

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03676

研究課題名(和文)リン酸化修飾によるミトコンドリア機能と品質管理の制御機構

研究課題名(英文) Phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial functions and quality control

研究代表者

岡 敏彦 (OKA, Toshihiko)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：40263321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：障害を受け膜電位が低下したミトコンドリアのオートファジーによる排斥は、ミトコンドリア品質管理として近年注目を浴びている。しかし、ミトコンドリア品質管理が細胞からどのように調節されているかは不明な点が多く残る。私達は、リン酸化修飾を介したミトコンドリアの機能制御と品質管理に着目し、ミトコンドリアタンパク質のリン酸化反応の場所やリン酸化酵素PKAの触媒サブユニットアイソフォームの細胞内局在を明らかにした。また、解糖系酵素のミトコンドリア品質管理への関与も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞がミトコンドリア機能を制御する方法としての翻訳後修飾に着目して、ミトコンドリア機能の調節機構を明らかにしようとする点が特徴であり、ミトコンドリア表面だけでなく、これまで手付かずだったミトコンドリア内部でのリン酸化修飾を検証した点がユニークである。

本研究で得られる結果は、ミトコンドリアの機能と品質管理の理解に寄与するだけでなく、PINK1やParkinを原因遺伝子とする遺伝性パーキンソン病の発症メカニズムを理解する上でも重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria with low membrane potential are eliminated by autophagy, which is called mitochondrial quality control. It is still unclear how the mitochondrial quality control is regulated by cellular signals.

We have focused on PKA-dependent phosphorylation and determined that intracellular localization of the PKA catalytic subunit isoforms. Furthermore, we found a role of the enzyme in the glycolytic pathway in mitochondrial quality control.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの機能は細胞内の ATP 産生だけでなく、脂質合成、鉄・硫黄クラスターの形成、そしてアポトーシス制御など多岐に渡っており、細胞にとって非常に重要な器官である。そのため、ミトコンドリアは細胞により様々な調節を受けている。特に、障害を受け膜電位が低下したミトコンドリアのオートファジーによる排斥は、ミトコンドリア品質管理として、近年、その詳細な分子メカニズムが明らかになってきた。ミトコンドリア外膜のコピキチンリン酸化酵素 PINK1 (遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物の一つ) は膜電位の消失に伴い、自己リン酸化により活性化し、コピキチンリガーゼである Parkin (別の遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物) を障害ミトコンドリアに標的化させることで品質管理を制御している。しかし、ミトコンドリア品質管理が細胞側からどのように調節されているかは不明な点が多く残る。そこで、私達はミトコンドリア品質管理への影響を幾つかの薬剤で検討したところ、Adenylate cyclase 活性化剤である forskolin が膜電位の低下したミトコンドリアへの Parkin の標的化を強く阻害することを見出した。さらに、Protein kinase A (PKA) 触媒サブユニットの過剰発現でも同様の阻害効果を確認されことから、cAMP/PKA シグナル経路の関与が明らかとなった。私達は、PKA 基質の検索によりミトコンドリア内膜タンパク質の MIC60 と MIC19 を同定した。MIC60/19 は forskolin によるリン酸化修飾を受け、その発現抑制は Parkin の標的化を阻害した。さらに MIC60/19 の擬似リン酸化変異体では、PINK1 の外膜での安定化が起こらず分解されるため、Parkin の標的化が抑制された。この結果は、PKA による MIC60/19 のリン酸化がミトコンドリア品質管理を負に制御することを示している。しかし、リン酸化修飾が PINK1 の安定性やミトコンドリア品質管理に分子レベルでどう寄与するかは不明であった。本研究では、(1) MIC60 のリン酸化によるミトコンドリア品質管理の調節、(2) AKT を介した解糖系阻害によるミトコンドリア品質管理の調節、(3) PKA によるミトコンドリアタンパク質のリン酸化の分子メカニズム、(4) 新規リン酸化ミトコンドリアタンパク質 DNAJC11 の役割、という 4 点に着目し、リン酸化修飾を介した細胞によるミトコンドリア機能の調節機構の総合的な理解を目指す。

