

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650067

研究課題名(和文)ミトコンドリア遺伝子を完全核移行させた真核生物の創成

研究課題名(英文)Generation of an eukaryote harboring genes transferred from mitochondria to the nucleus

研究代表者

岡本 浩二 (OKAMOTO, Koji)

大阪大学・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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは独自の遺伝情報(ゲノム)を有しているが、酸化ストレスによる変異を蓄積し、難治疾患であるミトコンドリア病や老化を引き起こすと考えられている。本研究では、ミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子を核へ移管し、発現することを目的とした。具体的には、ミトコンドリア遺伝子を核遺伝子化するためのコドン改変、細胞質リボソームによるタンパク質合成効率を上げるためのコドン最適化、プレ配列付加によるミトコンドリア標的化、を目指した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria possess their own genome whose oxidative stress-induced mutations are thought to cause intractable disorders such as mitochondrial disease and aging. In this study, we aimed to transfer genes from mitochondria to the nucleus and express them. Particularly, we sought to (1) change codon usage for nuclear genes, (2) optimize codon usage for efficient protein synthesis via cytosolic ribosomes, and (3) target synthesized polypeptides to mitochondria by adding a presequence.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリアDNA 酵母 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは生体内の ATP のほとんどを産生する「細胞の発電所」であり、生命の生と死を司る細胞小器官である。その構成タンパク質のほとんどは核遺伝子によってコードされている一方、独自のゲノムを持ち、電子伝達系・ATP 合成酵素サブユニットの一部を発現する。ミトコンドリアゲノムの適切な維持管理は細胞機能に必須であるにもかかわらず、高頻度でゲノムに変異が蓄積し、呼吸不全を原因とした様々な病態を発症することが知られている。これは、ミトコンドリアが活性酸素種の主要な発生源であり、ゲノムの酸化損傷を直接被る危険性が高いためである。また、核ゲノムの様々な修復機構に相当するような仕組みもない。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、肝心の治療に繋がる技術基盤についての本格的な研究は、ほとんど行われていないのが現状である。

核遺伝子にコードされたタンパク質のミトコンドリア標的化・最終目的地への仕分けは、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、哺乳類細胞の核ゲノムを自由自在に改変することは未だに容易ではない。また、哺乳類細胞ではミトコンドリア呼吸不全は死に直結するが、別の理由で起こった細胞死と区別することができないため、ゲノム改変の評価が困難である。さらに、改変個体の構造と機能を解析するには、ミトコンドリア・ゲノムレス細胞からマウスを作製する必要があるが、これにはさらなる労力と技術革新が不可欠であり、2～3年という短期間では達成できない。

私たちの研究グループは、出芽酵母をモデルとした細胞機能改変・解析システムを確立している。これらのシステムには、哺乳類培養細胞系よりも遥かに優れた点が数多くある。とりわけ、酵母の核ゲノムに対し、目的の遺伝子発現カセットをピンポイントで組み込むことが可能であり、作業完了まで約2週間しかかからない。核移行が必要な呼吸鎖関連遺伝子の数も、哺乳類細胞では13個なのに対し、酵母では7個と少ない。また、発酵性培地における酵母細胞の増殖・生存にミトコンドリア呼吸は必須ではなく、ゲノム改変に不都合があれば、それを呼吸欠損株として評価することができる。さらに、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・生理機能を解析できる。

2. 研究の目的

ミトコンドリアの生合成は、酵母からヒトまで保存された普遍的な機構である。本研究

では、出芽酵母のミトコンドリアゲノムにコードされた呼吸鎖関連の遺伝子を核内の染色体へ組み込み、細胞質で合成したタンパク質をミトコンドリアへ輸送するシステムを構築して、ミトコンドリアゲノムを持たずに呼吸増殖する「ミトコンドリア・ゲノムレス細胞」の創成を目指す。

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。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、この難病の根源であるミトコンドリア遺伝子の核遺伝子化を「戦略目標」とし、正常タンパク質のミトコンドリアへの入れ戻しによる呼吸活性の改善を「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 25 年度においては、人工遺伝子合成によるクローニングについて、検討と改良を計画した。

