

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03222

研究課題名(和文) 選択的ミトコンドリア分解を制御する多様な分子機構の解明

研究課題名(英文) Diverse molecular mechanisms regulating selective mitochondria degradation

研究代表者

岡本 浩二 (Okamoto, Koji)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：40455217

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)：ミトコンドリアを選択的に丸ごと分別・除去するプロセスは、生物種を超えて保存された基本的な機構であり、オートファジーの仕組みを利用していることから、「マイトファジー」と呼ばれる。その破綻は様々な病態を引き起こすなど、生物学的重要性が明らかである一方、詳細な分子機構については不明な点が数多く残されている。本研究では、小胞体膜タンパク質挿入複合体Get1/2の出芽酵母マイトファジーにおける作用機序について調べた。その結果、Get1/2がマイトファジーの負の制御因子Ppg1-Farを小胞体に局在させることで、マイトファジーに寄与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究から、マイトファジーが駆動される際、オートファジーの仕組みをミトコンドリアへリクルートするための「分解標識」タンパク質が活性化する。このマイトファジー駆動タンパク質を負に制御する因子が小胞体に局在していること、その一部がミトコンドリアへ標的化して、マイトファジー駆動タンパク質を抑制していることが明らかとなった。重要なことに、この負の制御因子の小胞体局在に働くタンパク質がマイトファジーに寄与している。このことは、選択的ミトコンドリア分解を司る仕組みが別のオルガネラにも存在していることを示しており、当該分野に新たな視点を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Selective sequestration and removal of mitochondria as a whole organelle is a fundamental mechanism conserved beyond species. Defects in this autophagy-dependent process, termed mitophagy, are associated with various pathologies, highlighting its biological relevance. However, detailed molecular mechanisms underlying mitophagy remain elusive. In this study, we sought to investigate how Get1/2, a complex promoting insertion of membrane proteins into the endoplasmic reticulum, acts in budding yeast mitophagy. We found that Get1/2 contributes to mitophagy via localizing Ppg1-Far, a factor negatively regulating mitophagy, to the endoplasmic reticulum.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア オートファジー 小胞体 タンパク質膜挿入 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは「細胞の発電所」と称されるように、エネルギー供給の要を担うオルガネラである。その機能を正常に保つことは細胞の恒常性維持に不可欠であり、ミトコンドリア機能不全が様々な病態を引き起こすことが知られている。一方、ミトコンドリアはエネルギー変換の過程で活性酸素種 (ROS) を自ら作り出すため、細胞はそのエネルギー需要に応じてミトコンドリアの量を過不足なく増やしたり減らしたりする必要がある。また、ROS による酸化ストレスはミトコンドリアの機能を損ない、しばしば品質低下を招く。このため、ミトコンドリアの量と品質は適切に管理されると考えられている。これまでの研究により、余剰または不良ミトコンドリアは特別な膜小胞によって選択的に隔離され、分解オルガネラであるリソソーム (酵母や植物では液胞) に運ばれて除去されることがわかってきた。この選択的ミトコンドリア分解は、オートファジーの仕組みを利用していることから「マイトファジー」と呼ばれる (図1)。近年、マイトファジーの異常な低下や亢進が、様々な病態を引き起こすことが報告されている。一方、その詳細な制御機構については不明な点が未だ数多く残されている。