2. 研究の目的

(1) MIC60 のリン酸化を介したミトコンドリア品質管理の調節

MIC60 はクリステ構造形成に必須な MICOS 複合体の主要サブユニットで、すべての真核生物に保存されている。PKA によりリン酸化される部位 (Ser528) をアスパラギン酸やグルタミン酸に置換した MIC60 の擬似リン酸化変異体のみを発現する細胞でもクリステ構造は正常であったため、MIC60 のリン酸化修飾がクリステ構造の形成に直接影響を及ぼさないことが明らかとなった。この結果を PKA によるリン酸化部位が真核生物の中で脊椎動物のみで保存されていることと合わせると、PKA によるリン酸化修飾は、MIC60 で進化的に保存されていた機能とは別な、脊椎生物で新たに獲得した翻訳後修飾の制御機構であると考えられた。そのため、MIC60 の PKA を介したリン酸化修飾の役割を明らかにすることで、脊椎動物におけるミトコンドリア機能調節の新たな知見が得られる。特に、ミトコンドリア内膜タンパク質である MIC60 とミトコンドリア外膜タンパク質 PINK1 との相互作用や、PKA によるリン酸化反応の場を検討する。

(2) AKT を介した解糖系阻害によるミトコンドリア品質管理の調節

ミトコンドリア品質管理は cAMP/PKA 経路だけでなく、解糖系にも依存することが報告されている。私達は、グルコース非含有培地や解糖系の阻害剤により PINK1 の自己リン酸化が抑制され、ミトコンドリア品質管理が阻害されることを見出した。この品質管理の阻害は、タンパク質リン酸化酵素 AKT の 2 種の異なる阻害剤で緩和されるため、AKT が解糖系からミトコンドリア品質管理へのシグナル伝達に働くと考えられた。しかし、恒常的に N 末端に脂質修飾を受ける活性化型 AKT の発現だけでは、解糖系阻害剤のように Parkin の標的化を完全に阻害できないため、AKT 活性化機構以外の異なるメカニズムも解糖系阻害による品質管理の調節に関与していると考えられる。そこで、AKT のリン酸化基質として知られる解糖系の初発酵素のヘキソキナーゼに着目し、AKT によるミトコンドリア品質管理の調節機構を検討する。

(3) PKA によるミトコンドリアタンパク質リン酸化の分子メカニズム

これまでにミトコンドリアでは呼吸鎖サブユニットなどのリン酸化の報告が幾つかあったが、そのリン酸化の分子メカニズムは全く手付かずだった。新生タンパク質が細胞質でリン酸化された後にミトコンドリアに輸送されるか、または輸送後にミトコンドリア内でリン酸化されるかでは、そのリン酸化の意味も大きく異なる。さらに、ヒトには 3 つの PKA 触媒サブユニット遺伝子 (α , β , γ ; γ は精巣特異的) があり、 α と β には alternative splicing により複数のアイソフォームが存在する。その中には N 末端部分が大きく異なるアイソフォームも存在するため、その細胞内局在が非常に重要となる。MIC60 の細胞内でのリン酸化反応の場を明らかにするために、各 PKA 触媒サブユニットのアイソフォームの細胞内局在を検討する。

(4) 新規リン酸化ミトコンドリアタンパク質 DNAJC11 の役割

私達は、ミトコンドリア外膜タンパク質 DNAJC11 にも MIC60 と同様に脊椎動物のみでの PKA リン酸化部位を見出している。DNAJC11 は HSP40 ファミリーに属するため J-domain を持ち、シャペロンである HSP70 の機能を制御していると考えられている。さらに、DNAJC11 は MICOS 複合体と結合し、ミトコンドリア内外膜を繋ぐ超タンパク質複合体 MIB を形成することも報告さ

れている。DNAJC11 はミトコンドリア外膜を1回貫通する膜タンパク質であり、細胞質側ではなく膜間スペース側に推定リン酸化部位を持つため、MIC60 と同様にミトコンドリア内でのリン酸化反応が推定される。DNAJC11 の PKA によるリン酸化の役割を明らかにするため、そのリン酸化修飾の検証とミトコンドリア品質管理への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) MIC60 のリン酸化を介したミトコンドリア品質管理の調節

MIC60 相互作用因子でミトコンドリア外膜に局在するタンパク質を RNA 干渉法で発現抑制することで、GFP-Parkin の障害ミトコンドリアへの標的化への影響を調べる。また、*in vitro* 無細胞系でタンパク質合成した MIC60 を用いた試験管内ミトコンドリア輸送系で、その輸送能を検証する。

