

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04784

研究課題名(和文) 選択的ミトコンドリア分解の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanisms of selective mitochondrial degradation

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) 13,500,000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解するプロセスは、生物種を超えて保存された普遍的な機構であり、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。マイトファジーはミトコンドリアの質・量管理に貢献しており、その破綻は様々な病態を引き起こすと考えられている。本研究では、出芽酵母のマイトファジーを駆動するミトコンドリア外膜タンパク質Atg32の量と局在の制御について解析を進めた。その結果、マイトファジーが促進されるより前の段階において、Atg32の一部は小胞体へと運ばれ、小胞体関連分解経路によりユビキチン化されることで、量が負に制御され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、マイトファジーが誘導される際、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「分別マーク」の発現が転写レベルで促進され、ミトコンドリア表面に厳密に標的化されて蓄積すること、リン酸化などの翻訳後修飾によって分別マークの活性が調節されていることがわかってきた。一方、本研究は、ミトコンドリアの外膜へアンカーされるべき分別マークの一部が、別のオルガネラである小胞体に運ばれてユビキチン化され、プロテアソームによる分解を受けることで、マイトファジーが負に制御されている可能性を提起している。小胞体関連分解のマイトファジーへの関与も、これまでにない新規の概念である。

研究成果の概要(英文)：Selective degradation of mitochondria as a whole organelle is a fundamental mechanism conserved beyond species. This autophagy-dependent process, termed mitophagy, contributes to mitochondrial quality and quantity control, and defects in mitophagy are thought to be associated with various pathologies. In this study, we sought to analyze the level and localization of Atg32, a mitophagy-promoting mitochondrial outer membrane protein in budding yeast. We found that prior to acceleration of mitophagy, a fraction of Atg32 is targeted to the endoplasmic reticulum (ER) and ubiquitinated via the ER-associated degradation pathway, resulting in negative regulation of Atg32 protein levels.

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 ユビキチン化 小胞体関連分解 出芽酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは「細胞の発電所」とも呼ばれるエネルギー供給の要であり、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る。一方ミトコンドリアは、そのエネルギー変換の過程で生じる活性酸素種に直接曝されている。過去の知見から、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(酵母や植物では液胞)に運ばれて除去されると考えられている。この機構は、細胞の自食作用「オートファジー」の系(図1)を利用していることから「マイトファジー」と呼ばれ、生命科学分野の中で非常に注目されている。最近、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役割が示唆された。このように、マイトファジーの重要性が明白となる一方、病態を理解するのに不可欠な分子機構は未だ多くの謎に包まれている。

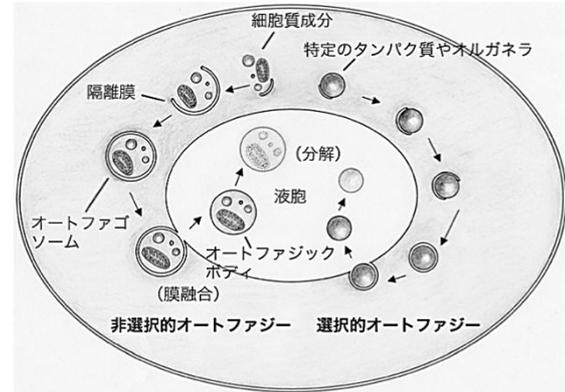


図1. オートファジーの膜動態

マイトファジーは、酵母からヒトまで保存された普遍的な機構である。研究代表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、その仕組みの一端を明らかにするとともに、分解の選択性を規定している「分別マーク・タンパク質」Atg32を世界に先駆けて発見した。Atg32はミトコンドリア外膜に局在し、Atg8およびAtg11と結合する(図2)。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。最近、Atg32と同様な仕組みでマイトファジーに機能すると予想される様々な哺乳類タンパク質が同定されている。興味深いことに、それらのうち一つは、Atg32欠損酵母のマイトファジーを部分的に回復する能力を有しており、機能性ホモログである可能性が示唆された。これらの知見から、哺乳類にはAtg32タイプの分別マーク・タンパク質が存在しており、生物種を超えて保存された共通原理によりマイトファジーを促進していると想定できる。

