

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月3日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19406

研究課題名(和文)ミトコンドリア-小胞体間のタンパク質の飛び移り

研究課題名(英文) Shuttle of proteins between mitochondria and the ER

研究代表者

多賀谷 光男 (Tagaya, Mitsuo)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30179569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質はひとたび目的のオルガネラに定着すると移動しないと考えられてきたが、最近の研究は、ある環境の下でいくつかのミトコンドリア膜タンパク質が小胞体へと移行する可能性を示唆している。本研究では、飢餓に伴ってミトコンドリアからオートファゴソームへ移動するcytochrome b5を用い、その分子機構の解明を試みた。その結果、この飛び移りには小胞体とミトコンドリアの適切な繫留が必要であることが判明した。一方、この飛び移りに関与するタンパク質の候補の同定は遂行できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は、その含有するシグナル(アミノ酸配列)に応じて固有のオルガネラへと輸送されて機能する。ひとたびオルガネラに定着すると、膜タンパク質はそれ以降は移動しないと長い間考えられてきたが、そうでは無い可能性が最近の知見から示唆された。本研究は、細胞の環境が変わることによって膜タンパク質がミトコンドリアから小胞体へ移動することを立証し、その分子機構の解明を目指した研究である。本研究によって、膜タンパク質のこの飛び移りには、ミトコンドリアと小胞体の適切な繫留(近さ)が必要であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：It has been believed for a long time that membrane proteins, once transported to the target organelles, never relocate to other organelles. Recent studies, however, suggest that some mitochondrial membrane proteins may relocate to the endoplasmic reticulum in certain cellular contexts. In this study we analyzed the mechanism underlying the translocation of mitochondrial cytochrome b5 to autophagosomes upon starvation. We found that an appropriate tethering between mitochondria and the endoplasmic reticulum is necessary for this translocation. Unfortunately, we could not identify candidate proteins that mediate this translocation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 ミトコンドリア 膜タンパク質 オートファジー カルシウム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア等の非分泌経路に位置するオルガネラに存在するタンパク質は、遊離リボソームで合成された後に目的のオルガネラへと輸送され、そこに定着して機能を発揮する。輸送されるタンパク質はシグナル配列を持ち、これがタンパク質の移行の特異性を決定している。このドグマは米国ロックフェラー大学の Blobel によって提唱され（シグナル仮説）、その正しさが証明されて 1999 年にはノーベル賞が贈られている。それゆえ最近まで、膜タンパク質（膜表在性ではなく、脂質層に埋め込まれているタンパク質）はひとたび膜に定着すると、他のオルガネラ膜には移動しないと考えられてきた。しかしながら、近年、オートファジーやマイトファジー（ミトコンドリア選択的オートファジー）において、ミトコンドリアから小胞体へとタンパク質が飛び移っていると考えないと説明できない現象が発見されつつある。

米国 NIH の Lippincott-Schwartz ら (Hailey et al. (2010) Cell 141, 656) は、オートファジーにおいて、ミトコンドリア外膜に存在するシトクロム b5 (Cb5) がオートファゴソーム上へと移動することを示している。九大の中山は (Saita et al. (2013) Nat Commun 4, 1410) は、ミトコンドリア外膜タンパク質の FKBP38 と Bcl-2 がマイトファジー時に小胞体へと移動して分解から逃れていることを示している。

これらの現象は極めて興味深いのが、膜に定着したタンパク質が本当に別の膜へと飛び移っているのかについては十分な検証が行われていない。また当然ながら、どのような機構でその膜から離れ、別の膜へと飛び移っているかについてもまったく不明である。

2. 研究の目的

膜融合を媒介することでよく知られている SNARE タンパク質の一種である Syntaxin 17 (Stx17) は、富栄養下では小胞体、小胞体のミトコンドリア近接領域 (MAM)、ミトコンドリアに存在し、膜融合活性非依存的にミトコンドリア分裂因子 Drp1 の活性を促進している (Arasaki et al. (2015) Dev Cell 32, 304)。Stx17 はオートファジーの初期においては MAM においてオートファゴソーム形成に働き、オートファゴソーム膜に乗り込んで後期においてはオートファゴソームとリソソームとの融合に働く。オートファジーは栄養飢餓以外にタプシガルギン (TG) 等で小胞体内からカルシウムを流出させた時にも進行することが知られているが、この TG 処理と栄養飢餓処理を同時に行うと、Stx17 は小胞体に凝集（会合）して蓄積し、オートファゴソームへ移行できなくなる。この現象は以下のように考えられる。通常は Stx17 がミトコンドリアから小胞体へ飛び移ってオートファゴソーム膜へと取り込まれるが、過剰な刺激（栄養飢餓と小胞体からのカルシウム放出）によって何かが乱され、小胞体へ移動した Stx17 を含むミトコンドリアタンパク質が小胞体に留まり、それらが小胞体内で凝集（会合）したと考えられる。この現象を利用すれば、Cb5 がオートファゴソームに乗り込む前に本当にミトコンドリアから小胞体へ飛び移ったかを証明することが可能と考えられる。もしこの「飛び移り仮説」が正しければ、栄養飢餓と TG 処理で Cb5 は会合した小胞体に集積することが予想される。

本研究では、我々が発見したこの現象を基に、ミトコンドリアと小胞体間のタンパク質の飛び移りを検証し、さらにその機構について解明を進める。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

