

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657090

研究課題名（和文）ケミカルバイオロジーを駆使したマイトファジー制御ツールの確立

研究課題名（英文）Establishment of tools regulating mitophagy by chemical biology

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・特任准教授

研究者番号：40455217

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞の生と死を司る細胞小器官（オルガネラ）であるミトコンドリアの品質管理機構、とりわけオートファジーの仕組みを利用してミトコンドリアを丸ごと分別・除去する機構「マイトファジー」に焦点を絞った。具体的には、出芽酵母をモデルに用いて、マイトファジーを人為的に抑制したり、促進したりするための分子基盤とそれに基づく制御ツールの確立を目指した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on mitophagy, one of the mitochondrial quality control systems that selectively degrades the energy-converting organelles governing cell life and death via autophagy. Particularly, using budding yeast as a model organism, we sought to establish the molecular bases and regulatory tools that artificially suppress or facilitate mitophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ミトコンドリア、オートファジー、品質管理、オルガネラ膜動態

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内のほとんどのATPを産生するが、そのエネルギー変換の過程で生じる活性酸素種（ROS）に直接曝されている細胞小器官（オルガネラ）である。この酸化ストレスによるダメージを蓄積したミトコンドリアは丸ごと隔離され、分解コンパートメントであるリソソームに運ばれて除去されると考えられている。この選択的機構は、細胞内自己分解作用・オートファジーの系を利用していることから「マイトファジー」と呼ばれ、ミトコンドリアの品質管理システムとして注目されつつある。最近の研究で、神経変性疾患であるパーキンソン病の関連因子が、ミトコンドリア分解に関与してい

ることが明らかとなり、品質管理システムとしてのマイトファジーの重要性が示唆された。ミトコンドリア病は変異ミトコンドリアDNAの蓄積が原因で発症する難治疾患であるが、マイトファジーの仕組みを利用することで、変異ミトコンドリアDNAの選択的排除が可能になると考えられる。

このように、マイトファジーと高次生命現象とのつながりが脚光を浴び、病態との関連に関する各論的記述が相次ぐ一方で、肝心の治療に繋がる分子基盤についての本格的な研究は、未だ行われていないのが現状である。

マイトファジーは酵母からヒトまで保存された普遍的な機構である。しかし、①哺乳

類培養細胞においてミトコンドリア分解を誘導するには、脱分極剤処理とマイトファジー関連タンパク質の過剰発現という、非生理的条件で行わなければならない。また、②哺乳類マイトファジーを定量的に解析するシステムは未だ確立されておらず、迅速かつ多量のデータを処理することは困難である。さらに、③個体から取り出した培養細胞におけるミトコンドリア分解が、実際に体内での現象をどれだけ反映しているか、よくわかっていない。

私たちの研究グループは、酵母をモデルとしたマイトファジーの解析システムを世界で初めて確立した。このシステムには、哺乳類培養細胞系よりも優れた点がある。具体的には、①非発酵性の炭素源で呼吸増殖させるだけの極めて一般的な培養により、薬剤処理もタンパク質の過剰発現もなしに、ミトコンドリア分解を顕著に誘導できる。また、②ミトコンドリアの液胞(=リソソーム)への取り込みを定量的に解析するシステムを構築し、ハイスループット化のための改良にも既に成功している。加えて、③酵母は単細胞の真核生物であるが、完成した一つの「個体」でもあり、文字通り *in vivo* における分子機構・生理機能の解析が可能である。

2. 研究の目的

マイトファジーは、酵母からヒトまで保存された普遍的な機構である。申請者はこれまでの研究で、「細胞の基礎」を理解する上で最もパワフルなモデル生物である出芽酵母の特性を最大限に生かし、マイトファジーを定性的および定量的に解析可能な現象として捉えることに成功し、その分子基盤を世界に先駆けて獲得した(図1)。