(2)平成 26 年度においては、人工合成遺伝子の酵母発現ベクターへのクローニング、タンパク質の翻訳、ミトコンドリア標的化について、検討と改良を計画した。

(3)平成 27 年度においては、核遺伝子化したミトコンドリアタンパク質の標的化とミトコンドリア内膜への組込みについて、検討と改良を計画した。

4. 研究成果

(1)人工合成によって作製する予定であった遺伝子に繰り返し配列が多く存在し、また酵母のミトコンドリア DNA の塩基組成は A-T に富んでいるために、遺伝子 DNA 配列の組成が極端に偏る領域があり、その部分の合成は困難であると考えられる。とりわけ、数百塩基対を超えるような長鎖の DNA は合成効率が落ちる傾向が知られている。一方、コドンの読み取り、すなわち翻訳効率は塩基配列の違いによっても影響を受ける。また、ミトコンドリアと細胞質の転写・翻訳系のコドン・プリファレンスはかなり異なる。人工合成した遺伝子は細胞質マシナリーで発現するため、翻訳効率を最大にするような改変も必要ではないかと考えた。そこで、出芽酵母における既存のコドン・プリファレンス表を参考にして、塩基配列の繰り返しや塩基組成の偏りを避けつつ、可能な範囲での最適化を

目指した。さらに、目的の遺伝子産物は複数の膜貫通ドメインをもつ疎水性の高いタンパク質である。細胞質で翻訳されたポリペプチドは親水性環境に置かれており、ミトコンドリアの外膜と内膜を透過する際のタンパク質輸送チャネルの内側もまた、親水性の表面でできている。そこで、親水性環境を介したミトコンドリアへの輸送が阻害されることなく、かつ最終目的地であるミトコンドリア内膜へ正常に組み込まれるよう、膜貫通ドメインのアミノ酸組成にも着目した。

(2) 核ゲノムコード型に改変する遺伝子の転写・翻訳に大きな問題はなくても、合成されたタンパク質のミトコンドリアへの移行が想定よりも障壁であることが考えられる。第一に、ミトコンドリア標的化シグナルとして機能するN末端のプレ配列(マトリックスへ輸送された後に切断・除去される)と目的タンパク質のマッチングが重要である可能性が高い。具体的には、プレ配列の長さや切断効率の最適化が必要である。その理由としては、目的タンパク質が複数の膜貫通ドメインをもつ疎水性の高いポリペプチド鎖から成ることが考えられる。第二に、ミトコンドリアでの膜透過を促すための、膜貫通ドメインの疎水性低下により、ミトコンドリア内膜への組込み・複合体へのアセンブリが阻害される可能性がある。そこで、置換するアミノ酸の種類を変えること、膜貫通ドメインの長さを微調整することで、タンパク質輸送チャネルでの膜透過性と内膜への組込みの双方を改善できるのではないかと考える。

(3) 核遺伝子化したタンパク質の発現レベルが、ミトコンドリアゲノム由来のタンパク質のレベルより低い場合、この原因として、疎水性の膜貫通ドメインが親水性の膜透過チャネルを効率よく通過できないこと、マトリックスへの輸送後の内膜への組込みが予想よりも難しいことが想定された。

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9件)

Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M, Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, Nakatogawa H, Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, Okamoto K. (2015) Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J.*, 34, 2703-2719. (査読有り)
DOI: 10.15252/embj.201591440

Eiyama A, Okamoto K. (2015) Protein N-terminal acetylation by the NatA complex is critical for selective mitochondrial degradation. *J. Biol. Chem.*, 290, 25034-25044. (査読有り)
DOI: 10.1074/jbc.M115.677468

Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah, AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K., Sakata Y, Otsu K. (2015) Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat. Commun.*, 6, 7527. (査読有り)
DOI: 10.1038/ncomms8527

Eiyama A, Okamoto K. (2015) PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 33, 95-101. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ceb.2015.01.002

