

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15794

研究課題名（和文）ミトコンドリアタンパク質輸送における校正機構の解明

研究課題名（英文）Proofreading mechanisms in mitochondrial protein transport.

研究代表者

松本 俊介（Matsumoto, Shunsuke）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：70704295

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア外膜に局在するAAA-ATPアーゼMsp1がミトコンドリア内への移行に失敗した前駆体タンパク質を外膜から引き抜くことで、ミトコンドリア内への移行のやり直しの機会を与えるのではないかと仮説を立て、出芽酵母を用いた生化学、細胞生物学的手法により検証した。また、ミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー型タンパク質がMsp1によって引き抜かれ、GET経路を介して小胞体に移動するという、TAタンパク質の局在化における校正機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的な独創性・創造性は、生命の基本過程であるタンパク質輸送において、遺伝子の複製や翻訳などの「校正メカニズム」の存在を証明し、タンパク質輸送の校正という新しい概念を確立することにある。また、タンパク質輸送の阻害によって引き起こされる病態の解明や、治療法の開発につながることを期待される。

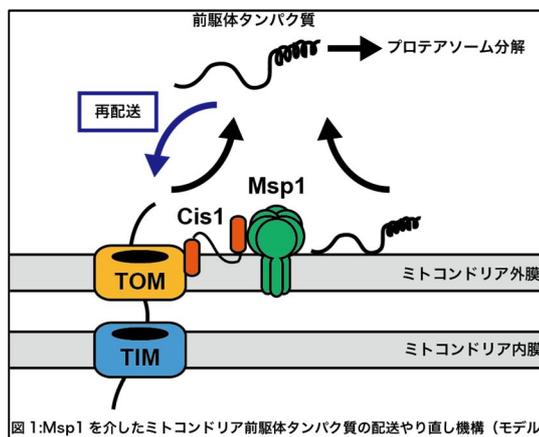
研究成果の概要（英文）：We hypothesized the AAA-ATPase Msp1 on the mitochondrial outer membrane (OM) extracts precursor proteins that fail to translocate into the mitochondria from the OM, giving them a chance to re-import into the mitochondria, and tested this hypothesis using budding yeast. We also showed that mislocalized tail-anchored (TA) proteins extracted into cytosol by Msp1 are re-located to the endoplasmic reticulum membrane via the guided-entry of TA proteins pathway.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Msp1 ミトコンドリア タンパク質輸送 配送のやり直し

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアを構成するタンパク質のほとんどは核ゲノムにコードされ、サイトゾルで前駆体として合成された後、ミトコンドリアへ運ばれる。ミトコンドリア前駆体タンパク質は、ミトコンドリア外膜と内膜に配置された膜透過装置(トランスロケータ)を通過し、外膜、膜間部、内膜、マトリクスへと仕分けられる。ストレスや遺伝子変異、細胞の老化などが原因となりトランスロケータの機能が低下すると、ミトコンドリア内に取り込まれなかった前駆体が細胞内に蓄積する。トランスロケータ機能の低下によりミトコンドリア内に移行できなくなったミトコンドリアタンパク質前駆体は、サイトゾル、ミトコンドリア外膜、そしてトランスロケータの膜透過チャンネルのいずれかに蓄積しうる。サイトゾルに蓄積した前駆体については、細胞応答を引き起こしてタンパク質の合成量を低下させ、プロテアソーム関連遺伝子の発現を上昇させる[1]。トランスロケータの膜透過チャンネルに蓄積した前駆体については、小胞体(ER)とミトコンドリアに二重局在する Ubx2 により呼び込まれた Cdc48 によりチャンネルから引き抜かれ、おそらくプロテアソームにより分解される経路が存在する[2]。トランスロケータの機能低下により外膜に蓄積した前駆体については、Msp1 が Cis1 と協力して、外膜からサイトゾルのプロテアソーム分解に回す経路が発見された [3](図 1)。しかしながら、どのような前駆体がサイトゾルに蓄積してプロテアソームで分解され、どのような前駆体が外膜表面に蓄積して Msp1 依存的に分解されるのか、また Msp1 によって外膜から引き抜かれた前駆体全てがプロテアソーム経路に回るのか否か、など多くの問題が未解決になっている。これまでに申請者は、Msp1 がミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー(TA)タンパク質を膜から引き抜くことで分解だけでなく、配送のやり直しを機会を与える因子として機能することを見出した[4]。こうした Msp1 の校正機能のアナロジーとして、Msp1 はミトコンドリア内へ移行できなかった前駆体を外膜から引き抜き、ミトコンドリア内への移行のやり直しの機会(校正を行う)を与えるのではないかと考えた(図 1)。