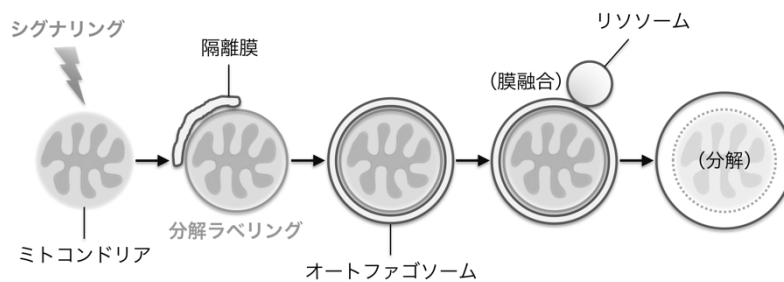


図1. マイトファジーの膜動態

マイトファジーは、酵母からヒトまで保存された基本的な機構である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、非発酵性培地 (ミトコンドリア呼吸が細胞の増殖・生存に必須) での長期培養や栄養飢餓によりマイトファジーが誘導される。いずれの場合も、「分別マーク・タンパク質」Atg32 がマイトファジーに特異的かつ必須な役割を果たす。マイトファジー誘導条件下において、Atg32 はミトコンドリア外膜を貫通して蓄積するとともに、リン酸化される。また、Atg32 は Atg8 および Atg11 と結合する。Atg8 および Atg11 はオートファジーマシナリーの構成因子であり、Atg32 とともにマイトファジー始動複合体を形成すると考えられる。Atg32-Atg11 相互作用は、Atg32 のリン酸化によって安定化する。Atg32 のリン酸化状態は CK2 キナーゼに依存し、Ppg1-Far ホスファターゼによって負に制御される (図2)。CK2 は細胞質ゾルで定常的に機能するのに対し、Ppg1-Far はテイルアンカー (TA) タンパク質 Far9/10 を介して小胞体 (ER) に局在することが報告されている。ER にアンカーされた Ppg1-Far が、どのように Atg32 を脱リン酸化するかはよくわかっていない。このような状況の中、ER 膜タンパク質挿入複合体 Get1/2 の欠損でマイトファジーが特異的に強く抑制されることを見出した。共に ER に局在する Ppg1-Far と Get1/2 がマイトファジーに関与していることから、両者の関連性が想定される。

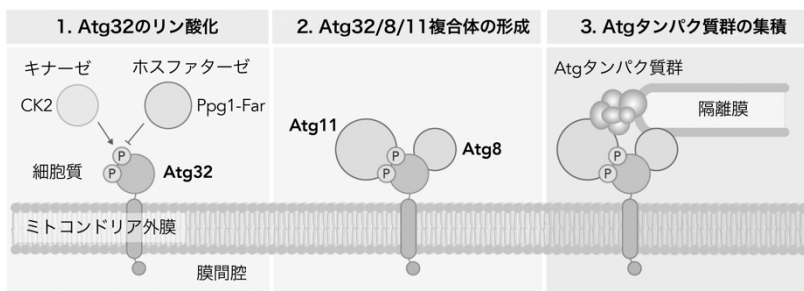


図2. 出芽酵母マイトファジーの開始過程

2. 研究の目的

本研究は、Get1/2 欠損細胞でのマイトファジー低下の原因に着目し、Atg32 のリン酸化状態、Atg32-Atg11 相互作用、Ppg1-Far の局在を解析することで、Atg32 が駆動するマイトファジーの分子機構の解明を目的とした。具体的には、以下の項目を明らかにする。

- (1) Get1/2 欠損細胞での Atg32 のリン酸化を調べるとともに、Atg32-Atg11 相互作用を評価する。また、Get1/2 の膜タンパク質挿入活性がマイトファジーに重要かどうかを検証する。
- (2) Get1/2 欠損細胞での Ppg1-Far の局在を解析するとともに、Ppg1 欠損あるいは Ppg1-Far を ER またはミトコンドリアへ強制的に標的化させ、マイトファジーへの影響を調べる。
- (3) Get1/2 へ基質タンパク質を運ぶ細胞質ゾル ATP 加水分解酵素 Get3、およびミトコンドリア外膜の膜タンパク質排出因子 Msp1 のマイトファジーへの関与を解析する。

3. 研究の方法

- (1) Atg32 のリン酸化状態については、Atg32-3HA を発現させた酵母株から細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE で分離した後、anti-HA を用いたウェスタンブロッティングにより、Atg32 のバンドパターンを解析する。Atg32-Atg11 相互作用については、ルシフェラーゼ NanoLuc のスプリット系 NanoBiT (Promega) の大小サブユニット LgBiT と SmBiT をそれぞれ Atg32 と Atg11 に付加した融合タンパク質の発現株 (NanoBiT[32-11]) を構築する。NanoBiT[32-11] の細胞懸濁液に発光基質を加えた後、マイクロプレートリーダーで測定する。これらの解析方法とマイトファジーアッセイを用いて、Get1/2 欠損細胞だけでなく、膜タンパク質挿入活性を失活させた変異体を構築・解析する。
- (2) Ppg1-Far 複合体のサブユニット Far8 に 3 コピーの GFP を付加し、染色体上の *FAR8* 遺伝子座から発現させるとともに、ER およびミトコンドリアの mCherry マーカーを発現させた Get1/2 欠損株を作成する。蛍光顕微鏡を用いて、得られた酵母株を観察し、局在パターンを定量化する。次に、Ppg1 の追加欠損に加えて、Far9/10 の膜貫通ドメインを別の ER およびミトコンドリア膜タンパク質の膜貫通ドメインに置換し、Ppg1-Far を強制的 (Get1/2 非依存的) にそれぞれのオルガネラへ標的化させ、Get1/2 欠損細胞や野生型細胞のマイトファジーへの影響を調べる。
- (3) Get3 および Msp1 の単独または二重欠損株を作成し、Atg32-Atg11 相互作用・マイトファジー・Ppg1-Far 局在について解析する。また、Msp1 の膜タンパク質排出活性を失活させた変異体を構築し、その単独または Get3 欠損とのコンビネーション株についても同様に調べる。