(2) AKT を介した解糖系阻害によるミトコンドリア品質管理の調節

2 種類の AKT 阻害剤を用いて、解凍系阻害時の GFP-Parkin の障害ミトコンドリアへの標的化への影響を調べる。その際に、野生型および AKT リン酸化部位を変異させたヘキソキナーゼを異所発現した効果を検証する。

(3) PKA によるミトコンドリアタンパク質リン酸化の分子メカニズム

PKA 触媒サブユニットの α と β のアイソフォーム遺伝子をクローニンし、タグを付加した形で細胞に発現させ、その細胞内局在を検討する。

(4) 新規リン酸化ミトコンドリアタンパク質 DNAJC11 の役割

PKA による推定リン酸化部位に特異的な抗体を用いた DNAJC11 のリン酸化の検証を行う。また、DNAJC11 の非リン酸化変異体のミトコンドリアへの標的化や、DNAJC11 発現抑制による GFP-Parkin の障害ミトコンドリアへの標的化を調べる。

4. 研究成果

(1) MIC60 のリン酸化を介したミトコンドリア品質管理の調節

ミトコンドリア内膜タンパク質である MIC60 とミトコンドリア外膜タンパク質 PINK1 との相互作用を考えたときに、MIC60 と相互作用する因子でミトコンドリア外膜に局在するタンパク質 SAM50 に着目した。SAM50 は外膜の β パレルタンパク質の生合成に必須であり、MICOS 複合体と共にミトコンドリア内外膜を繋ぐ超タンパク質複合体 MIB を形成している。しかし、SAM50 の発現抑制は GFP-Parkin の標的化に全く影響しないため、ミトコンドリア品質管理と形態形成は異なる制御であると考えられる。次に、もう一つの MIC60 相互作用因子でミトコンドリア外膜タンパク質である SLC25A46 の発現抑制を試みた。ある1種類の siRNA を用いた RNA 干渉法では、GFP-Parkin のミトコンドリア標的化に阻害効果が観察されたが、異なる SLC25A46 に対する siRNA を用いた場合には、同様の阻害効果は観察できなかった。この結果は、最初の siRNA による GFP-Parkin のミトコンドリア標的化の阻害効果は2次的な影響であり、SLC25A46 はミトコンドリア品質管理に直接関与しないことを示唆している。

MIC60 の PKA によるリン酸化反応が細胞質またはミトコンドリアのどちらで起こるかは、調節機構を理解する上で重要なポイントとなる。そこで、タンパク質合成後に翻訳後修飾によりリン酸化された MIC60 がミトコンドリアへの輸送が可能かを検討するため、ウサギ網状赤血球抽出液を用いた *in vitro* 無細胞系で合成した MIC60 を、細胞抽出液中に内在する PKA により合成と同時にリン酸化修飾する方法を確立した。その系を用いて合成したリン酸化 MIC60 を基質として、単離ミトコンドリアへの輸送実験を行った。その結果、リン酸化された前駆体がミトコンドリアへ輸送できることが明らかとなり、細胞質での PKA による MIC60 のリン酸化修飾の可能性が高まった。

(2) AKT を介した解糖系阻害によるミトコンドリア品質管理の調節

解凍系を薬剤で阻害すると、GFP-Parkin の障害ミトコンドリアへの標的化が大きく抑制される。そこに AKT 阻害剤をさらに添加すると、その抑制が回復することを見出した。AKT は解糖系の初発酵素であるヘキソキナーゼをリン酸化するため、PINK1/Parkin 経路の阻害の標的候補因子としてヘキソキナーゼに着目した。ヘキソキナーゼの発現抑制により、GFP-Parkin のミトコンドリア標的化は顕著に阻害され、タグを付加したヘキソキナーゼの異所発現により阻害効果が回復したため、ヘキソキナーゼの PINK1/Parkin 経路への関与が示された。ヘキソキナーゼのアイソフォームであるヘキソキナーゼ2には、AKT リン酸化部位が1ヶ所存在する。その AKT リン酸化部位に変異を導入したヘキソキナーゼ2を用いて、GFP-Parkin のミトコンドリア標的化の相補実験を行なった。しかし、導入したヘキソキナーゼ2変異体でも野生型と同様に GFP-Parkin の障害ミトコンドリアへの標的化が確認できたため、PINK1/Parkin 経路においてヘキソキナーゼ2は AKT の下流で働いていないことが明らかとなった。