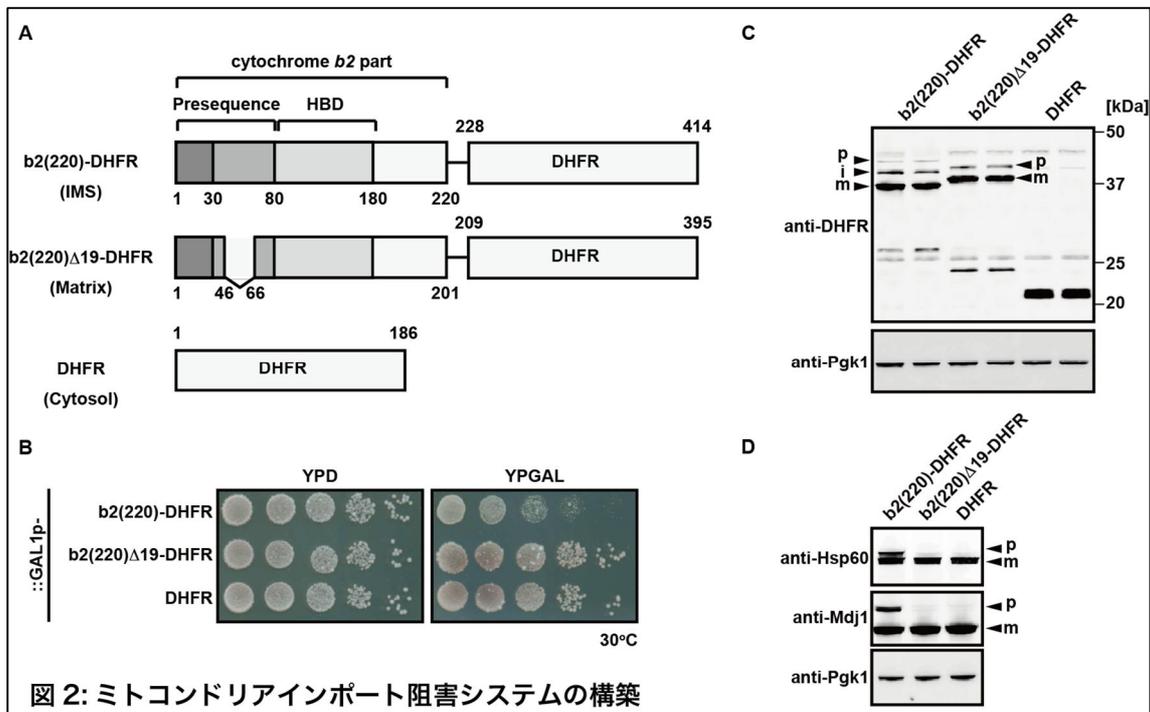
[1] Boos, F. *et al.*, *Nature Cell Biology*, **21**:793-794., 2019, [2] Mårtensson, C.U. *et al.*, *Nature*, **569**:679-683., 2019, [3] Weidberg, H. & Amon, A. *Science*, **360**:eaan4146.2018, [4] Matsumoto, S. *et al.*, *Molecular Cell* **76**:191-205., 2019

2. 研究の目的

これまで、トランスロケータの機能低下などによりミトコンドリア移行に失敗した前駆体は、サイトゾルまたはミトコンドリア外膜に蓄積し、サイトゾルのプロテアソーム系によって速やかに分解されると考えられてきた[1]。しかし、申請者の予備的実験の結果から、サイトゾルに蓄積した前駆体のすべてがプロテアソームによる分解を受けるのではなく、一部の前駆体はミトコンドリアへ移行できる状態を保ったままサイトゾルに蓄積していることが示唆された。この予備的実験結果にもとづいて、申請者は、ミトコンドリア内への移行に失敗した前駆体について、ミトコンドリア内への再度の取り込み、すなわち配送のやり直しを与えることが Msp1 の実際の機能であると考え、Msp1 によるミトコンドリア内でのタンパク質配送校正の分子基盤の解明を目的とした。