細胞は主に HeLa 細胞を用いた。Stx17 野生型および MAM 局在化に必要な Lys-254 を Cys

に置換した K254C を一過性あるいは安定的に発現する細胞株を用いた。また、GFP-Cb5 を発現させて解析した。

2) 顕微鏡

細胞は 4%パラホルムアルデヒドで固定した。蛍光顕微鏡解析にはオリンパス製共焦点レーザー顕微鏡 Fluoview 1000 を用いた。

3) 電気泳動

(TG+飢餓) 処理時における Stx17 結合タンパク質を同定するために、FLAG-Stx17 安定発現細胞に TG を加え、3 時間飢餓状態 (SV) とした。細胞を破碎後、抗 FLAG ビーズで免疫沈降し、電気泳動後に銀染色を行なった。

4. 研究成果

1) Cb5 のミトコンドリアから小胞体への飛び移りには、小胞体とミトコンドリアの適切な繫留が必要である

まず、発現させた Cb5 の局在を観察した。Cb5 は、通常ミトコンドリアに局在しているが (おそらく MAM には局在していない)、飢餓誘導に伴いオートファゴソームに移行する。飢餓誘導と TG 処理を行うと、Cb5 の一部は Stx17 と同様に小胞体内でパッチ状の構造として観察された。一方、ミトコンドリア外膜に局在する他のタンパク質の局在には変化が見られなかった。次に、Cb5 のオートファゴソームへの移行に、小胞体-ミトコンドリアの連結が必要かどうかをマイトフュージン 2 (Mfn2) の発現抑制を行って検証した。Mfn2 については小胞体とミトコンドリアの繫留を媒介しているのか、あるいはその逆に抑制しているのかについては議論がわかれているが (Naon et al. (2016) PNAS 113, 11249; Filadi et al. (2017) PNAS 114, E2266)、このタンパク質をノックダウンするとオートファゴソーム形成が損なわれ、また栄養時の Drp1 と Stx17 の相互作用が消失することから繫留に深く関連していることは間違いないと考えられる。Mfn2 を発現抑制した細胞に飢餓誘導と TG 処理を行ったところ、コントロール細胞とは異なり、Stx17 と Cb5 は小胞体上でパッチ状に会合せず、ミトコンドリアに留まった。この結果は、ミトコンドリアから小胞体へのタンパク質の飛び移りには両者の繫留が必要であることを示唆している。

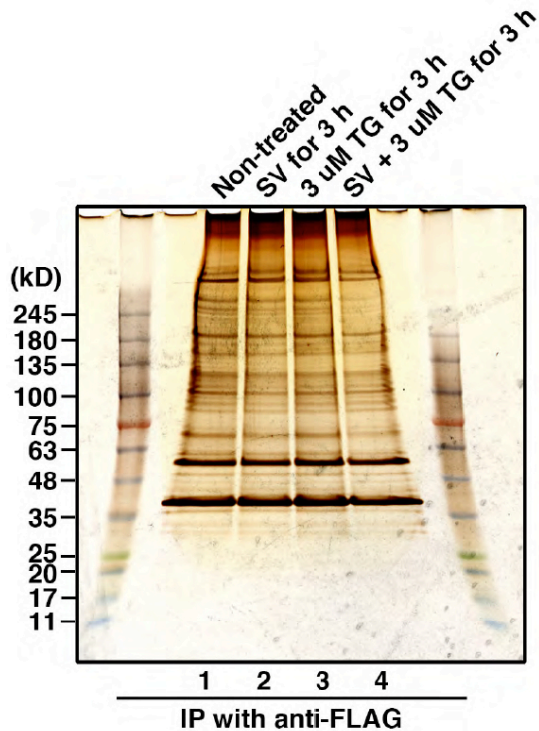
Cb5 は C 末端テイルアンカー型タンパク質であり、その疎水領域はヘアピン構造をしていると考えられている。また Stx17 も同様の構造で膜に結合していると考えられている。今後、これらの疎水領域の構造を変えた変異体を作成し、飛び移りに必要な構造の決定や結合する脂質を同定することが重要と考えられる。

2) VMP1 発現抑制細胞との表現型の比較

中国科学院生物物理研究所の Zhang ら (Zhao et al. (2017) Mol Cell 67, 974) は、オートファジーに参与する数少ない膜タンパク質である VMP1 の発現を抑制すると、隔離膜の小胞体からの離脱 (隔離膜の閉鎖とオートファゴソームの形成) が阻害されることを見出した。解析の結果、隔離膜の小胞体からの離脱にはサイトゾルの Ca^{2+} 濃度が低いことが必要で、VMP1 はホスホランバンとサルコリピンによる小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA) の阻害を緩和する (すなわちサイトゾルの Ca^{2+} 濃度を低く保つ) ことで、オートファゴソーム形成を促進していることが判明した。TG は SERCA の阻害剤なので、VMP1 を発現抑制して飢餓状態にすることは、(TG+飢餓) と同等である可能性が考えられた。そこで VMP1 の発現を抑制して、Stx17 や Cb5 の小胞体内での凝集 (会合) を調べたが、TG 処理とは異なり凝集 (会合) は認められなかった。このことは、VMP1 の発現抑制は単なる SERCA の阻害だけではないことを示唆している。

3) (TG+飢餓) 処理時の Stx17 結合タンパク質の同定

飛び移りに関連しているタンパク質を同定するために、(TG+飢餓) 処理時の Stx17 結合タンパク質の同定を試みた。下図に示すように、(TG+飢餓) によって 245 kDa 以上の大きなタンパク質のいくつかとの結合が減少している傾向があった。一方、結合が増加しているタンパク質は明確には同定されなかった。



5. 主な発表論文等

本研究は計画が順調に進行しなかったため、論文発表、学会発表は行っておらず、また特許も取得していない。

[その他]

ホームページ等：<https://www.ls.toyaku.ac.jp/~lmcb-6/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：若菜 裕一

ローマ字氏名：Wakana, Yuichi

所属研究機関名：東京薬科大学

部局名：生命科学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：90635187

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。