(3) PKA によるミトコンドリアタンパク質リン酸化の分子メカニズム

ヒトの PKA 触媒サブユニット (PKAc) には主要なアイソフォームである α 以外に、N 末端が47 アミノ酸残基だけ長いアイソフォーム β が存在する。その N 末端の47 アミノ酸残基の配列はミトコンドリアへの輸送を推定するプログラム(MitoPortII)で高い値を示すため、PKAc アイソフォーム β (PKAc β) のミトコンドリア局在が示唆された。そこで、PKAc α と PKAc β の両アイソフォームに GFP を付加した融合タンパク質を細胞に発現させ、その細胞内局在を検証した。その結果、PKAc α -GFP は予想通り細胞質に存在していたが、PKAc β -GFP は細胞内のドット状

の構造物の上に観察された。しかし、その細胞内のドット状構造物は、ミトコンドリアマーカータンパク質の染色パターンとは一致せず、PKA β -GFPはミトコンドリアには輸送されないことが示された。この結果は、(1)で得られたミトコンドリアタンパク質の細胞質でのPKAによるリン酸化修飾を支持している。今後は、このドット状構造物がどのオルガネラに由来するものを詳細に検討する。

(4) 新規リン酸化ミトコンドリアタンパク質 DNAJC11 の役割

ミトコンドリア外膜タンパク質 DNAJC11 の PKA によるリン酸化を検証するため、DNAJC11 の推定リン酸化部位に特異的な抗体を作成した。その抗体を用いて forskolin 処理した細胞より調製した抽出液でウエスタンブロット実験を行なったが、forskolin 処理に応じた優位なバンドの変化は検出できなかった。今後は、内在性 DNAJC11 の免疫沈降産物でのリン酸化修飾の検出を試みる予定である。

PKA による直接的な DNAJC11 のリン酸化は確認できていないが、DNAJC11 は MIC60 と MIB と呼ばれる超タンパク質複合体を形成することから、ミトコンドリア品質管理に寄与することが推定された。そこで、DNAJC11 発現抑制による GFP-Parkin の障害ミトコンドリアへの標的化を検証したが、大きな変化は検出できなかったため、DNAJC11 はミトコンドリア品質管理に直接関与しないと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Seiko, Matsui Aiko, Akabane Shiori, Tamura Yasushi, Hatano Azumi, Miyano Yuriko, Omote Hiroshi, Kajikawa Mizuho, Maenaka Katsumi, Moriyama Yoshinori, Endo Toshiya, Oka Toshihiko	4. 巻 3
2. 論文標題 The mitochondrial inner membrane protein LETM1 modulates cristae organization through its LETM domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0832-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamura Kosuke, Matsushita Shuhei, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime, Matsui Aiko, Oka Toshihiko, Matsuura Tomoaki	4. 巻 127
2. 論文標題 In vitro synthesis of the human calcium transporter Letm1 within cell-sized liposomes and investigation of its lipid dependency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 544 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.11.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Kaori, Kobayashi Kohei, Yamada Akihito, Umehara Moe, Oka Toshihiko, Nakada Kazuto	4. 巻 14
2. 論文標題 Concentration of mitochondrial DNA mutations by cytoplasmic transfer from platelets to cultured mouse cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0213283 ~ 0213283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0213283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 A. Matsumura, J. Higuchi, Y. Watanabe, M. Kato, K. Aoki, S. Akabane, T. Endo, and T. Oka	4. 巻 592
2. 論文標題 Inactivation of cardiolipin synthase triggers changes in mitochondrial morphology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Febs Letter	6. 最初と最後の頁 209-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okatsu Kei, Sato Yusuke, Yamano Koji, Matsuda Noriyuki, Negishi Lumi, Takahashi Akiko, Yamagata Atsushi, Goto-Ito Sakurako, Mishima Masaki, Ito Yutaka, Oka Toshihiko, Tanaka Keiji, Fukai Shuya	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural insights into ubiquitin phosphorylation by PINK1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28656-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊聖菜, 岡 敏彦
2. 発表標題 ミトコンドリア品質管理におけるTIM23複合体の新たな役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊聖菜, 岡 敏彦
2. 発表標題 ミトコンドリア膜透過装置コアサブユニットTIM23のミトコンドリア品質管理における役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤雅広, 三宅千絢, 岡 敏彦
2. 発表標題 ミトコンドリア品質管理におけるヘキソキナーゼの役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村綾香, 樋口 准, 青木啓悟, 岡 敏彦
2. 発表標題 ミトコンドリア形態におけるカルジオリピンの役割
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----