4. 研究成果

- (1) 非発酵性培地での長期培養の初期段階、対数増殖期において、Atg32 のタンパク質レベルが発酵性培養時の 10-20 倍に上昇するとともに、リン酸化が進行する。Atg32-3HA のリン酸化を anti-HA を用いてウェスタン解析すると、野生型細胞において少なくとも 3 つのバンドシフトが検出された。これに対し、Get1/2 欠損細胞ではこれらのバンドシフトが 60-70% 減弱することがわかった。Atg32 のリン酸化は、Atg32-Atg11 相互作用を安定化する。そこで、NanoBiT[32-11] 株を調べた結果、Get1/2 欠損細胞の Atg32-Atg11 相互作用が野生株に比べて 20-30% に低下していることが示唆された。次に、Get1/2 の膜タンパク質挿入活性が低下した変異体のマイトファジーを評価したところ、野生型に比べて 65-75% に低下していることがわかった。これらの知見から、Get1/2 は Atg32 のリン酸化を促進することでマイトファジーに寄与していること、その機能には膜タンパク質挿入活性が関与していると考えられる。
- (2) Ppg1-Far の細胞内局在を明らかにするため、Far8-3xGFP 発現細胞を蛍光顕微鏡を用いて観察した。野生型細胞においては、GFP シグナルは 90% 以上の細胞で ER マーカーと共局在するのに対し、Get1/2 欠損細胞では 90% 以上の細胞でミトコンドリアマーカーと共局在することがわかった。Ppg1 は Atg32 のリン酸化を負に制御することで Atg32-Atg11 相互作用を低下させ、マイトファジーを抑制する。すなわち、Get1/2 欠損細胞では Ppg1-Far が過剰にミトコンドリアへ標的化してしまい、Atg32 の脱リン酸化を引き起こしている可能性が提起される。そこで、Get1/2 Ppg1 三重欠損細胞を調べた結果、Atg32-Atg11 相互作用およびマイトファジーが野生型細胞並みに回復していることがわかった。さらに、Get1/2 欠損細胞において、Ppg1-Far による脱リン酸化を受けない Atg32 の変異タンパク質や、Ppg1-Far を強制的 (Get1/2 非依存的) に ER にアンカーさせた変異タンパク質を発現させたところ、Get1/2 Ppg1 三重欠損細胞と同様の表現型が確認された。一方、野生型細胞において、Ppg1-Far を強制的 (Get1/2 非依存的) にミトコンドリアにアンカーさせた変異タンパク質を発現させると、Atg32-Atg11 相互作用およびマイトファジーが部分的に抑制されることがわかった。この効果は、Ppg1 欠損でキャンセルされることから、Ppg1-Far のホスファターゼ活性に依存していると考えられる。以上の知見は、Get1/2 は Ppg1-Far を ER へ局在させる (ミトコンドリア標的化を抑える) ことにより、Atg32 のリン酸化を促し、Atg32-Atg11 相互作用の安定化に寄与し、マイトファジーの進行に働いていることが示唆された。
- (3) TA タンパク質が Get1/2 依存的に ER へ局在する際、Get3 と一時的に複合体を形成する。その後、Get1/2 に Get3 が結合することで、TA タンパク質を ER へ膜挿入してゆく。また、ミトコンドリアへ標的化した「よそ者」TA タンパク質は、Msp1 によって排出され、Get3 依存的に ER へ運ばれる。そこで、Get3 欠損細胞を作成して調べた結果、Atg32-Atg11 相互作用と Far8-3xGFP のミトコンドリア局在は Get1/2 欠損細胞とほぼ同様であったのに対し、マイトファジーは野生型細胞の 90% と大きな影響は見られなかった。なお、Msp1 欠損細胞では、Far8-3xGFP は ER 局在を示し、マイトファジーも野生型細胞の 75-85% であった。興味深いことに、Get3 Msp1 二重欠損細胞ではマイトファジーが野生型細胞の 45-55% まで低下することがわかった。この効果は、Msp1 の膜タンパク質排出活性を低下させることでも起こる。一方、Get3 Msp1 二重欠損細胞の表現型は、Ppg1 欠損や Ppg1-Far の強制的 ER 局在化によってキャンセルされる。これらの結果から、Msp1 はミトコンドリアへ標的化した Ppg1-Far を排出することで、マイトファジーに寄与している可能性が提起される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Onishi Mashun, Kubota Mitsutaka, Duan Lan, Tian Yuan, Okamoto Koji	4. 巻 6
2. 論文標題 The GET pathway serves to activate Atg32-mediated mitophagy by ER targeting of the Ppg1-Far complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202201640	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 Schuster Ramona, Okamoto Koji	4. 巻 1866
2. 論文標題 An overview of the molecular mechanisms of mitophagy in yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2022.130203	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 Kubota Mitsutaka, Okamoto Koji	4. 巻 170
2. 論文標題 The protein N-terminal acetyltransferase A complex contributes to yeast mitophagy via promoting expression and phosphorylation of Atg32	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 175 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab068	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 Duan Lan, Okamoto Koji	4. 巻 26
2. 論文標題 Mitochondrial dynamics and degradation in the oleaginous yeast <i>Lipomyces starkeyi</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 627 ~ 635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12875	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 Onishi Mashun, Okamoto Koji	4. 巻 595
2. 論文標題 Mitochondrial clearance: mechanisms and roles in cellular fitness	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14060	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 Liu Yang, Okamoto Koji	4. 巻 1865
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of mitophagy in yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2021.129858	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 Onishi Mashun, Yamano Koji, Sato Miyuki, Matsuda Noriyuki, Okamoto Koji	4. 巻 40
2. 論文標題 Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104705	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 Li Wen, He Pengcheng, Huang Yuge, Li Yi-Fang, Lu Jiahong, Li Min, Kurihara Hiroshi, Luo Zhuo, Meng Tian, Onishi Mashun, Ma Changle, Jiang Lei, Hu Yongquan, Gong Qing, Zhu Dongxing, Xu Yiming, Liu Rong, Liu Lei, Yi Cong, Zhu Yushan, Ma Ningfang, Okamoto Koji, Xie Zhiping, Liu Jinbao, He Rong-Rong, Feng Du	4. 巻 11
2. 論文標題 Selective autophagy of intracellular organelles: Recent research advances	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theranostics	6. 最初と最後の頁 222 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/thno.49860	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 該当する