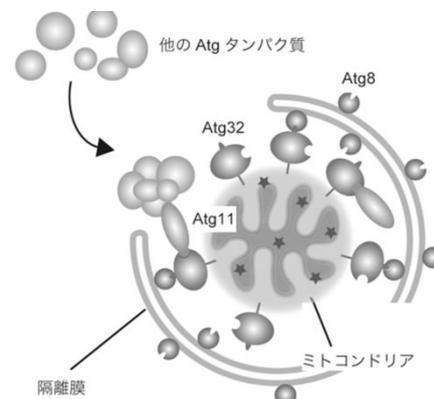


図2. マイトファジーにおけるミトコンドリア隔離のモデル

2. 研究の目的

本研究の目的はマイトファジーの分子機構を解明することであり、この「オルガネラ丸ごと除去システム」を人為的に制御する技術基盤の確立へ繋げる。これまでの研究で、マイトファジーの初期段階で、Atg32に特異的な高分子量のバンドが出現することを見出している。研究期間内では、Atg32のタンパク質レベルと局在の制御に関与する小胞体(ER)タンパク質に焦点を当て、以下のことを達成してゆく。

- (1) Atg32がユビキチン化されているかを調べるとともに、この翻訳後修飾に関わる因子(ユビキチンリガーゼ)の同定とその欠損変異体の解析を行う。
- (2) 小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)システムのユビキチンリガーゼDoa10とAtg32の関係性を調べる。
- (3) Atg32のERへの標的化に働く因子を同定し、Atg32のユビキチン化における同因子の役割を明らかにするとともに、ERADによるAtg32の分解がもつ生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 変性-非変性条件下での2段階アフィニティーブルダウンアッセイにより、Atg32がユビキチンに共有結合しているかを調べる。加えて、基質タンパク質にユビキチンを付加するE3リガーゼの遺伝子欠損変異体を系統的に作成し、Atg32のタンパク質レベルおよびマイトファジーに影響があるかどうか解析する。
- (2) Doa10を含むユビキチンリガーゼ複合体ERAD-Cの構成因子の遺伝子欠損変異体を作成し、Atg32のタンパク質レベルおよびマイトファジーに影響があるか解析する。さらに、免疫共沈降アッセイにより、Doa10とAtg32が相互作用するかどうか調べる。

(3) Atg32 に GFP を付加した *doa10* 欠損変異株をベースに、膜タンパク質の ER への標的化に働く因子を系統的に破壊し、Atg32 の ER 局在が消失する変異体を蛍光顕微鏡で同定するとともに、Doa10-Atg32 相互作用への影響を免疫共沈降アッセイにより解析する。また同様に、選択的 ER 分解 (ER ファジー) に必須な Atg39 および Atg40 を二重破壊し、*doa10* 欠損で ER に蓄積した Atg32 が ER ファジーを駆動するかどうか調べる。

4. 研究成果

(1) 非発酵性炭素源を含む呼吸増殖培地で出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株を液体培養すると、対数増殖中期 (培養開始後 15-21 時間) で Atg32 のタンパク質レベルが一過的に上昇する。この際、マイトファジーは誘導初期の段階であり、ミトコンドリアの分解量はピーク時の 10% 以下でまだ少ない。興味深いことに、Atg32 の発現パターンをウェスタン解析で調べたところ、プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下の培養でタンパク質レベルが約 1.4 倍増加することがわかった。この結果は、Atg32 の一部がユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解されている可能性を提起している。そこで、液胞加水分解酵素欠損変異体 (*pep4 prb1* ダブルノックアウト) をベースとして、マイトファジー活性を損なわずに *ATG32* 遺伝子へ 8His-3STREP タグを付加した *ATG32-(8His-3STREP)_n* ノックイン株を作成し、myc タグを付加したユビキチン発現プラスミドを導入した。マイトファジー誘導条件下で培養したこの酵母株からミトコンドリア濃縮画分を単離・可溶化し、6M 尿素を含む変性条件バッファーと Ni-NTA セファロースビーズを用いて、Atg32-(8His-3STREP)_n をアフィニティー精製した。次に、同精製サンプルを myc 抗体結合アガロースビーズと混合した後、myc-Ub を免疫沈降し、溶出サンプルをウェスタン解析した。その結果、Atg32-(8His-3STREP)_n が myc-Ub に共有結合した状態でプルダウンされることが明らかとなった。このことは、Atg32 の一部がユビキチン化されることを示唆している。