Liu L, Sakakibara K, Chen Q, Okamoto K. (2014) Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Res.*, 24, 787-795. (査読有り)
DOI: 10.1038/cr.2014.75

Okamoto K. (2014) Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J. Cell Biol.*, 205, 435-445. (査読有り)
DOI: 10.1083/jcb.201402054

Kanki T, Okamoto K. (2014) Assays for autophagy II: Mitochondrial autophagy. *Methods Mol. Biol.*, 1163, 165-173. (査読有り)
DOI: 10.1007/978-1-4939-0799-1_11

Shiroma S, Jayakody LN, Horie K, Okamoto K., Kitagaki H. (2014) Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 1002-1012. (査読有り)
DOI: 10.1128/AEM.03130-13

Eiyama A, Kondo-Okamoto N, Okamoto K. (2013) Mitochondrial degradation during starvation is selective and temporally distinct from bulk autophagy in yeast. *FEBS Lett.*, 587, 1787-1792. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.04.030

[学会発表](計15件)

岡本浩二. ユビキチン様タンパク質 Atg8 の新規結合様式. 蛋白質セミナー. ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市). 2016年3月4日.(招待講演)

Okamoto, K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *2015 TSMRM Symposium on Mitochondrial Dysfunction in Human Diseases*. Taipei, Taiwan. December 5, 2015. (招待講演)

Okamoto K. Multiple pathways regulating mitochondria-specific autophagy. *Cold Spring Harbor Asia Conference on Mitochondria*. Suzhou, China. October 14, 2015. (招待講演)

岡本浩二. マイトファジー:ミトコンドリアを丸ごと分解する分子機構と生理機能. 第34回分子病理学研究会 神戸ホテル フルーツ・フラワー(兵庫県神戸市). 2015年7月25日.(招待講演)

岡本浩二. オートファジーが駆動する選択的ミトコンドリア分解. 第135回日本薬学会. 神戸学院大学(兵庫県神戸市). 2015年3月27日.(招待講演)

Okamoto K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *7th International Symposium on Autophagy*. Anhui, China. March 21, 2015. (招待講演)

岡本浩二. ミトコンドリアを丸ごと隔離・除去する仕組み. 第25回フォーラム・イン・ドージン「温故知新のミトコンドリア学」. 熊本ホテルキャッスル(熊本県熊本市). 2014年11月14日.(招待講演)

岡本浩二. リン脂質メチル化を介した選択的ミトコンドリア分解の制御. 第9回臨床ストレス応答学会大会, シンポジウム「オルガネラストレスとエピジェネティクス」. 岡山大学(岡山県岡山市). 2014年11月1日.(招待講演)

岡本浩二. 酵母が語る選択的ミトコンドリア分解の基本原則. 第87回日本生化学会大会, シンポジウム「細胞と個体におけるミトコンドリアの形成と機能維持」. 京都国際会館(京都府京都市). 2014年10月18日.(招待講演)

Okamoto K. An unexpected link between phospholipid methylation and mitophagy. *2nd International*

Picobiology Institute Symposium. 兵庫県立大学(兵庫県赤穂郡). October 10, 2014. (招待講演)

岡本浩二. オートファジーが駆動するミトコンドリア分解の仕組み. 第52回日本生物物理学会年会, シンポジウム「膜動態から探るミトコンドリア・ネオバイオロジー」. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市). 2014年9月26日.(招待講演)

Okamoto K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *4th Asia Pacific Protein Association Conference*. Jeju, Korea. May 18, 2014. (招待講演)

Okamoto K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *Keystone Symposium on Mitochondrial Dynamics and Physiology*. Santa Fe, USA. February 21, 2014. (招待講演)

Okamoto K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *10th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM)*. Seoul, Korea. November 5, 2013. (招待講演)

岡本浩二. リン脂質代謝の異常から垣間見えてきたマイトファジーの分子機構. 第86回日本生化学会大会, シンポジウム「ミトコンドリアワールド」. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市). 2013年9月11日.(招待講演)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/34/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 浩二 (OKAMOTO, Koji)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号: 40455217