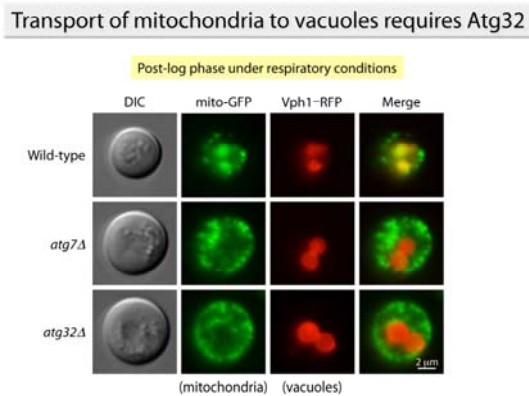


図1. マイトファジーの蛍光顕微鏡観察

本研究では、ケミカルバイオロジーを駆使した大規模スクリーニングを実施し、マイトファジーを阻害または促進する低分子化合物を獲得する。加えて、野生型と変異型のミ

トコンドリア DNA を合わせもつ細胞、いわゆる「ミトコンドリア病態モデル細胞」を構築・活用し、変異ミトコンドリア DNA の選択的排除システムの確立を目指す。

ミトコンドリア病は、主にミトコンドリア DNA の変異が原因になって、細胞機能に必要なエネルギー供給が行えなくなることにより起こる。脳・骨格筋・心筋で機能不全が生じることが多い。通常、ミトコンドリア病患者の細胞のミトコンドリアには、野生型と変異型のミトコンドリア DNA が混在しており、変異型の割合がある閾値を超えると、病態が発症する。我が国だけでも数万〜数百万人が苦しんでいると推定されている、根治法のない特定疾患(難病)であり、対症療法に頼らざるを得ない状況である。本研究では、ミトコンドリア病の根源である変異ミトコンドリア DNA の部分的あるいは完全な排除を「戦略目標」とし、マイトファジーによる品質管理を「実行戦術」として、このミッションを展開してゆく。

3. 研究の方法

(1) 平成23年度においては、ミトコンドリアの分解を定量解析するための適切なプローブについて、改良と詳細な検討を行った。

(2) 平成24年度においては、マイトファジーの誘導に重要なステップでありと考えられる、Atg32の発現上昇が抑制された変異株を解析した。

4. 研究成果

(1) これまでの研究で、大腸菌由来のジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)に蛍光タンパク質 mCherry を繋げた融合タンパク質を作製し、酵母細胞のミトコンドリアに局在させたプローブ mito-DHFR-mCherry を構築した。このプローブを発現させるための遺伝子カセットを酵母の染色体状に組み込むことで、細胞間でより均一な発現を得ることができる。マイトファジーにより、ミトコンドリアは分解コンパートメントである液胞(リソソームに相当)に運ばれ、分解されるが、mito-DHFR-mCherry の mCherry 部分は分解に耐性であるため、遊離の mCherry が蓄積してゆく。この蓄積量をウェスタン解析で定量化することで、マイトファジーをモニタリングできる。mito-DHFR-mCherry の発現量が過剰になると、ミトコンドリアの呼吸や形態に異常を生じることが判明したため、発現プロモーターを各種検討し、アッセイで検

出が可能な範囲にて、発現量を低くした。

定量化アッセイにおいて、マーカー・タンパク質のレベルが細胞ごとにばらついてしまうプラスミド発現系ではなく、発現カセットを染色体上に挿入する系を用いたことは重要である。加えて、発現をコントロールするプロモーターの強度も検討した。これは、マーカー・タンパク質の過剰な発現が、ミトコンドリアの生合成に必要なタンパク質の輸送を阻害し、呼吸能の低下や形態異常を引き起こし、マイトファジーにも副作用を及ぼすからである。上記2つの改善点をクリアして作製したマイトファジー・プローブは、今後様々な研究で有効なツールとなることが期待される。

(2) 現在解析中のマイトファジー変異体の中に、マイトファジー特異的因子 Atg32 の発現量が低下しているものを見出した。これまでの研究で、Atg32 の発現誘導がマイトファジーの活性化に重要であることがわかっており、この変異体が欠損しているタンパク質の活性を調節することで、マイトファジーの効率を人為的に制御できる可能性を考えている。具体的には、リン脂質メチル基転移酵素およびタンパク質 N 末端アセチル基転移酵素の欠損細胞で Atg32 の発現が抑制されていた。今後は、これらのタンパク質がどのようなメカニズムで Atg32 の発現誘導に関与しているかを明らかにしてゆく。具体的には、Atg32 との物理的相互作用を免疫共沈降で解析するとともに、細胞内局在を生細胞蛍光イメージングで観察する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Komatsu, M., Kuma, A., Okamoto, K. (2013) No ATG is an island-the connection of autophagy with diverse pathways and functions. *EMBO Rep.*, 14: 219-221. (査読無し)
DOI: 10.1038/embor.2013.14
- ② Kondo-Okamoto, N., Okamoto, K. (2012) Mitochondria and autophagy: critical interplay between the two homeostats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1820: 595-600. (査読無し)
DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.08.001
- ③ 岡本浩二 (2012) ミトコンドリア品質管理研究の最前線. *細胞*, 44: 199-202. (査読