上記の結果を受け、出芽酵母のユビキチン E3 リガーゼをコードする遺伝子を系統的に破壊し、Atg32 の発現パターンが変化するかどうか検討した。予想外なことに、ERAD システムで機能する膜貫通型酵素 Doa10 を欠損すると、Atg32 のタンパク質レベルが約 1.6 倍増加することがわかった。また、呼吸増殖の初期段階において、マイトファジーが野生型の 4 倍程度上昇していることを見出した。これらの知見から、Atg32 は Doa10 依存的にユビキチンを付加され、プロテアソームによる分解を受けることで、対数増殖中期のタンパク質レベルが低く抑えられ、マイトファジーも抑制されていると考えられる。

(2) Doa10 は、酵母からヒトまで保存されたユビキチン E3 リガーゼ複合体 ERAD-C の触媒サブユニットである。Doa10 が ERAD-C として機能し、Atg32 のユビキチン化に作用しているかどうかを調べるため、ERAD-C の他の構成因子 Ubc6 および Ubc7 の欠損変異体を作成し、Atg32 のタンパク質レベルとマイトファジーを解析した。その結果、*doa10* 欠損変異株と同様に、呼吸条件下の対数増殖中期における Atg32 のタンパク質レベルは 1.4-1.8 倍増加し、マイトファジーは野生型の 2-3 倍上昇していることがわかった。また、E3 リガーゼ活性を欠失した Doa10(C39S)変異体を発現させても、Atg32 のタンパク質レベルおよびマイトファジーが抑制されることが明らかとなった。これらのデータは、ERAD-C が Doa10 の酵素活性を介して Atg32 をユビキチン化し、対数増殖中期におけるマイトファジーのブレーキとして機能する可能性を提起している。

そこで、免疫共沈降アッセイを用いて、マイトファジー誘導初期の Doa10 と Atg32 の相互作用を解析した。まず、Doa10-9myc および Atg32-3HAn を発現する *pep4 prb1* 二重欠損酵母株を作成・培養し、化学架橋剤で両者の結合を固定、ミトコンドリア濃縮画分を単離・可溶化し、HA 抗体結合アガロースビーズと混合した後、Atg32-3HAn を免疫沈降し、溶出サンプルをウェスタン解析した。その結果、Doa10-9myc がプルダウンされることがわかった。次に、化学架橋剤を用いない条件下で同様の実験を行い、Doa10(C39S)-9myc が Atg32-3HAn と免疫共沈降することを確認した。これらの知見は、Doa10 が Atg32 を基質タンパク質として捕捉し、ユビキチン付加に機能していることを支持している。

(3) マイトファジー活性を損なわずに *ATG32* 遺伝子へ 3GFP タグを付加した *ATG32-3GFP_n* ノックイン株を作成し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、*doa10* 欠損で Atg32-3GFP_n の一部が ER パターンを示すことがわかった。そこで、膜タンパク質の ER への標的化に働く因子を系統的に破壊した結果、ER 翻訳後膜挿入経路 (guided entry of tail-anchored proteins, GET) の欠損により、Atg32-3GFP_n の ER 局在が消失することを突き止めた。興味深いことに、*get3* 欠損変異株において、Doa10(C39S)-9myc と Atg32-3HAn の相互作用が顕著に減少することを見出した。これらのデータは、リボソームでの合成後、Atg32 の一部が GET 経路を介して ER に標的化され、Doa10 に捕捉されてユビキチンを付加されるシナリオと一致している。