3. 研究の方法

申請者は、出芽酵母の細胞内にミトコンドリアタンパク質前駆体を蓄積させることを目的とし、シトクロム b2 の N 末端領域(1-220 番目)とマウス由来ジヒドロ葉酸還元酵素 DHFR を融合させた人工タンパク質 b2(220)-DHFR をガラクトース誘導型 GAL1 プロモーターにより過剰発現させる系を構築した(図 2A)。b2(220)-DHFR は外膜を通過した後、内膜に挿入、膜間部でプロセシングされ、膜間部に局在する。また、コントロールとして b2(220)-DHFR の膜貫通配列を除去し、マトリクスに局在する b2(220) Δ 19-DHFR、サイトゾルに局在する DHFR を過剰発現する酵母株も合わせて作製した(図 2A)。これら人工遺伝子をガラクトースを炭素源とする培地で誘導し、酵母細胞の生育、前駆体タンパク質の蓄積、蓄積した前駆体のプロテアソーム分解の関与、Msp1 依存的にクリアランスされる前駆体の同定を目指した。また、申請者は、Msp1 がミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー型(TA)タンパク質を外膜から引き抜かれた後に、ER への移動するを促すことで除去することを報告している[4]。本研究では、Msp1 によって外膜から引き抜かれた TA タンパク質が ER に移行する分子機構を解析した。



4. 研究成果

(1) b2(220)-DHFR 過剰発現酵母株を用いたミトコンドリアインポート阻害システムの構築
 申請者は、b2(220)-DHFR、b2(220)D19-DHFR、DHFR を過剰発現する酵母株についてガラクトース寒天培地上での生育を調べた結果、b2(220)-DHFR 過剰発現株において、顕著な生育の阻害を示すことを明らかにした(図 2B)。次に、ガラクトース液体培地にて、これら人工タンパク質を過剰発現させ、それら細胞から抽出液を調製し、これら人工タンパク質の発現を抗 DHFR 抗体を用いたウエスタンブロットによって確認した(図 2C)。そして、ミトコンドリアマトリクスに局在する Hsp60 および Mdj1 を指標に、前駆体の蓄積を調べたところ、b2(220)-DHFR を過剰発現した細胞では、前駆体の蓄積が検出された(図 2D)。

(2) プロテアソームにより分解される前駆体タンパク質の探索

申請者は、b2(220)-DHFR 過剰発現によって蓄積した前駆体の中にプロテアソーム分解を受けるものは何かを探索した。多剤排出ポンプ遺伝子 *PDR5* を欠損した酵母株内で、b2(220)-DHFR をガラクトース液体培地で誘導し、その後プロテアソーム阻害剤 MG132 処理を行なった。MG132 を 1 時間処理した後、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加し、チェイス実験を行うことで、前駆体の蓄積と安定性を調べた。その結果、Hsp60 や Mdj1 では MG132 処理によって前駆体の顕著な蓄積が見られなかった。Hsp60 前駆体はチェイス期間安定であるのに対して、Mdj1 前駆体は速やかに消失した。これは、Hsp60 前駆体は、プロテアソーム分解を受けず、かつミトコンドリアに取り込まれない状態となりサイトゾルで蓄積している、そして Mdj1 前駆体はマトリクスに取り込まれたことを示唆している。一方、申請者はシトクロム bc1 複合体の構成タンパク質である Rieske タンパク質 (Rip1) 前駆体が MG132 処理で顕著に蓄積し、プロテアソーム分解を受けることを見出した。チェイスにより Rip1 前駆体の消失するのは、プロテアソーム分解とミトコンドリアへの取り込みの 2 つの経路が混在するためと考えられる。