1. 著者名 Calvelli Hannah、Krigman Judith、Onishi Mashun、Narendra Derek P.、Sun Nuo、Okamoto Koji	4. 巻 155
2. 論文標題 Detection of mitophagy in mammalian cells, mice, and yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 557 ~ 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mcb.2019.10.006	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 該当する

1. 著者名 Morita Keisuke、Matsuda Fumio、Okamoto Koji、Ishii Jun、Kondo Akihiko、Shimizu Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Repression of mitochondrial metabolism for cytosolic pyruvate-derived chemical production in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12934-019-1226-6	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 Zheng Liangde、Shu Wen-Jie、Li Yu-Min、Mari Muriel、Yan Chaojun、Wang Dehe、Yin Zhao-Hong、Jiang Wei、Zhou Yu、Okamoto Koji、Reggiori Fulvio、Klionsky Daniel J.、Song Zhiyin、Du Hai-Ning	4. 巻 16
2. 論文標題 The Paf1 complex transcriptionally regulates the mitochondrial-anchored protein Atg32 leading to activation of mitophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1366 ~ 1379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2019.1668228	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 劉 洋、結城 詩央里、小迫 英尊、岡本 浩二
2. 発表標題 Atg1キナーゼは出芽酵母の選択的ミトコンドリア分解の起点形成に働く
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本 浩二、藤井 奏子、宮崎 淳
2. 発表標題 ミトコンドリアを無標識で可視化する
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Duan Lan、岡本 浩二
2. 発表標題 巨大脂肪滴を形成する油脂酵母 <i>Lipomyces starkeyi</i> のミトコンドリア分解
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okamoto Koji
2. 発表標題 Endoplasmic reticulum-related pathways act in mitochondrial clearance
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okamoto Koji
2. 発表標題 Regulation of mitophagy via endoplasmic reticulum membrane-bound factors
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference on Mitochondria & Metabolism in Health and Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto Koji
2. 発表標題 Regulation of mitochondrial clearance via factors on the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 The 16th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto Koji
2. 発表標題 The TORC1 signaling pathway regulates respiration-induced mitophagy in yeast
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究室紹介サイト (研究科ホームページ内) https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_group/detail/8 研究室ホームページ https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/okamoto/index.html 研究室ホームページ http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/okamoto/Okamoto_Lab/</p>

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
研究協力者	シュスター ラモナ (Schuster Ramona)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	大西 真駿 (Onishi Mashun)		
研究協力者	劉 洋 (Liu Yang)		
研究協力者	田 園 (Tian Yuan)		
研究協力者	段 瀾 (Duan Lan)		
研究協力者	久保田 満聖 (Kubota Mitsutaka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
デンマーク	オーフス大学			
オランダ	グローニンゲン大学			
米国	ジョンズホプキンス大学			