次に、Doa10 による Atg32 のユビキチン化の生理的意義を検討するため、ER に局在した Atg32 が ER 分解を駆動するかどうかを調べた。ER ファジーについては、Atg39 および Atg40 が特異的かつ必須な役割を果たしていることがわかっている。そこで、*doa10 atg39 atg40* 三重欠損酵母株を作成・培養し、Atg32 を過剰発現したところ、野生株の 10% 程度と低いものの、ER ファジーが誘導されることを見出した。この ER 分解は、全てのオートファジー関連経路に必須な Atg7 の欠損によってキャンセルされる。すなわち、Doa10 は Atg32 をユビキチン化することで、マイトファジー駆動因子による分解から ER を保護していると想定できる。

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 5件／うちオープンアクセス 3件）

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 19
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 1 ~ 14
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
1. 著者名 Murakawa Tomokazu, Okamoto Koji, Omiya Shigemiki, Taneike Manabu, Yamaguchi Osamu, Otsu Kinya	4. 巻 26
2. 論文標題 A Mammalian Mitophagy Receptor, Bcl2-L-13, Recruits the ULK1 Complex to Induce Mitophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 338 ~ 345.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.12.050	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 該当する

1. 著者名 Yamada Tatsuya, Murata Daisuke, Adachi Yoshihiro, Itoh Kie, Kameoka Shoichiro, Igarashi Atsushi, Kato Takashi, Araki Yoichi, Haganir Richard L., Dawson Ted M., Yanagawa Toru, Okamoto Koji, Iijima Miho, Sesaki Hiromi	4. 巻 28
2. 論文標題 Mitochondrial Stasis Reveals p62-Mediated Ubiquitination in Parkin-Independent Mitophagy and Mitigates Nonalcoholic Fatty Liver Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 588 ~ 604.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2018.06.014	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 該当する

1. 著者名 Onishi Mashun, Nagumo Sachiyo, Iwashita Shohei, Okamoto Koji	4. 巻 503
2. 論文標題 The ER membrane insertase Get1/2 is required for efficient mitophagy in yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 14 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.114	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 502
2. 論文標題 The TORC1 signaling pathway regulates respiration-induced mitophagy in yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 76 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.123	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 Xu Xueyan, Okamoto Koji	4. 巻 496
2. 論文標題 The Nem1-Spo7 protein phosphatase complex is required for efficient mitophagy in yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 51 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.163	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 Kameoka Shoichiro, Adachi Yoshihiro, Okamoto Koji, Iijima Miho, Sesaki Hiromi	4. 巻 28
2. 論文標題 Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 67 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tcb.2017.08.011	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 Nagumo Sachiyo, Okamoto Koji	4. 巻 1759
2. 論文標題 Investigation of Yeast Mitophagy with Fluorescence Microscopy and Western Blotting	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2017_11	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 Eiyama Akinori, Okamoto Koji	4. 巻 1567
2. 論文標題 Assays for Mitophagy in Yeast	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 337 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-6824-4_20	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

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

1. 発表者名 Okamoto Koji
2. 発表標題 Regulation of mitochondrial clearance via ER factors
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018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 Keystone Symposium on Mitochondrial Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okamoto Koji
2. 発表標題 Upstream events regulating Atg32-mediated mitophagy
3. 学会等名 EMBO Workshop on Mitochondrial Quality Control (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Okamoto Koji
2. 発表標題 Signaling pathways regulating mitophagy in yeast
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference on Mitochondrial Biogenesis and Dynamics in Health, Disease and Aging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/okamoto/Okamoto_Lab/
--

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	英山 明慶 (Eiyama Akinori)		

6. 研究組織（つづき）

	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	南雲 吉代 (Nagumo Sachiyo)		
研究協力者	大西 真駿 (Onishi Mashun)		