害ペプチドの開発に向けた取り組みを開始している。

7. おわりに

本稿では、筆者らが構築した酵母のミトコンドリアに哺乳類のタンパク質を再構成するというユニークな方法によって、MCU におけるカルシウムチャンネル孔開閉の調節機能、及びそれを制御する EMRE の役割を明らかにした。この酵母再構成技術は既に MCU 阻害剤の大規模スクリーニングにも利用されており、²⁴⁾ 今後の創薬開発への応用が期待される。近年のクライオ電子顕微鏡を始めとする立体構造解析の技術革新もあり、MCU がどのように Ca^{2+} を選択的にミトコンドリアの中に透過させるのか、EMRE がどのように Ca^{2+} 透過に係わるのか、という大きな命題に対しては多方面から知見が集積されつつある。一方で、実際にミトコンドリア膜上で、MCU に EMRE が何分子結合しているのか (化学量論比) という問題やアクセサリサブユニットの機能的役割については更なる研究が必要である。また、組織によってミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み活性が異なるメカニズムなど興味深い課題はいまだ残されたままである。今後も、カルシウムユニporter による Ca^{2+} 輸送を制御する分子機構を明らかにしていくことにより、ミトコンドリアのカルシウム取り込みを起点とする種々の疾患に対する新たな治療薬の開発につながることが期待される。

謝辞 本研究を進めるにあたり協力頂いた、徳島大学先端酵素学研究所・篠原康雄教授、京都大学大学院薬学研究科・矢野義明講師、日本大学歯学部・山本 (山田) 安希子助教に感謝いたします。ま

た、故・寺田 弘 新潟薬科大学学長に感謝の意を表するとともに冥福をお祈りいたします。また、山越亮平博士を始め、ともに本研究を進めて頂いた徳島大学・先端酵素学研究所・蛋白質発現分野の学生諸氏に心より感謝の意を表します。文部科学省科学研究費補助金基盤研究 C、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、興和生命科学振興財団、武田科学振興財団にご支援を頂きました。ここに感謝の意を表します。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Deluca H. F., Engstrom G. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1744–1750 (1961).
- 2) Gunter T. E., Pfeiffer D. R., *Am. J. Physiol.*, **258**, C755–C786 (1990).
- 3) Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D. E., *Nature*, **427**, 360–364 (2004).
- 4) Denton R. M., McCormack J. G., *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 266–268 (1980).
- 5) Jouaville L. S., Ichas F., Holmuhamedov E. L., Camacho P., Lechleiter J. D., *Nature*, **377**, 438–441 (1995).
- 6) Duchen M. R., *J. Physiol.*, **529**, 57–68 (2000).
- 7) Perocchi F., Gohil V. M., Girgis H. S., Bao X. R., McCombs J. E., Palmer A. E., Mootha V. K., *Nature*, **467**, 291–296 (2010).
- 8) Baughman J. M., Perocchi F., Girgis H. S., Plovanich M., Belcher-Timme C. A., Sancak Y., Bao X. R., Strittmatter L., Goldberger O., Bogorad R. L., Kotliansky V., Mootha V. K., *Nature*, **476**, 341–345 (2011).
- 9) De Stefani D., Raffaello A., Teardo E., Szabò I., Rizzuto R., *Nature*, **476**, 336–340 (2011).
- 10) Plovanich M., Bogorad R. L., Sancak Y., Kamer K. J., Strittmatter L., Li A. A., Girgis H. S., Kuchimanchi S., De Groot J., Speciner L., Taneja N., Oshea J., Kotliansky V., Mootha V. K., *PLoS One*, **8**, e55785 (2013).
- 11) Raffaello A., De Stefani D., Sabbadin D., Teardo E., Merli G., Picard A., Checchetto V., Moro S., Szabò I., Rizzuto R., *EMBO J.*, **32**, 2362–2376 (2013).
- 12) Mallilankaraman K., Cárdenas C., Doonan P. J., Chandramoorthy H. C., Irrinki K. M., Golenár T., Csordás G., Madireddi P., Yang

- J., Müller M., Miller R., Kolesar J. E., Molgó J., Kaufman B., Hajnóczky G., Foskett J. K., Madesh M., *Nat. Cell Biol.*, **14**, 1336–1343 (2012).
- 13) Sancak Y., Markhard A. L., Kitami T., Kovács-Bogdán E., Kamber K. J., Udeshi N. D., Carr S. A., Chaudhuri D., Clapham D. E., Li A. A., Calvo S. E., Goldberger O., Mootha V. K., *Science*, **342**, 1379–1382 (2013).
- 14) Logan C. V., Szabadkai G., Sharpe J. A., *et al.*, *Nat. Genet.*, **46**, 188–193 (2014).
- 15) Yamamoto T., Yamagoshi R., Harada K., Kawano M., Minami N., Ido Y., Kuwahara K., Fujita A., Ozono M., Watanabe A., Yamada A., Terada H., Shinohara Y., *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 831–839 (2016).
- 16) Wang Y., Nguyen N. X., She J., Zeng W., Yang Y., Bai X. C., Jiang Y., *Cell*, **177**, 1252–1261 (2019).
- 17) Bick A. G., Calvo S. E., Mootha V. K., *Science*, **336**, 886 (2012).
- 18) Yamamoto T., Ozono M., Watanabe A., Maeda K., Nara A., Hashida M., Ido Y., Hiroshima Y., Yamada A., Terada H., Shinohara Y., *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 148061 (2019).
- 19) Oxenoid K., Dong Y., Cao C., Cui T., Sancak Y., Markhard A. L., Grabarek Z., Kong L., Liu Z., Ouyang B., Cong Y., Mootha V. K., Chou J. J., *Nature*, **533**, 269–273 (2016).
- 20) Yoo J., Wu M., Yin Y., Herzik M. A. Jr., Lander G. C., Lee S. Y., *Science*, **361**, 506–511 (2018).
- 21) Nguyen N. X., Armache J. P., Lee C., Yang Y., Zeng W., Mootha V. K., Cheng Y., Bai X. C., Jiang Y., *Nature*, **559**, 570–574 (2018).
- 22) Fan C., Fan M., Orlando B. J., Fastman N. M., Zhang J., Xu Y., Chambers M. G., Xu X., Perry K., Liao M., Feng L., *Nature*, **559**, 575–579 (2018).
- 23) Baradaran R., Wang C., Siliciano A. F., Long S. B., *Nature*, **559**, 580–584 (2018).
- 24) Arduino D., Wettmarshausen J., Vais H., Navas-Navarro P., Cheng Y., Leimpek A., Ma Z., Delrio-Lorenzo A., Giordano A., García-Perez C., Médard G., Kuster B., García-Sancho J., Mokranjac D., Foskett J. K., Alonso M. T., Perocchi F., *Mol. Cell*, **67**, 711–723 (2017).