無し)

URL:http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2012/03/20124_1.html

- ④ Kondo-Okamoto, N., Noda, N.N., Suzuki, S.W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., Hashimoto, A., Inagaki, F., Ohsumi, Y., Okamoto, K. (2012) Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *J. Biol. Chem.*, 287: 10631-10638. (査読有り)
DOI: 10.1074/jbc.M111.299917
 - ⑤ Okamoto, K. (2012) Mitochondria breathe for autophagy. *EMBO J.*, 30: 2095-2096. (査読無し)
DOI: 10.1038/emboj.2011.149
 - ⑥ Kanki, T., Klionsky, D.J., Okamoto, K. (2012) Mitochondria autophagy in yeast. *Antioxid. Redox Signal.*, 14: 1989-2001. (査読有り)
DOI: 10.1089/ars.2010.3762
- [学会発表] (計12件、全て招待講演)
- ① 岡本浩二. 酵母ミトコンドリアの特性-現象論から分子機構へと迫る. 筑波大学・J-mit 共催公開シンポジウム. 筑波大学、茨城県. 2012年12月21日.
 - ② Okamoto, K. A link between mitochondria-specific autophagy and phospholipid biosynthesis. *3rd International and 12th National Symposium on Membrane Biology*. Zhuhai, China. November 7-10, 2012.
 - ③ Okamoto, K. A regulatory link between phospholipid biosynthesis and mitophagy in yeast. *9th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and 5th Conference of the Chinese Society of Mitochondrial Research and Medicine (C-mit)*. Beijing, China. November 2-5, 2012.
 - ④ Okamoto, K. Molecular basis of mitophagy in yeast: Atg32 and other players. *6th International Symposium on Autophagy*. Okinawa, Japan. October 28-November 1, 2012.
 - ⑤ Okamoto, K. Molecular mechanism of mitochondria-specific autophagy. *UCL-JSPS International Symposium on*

Mitochondria. London, UK. June 25-26, 2012.

- ⑥ Okamoto, K. Molecular mechanism of mitochondria-specific autophagy in yeast. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology*. Banff, Canada. March 19-24, 2012.
- ⑦ 岡本浩二. ミトコンドリア分別・除去システムの基本原理. 第74回 酵母研究会. キリンビール神戸工場、兵庫県. 2012年3月6日.
- ⑧ Okamoto, K. Mechanism of Atg32-mediated mitophagy in yeast. 第84回 日本生化学会大会. 京都国際会館、京都府. 2011年9月21-24日
- ⑨ Okamoto, K. Molecular mechanism of mitophagy in yeast. *Mitochondrial Dynamics: from Mechanism to Disease*. Sardinia, Italy. September 11-14, 2011.
- ⑩ 岡本浩二. 選択的ミトコンドリア分解の分子機構. 第2回 *Molecular Cardiovascular Conference II*. キロロ、北海道. 2011年9月3日.
- ⑪ Okamoto, K. Molecular mechanisms of mitophagy in yeast. *FASEB Summer Research Conferences*. Steamboat Springs, CO, USA. July 17-22, 2011.
- ⑫ Okamoto, K. Mechanism of Atg32-mediated mitophagy in yeast. *Parkinson Disease and Mitophagy*. 東京医科歯科大学、東京都. 2011年6月11日.

[図書] (計1件)

- ① 岡本浩二. マイトファジーの分子機構「オートファジー」 *DOJIN BIOSCIENCE SERIES 04*. 化学同人. 2012年.

[その他]

ホームページ等

ミトコンドリア動態学研究室ホームページ
http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/okamoto/Okamoto_Lab/

ミトコンドリア動態学研究室紹介
<http://www.omoroi-seimei.info/introduction/lab27-okamoto.html>

6. 研究組織

(1)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・特任准教授
研究者番号：40455217

(2)研究協力者

岡本 徳子 (OKAMOTO NORIKO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員
研究者番号：90568750