(3) Msp1 依存的にクリアランスされる前駆体の探索

申請者は b2(220)-DHFR 過剰発現によって蓄積した前駆体の中に Msp1 に依存して、ミトコンドリアへの取り込みが促進されるもの、もしくはプロテアソーム分解が促進するものが何か探索した。まず、野生型酵母 (WT) と *msp1Δ* 株に b2(220)-DHFR を過剰発現させ、生育を栄養豊富な YP 培地と合成培地 (SC 培地) で調べたところ、b2(220)-DHFR を過剰発現による生育阻害効果が大きくなるのがわかった。さらに、YP 培地よりも SC 培地の方が、*msp1Δ* の b2(220)-DHFR 過剰発現による生育の阻害が顕著であった。WT と *msp1Δ* を YP 培地と SC 培地で b2(220)-DHFR を誘導し、シクロヘキシミドチェイス実験を行なった結果、SC 培地で培養した時に、*msp1Δ* の Mdj1 前駆体の除去が野生型と比べて遅くなるのがわかった。一方、Rip1 前駆体については、YP 培地と SC 培地で Msp1 には依存せず、除去されることがわかった。

(4) ミトコンドリアに誤配送された TA タンパク質の校正機構の解析

Msp1 のモデル基質 Pex15Δ30 (ペルオキシソームに局在する TA タンパク質 Pex15 の C 末 30 アミノ酸を欠失した変異体) が Msp1 依存的に ER へ移動する様子をタイムラプスで観察した。次に、GET 経路の変異体では、Msp1 に依存した Pex15Δ30 の ER 局在化が起こらないことを見出し、Msp1 依存的に Get3 と Pex15Δ30 がサイトゾルで相互作用することを免疫沈降実験により示

した。オーキシン分解系を用いて Get3 を急速分解し、内在性の ER 局在型 TA タンパク質 Frt1 をミトコンドリア外膜に誤配送させる系を構築した。そして、誤配送 Frt1 が Msp1-Get3 依存的に ER へ再配送されることをタイムラプス観察により示した。以上の結果をまとめて、論文発表を行なった (Matsumoto, S., Ono, S., *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2022)。

(5) 国内研究者との共同研究

ミトコンドリアの機能不全に起因する細胞障害、異所性代謝ストレスの分子機構を解明した (Nishino, K., *et al.*, *Science advances*, 2023)。本共同研究において、申請者が構築したミトコンドリアインポート阻害システムが使用された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto Shunsuke, Ono Suzuka, Shinoda Saori, Kakuta Chika, Okada Satoshi, Ito Takashi, Numata Tomoyuki, Endo Toshiya	4. 巻 221
2. 論文標題 GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202104076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202104076	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 Matsumoto Shunsuke, Endo Toshiya	4. 巻 173
2. 論文標題 Proofreading of protein localization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 265 ~ 271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac097	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 Matsumoto Shunsuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Msp1-mediated proofreading mechanism for localization of tail-anchored membrane proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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） 10.1093/jb/mvad025	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 Nishio Kazuya, Kawarasaki Tomoyuki, Sugiura Yuki, Matsumoto Shunsuke, Konoshima Ayano, Takano Yuki, Hayashi Mayuko, Okumura Fumihiko, Kamura Takumi, Mizushima Tsunehiro, Nakatsukasa Kunio	4. 巻 9
2. 論文標題 Defective import of mitochondrial metabolic enzyme elicits ectopic metabolic stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadf1956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adf1956	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本俊介、小野鈴花、遠藤斗志也
2. 発表標題 膜タンパク質局在化における配送校正機構の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本俊介、小野鈴花、遠藤斗志也
2. 発表標題 ミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー型タンパク質の配送校正機構
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本俊介
2. 発表標題 テイルアンカー型タンパク質の局在化における配送校正機構の解析
3. 学会等名 令和4年度日本生化学会 九州支部例会 (WEB開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本俊介
2. 発表標題 ミトコンドリアAAA-ATPアーゼMsp1による誤配送タンパク質の配送校正機構
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本俊介
2. 発表標題 Proofreading of protein mislocalization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunsuke Matsumoto
2. 発表標題 Proofreading of protein mislocalization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1
3. 学会等名 Zoom Workshop on Mitochondrial Biogenesis
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------