

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02435

研究課題名（和文）父性ミトコンドリアの選択的分解を規定する分子基盤とその生物学的意義

研究課題名（英文）Molecular mechanisms and physiological roles for selective degradation of paternal mitochondria

研究代表者

佐藤 美由紀（SATO, Miyuki）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：70321768

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）：オートファジーは細胞の一部を膜で囲い込んで分解する仕組みである。モデル生物・線虫では、精子に由来する父性ミトコンドリアが受精卵において選択的オートファジーにより除去され、これがミトコンドリアDNA母性遺伝の仕組みとして働く。この過程で機能する新しいオートファジーアダプターALLO-1について解析を行い、ALLO-1は受精直後に標的上に局在化を開始すること、この局在にはC末端が重要であることを明らかにした。また、ALLO-1はオートファジーの開始を制御するATG1複合体を標的にリクルートすることも見出し、これが標的上での局所的なオートファゴソーム膜形成につながっていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアDNAの母性遺伝の仕組みは生物学の長年の謎であったが、オートファジーによって父性ミトコンドリアが選択的に分解されることが明らかとなった。次の課題は、「どのように父性ミトコンドリアだけが識別されるのか」という点である。本研究により選択性を決める鍵分子であるALLO-1の機能について理解が進み、標的周囲にオートファゴソーム膜を形成させる仕組みを明らかにした。また、この仕組みは線虫だけでなく哺乳類の選択的オートファジーとも類似性があり、種を超えて保存された仕組みであることも示唆された。

研究成果の概要（英文）：In *Caenorhabditis elegans* embryos, paternally provided organelles, including mitochondria, are eliminated by selective autophagy, and this serves as the mechanism by which mitochondrial DNA is inherited maternally. We further identified an autophagy adaptor ALLO-1 that controls this process. ALLO-1 localizes on the paternal organelles very shortly after fertilization and this localization depends on its C-terminal region. We also found that ALLO-1 physically interacts with not only LGG-1, the worm homolog of LC3/ATG8 family, but also a component of the ATG1 complex. ALLO-1 is also required for recruitment of the ATG1 complex on the substrates. Our results suggest that this ALLO-1-dependent recruitment of the ATG1 complex could explain how the autophagosome formation is initiated on substrates.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー ミトコンドリア 母性遺伝 線虫 *C.elegans*

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菌の共生を起源に持つオルガネラであり、内部に独自の mtDNA を持つ。mtDNA には呼吸鎖構成因子など、ミトコンドリア機能に必要な遺伝子がコードされており、ヒトにおける mtDNA の変異は脳機能や筋力の低下など深刻な症状を引き起こすミトコンドリア病の原因となることが知られている。ヒトを含む多くの生物において mtDNA は母性遺伝するが、その仕組みは長い間不明であった。私たちは線虫 *C. elegans* を用いてこの問題の解明を試み、精子から受精卵に持ち込まれた父性ミトコンドリアがオートファジーによって選択的に分解されること、さらにこの分解が mtDNA の母性遺伝の仕組みであることを世界に先駆けて発見した[1、2]。その後、この現象はハエやマウスでも保存されていることが示唆されてきている[3、4]。線虫においては精子由来するもうひとつのオルガネラ、MOs (精子特異的のリソソーム様オルガネラ)も、父性ミトコンドリアと同時にオートファジーにより分解されることから、この現象は非自己オルガネラのオートファジーととらえることができる。そこでわれわれはこの現象を **allogeneic (non-self) organelle autophagy: allophagy** と命名した。2016年には Xue らにより、受精後に父性ミトコンドリア膜の急激な変性と膜電位の低下が起きること、さらにこの変性にミトコンドリア内部に局在するエンドヌクレアーゼ CPS-6 が関与することが報告された[5]。しかし、父性オルガネラを識別し、オートファジーへと導く仕組みは未解明であった。

選択的オートファジー経路ではオートファジーアダプターと呼ばれる因子が標的を認識し、さらにアダプターとオートファジー実行因子である LC3 との結合を介して標的周囲に隔離膜形成が誘導される。allophagy においては既知のアダプターの関与が認められなかったが、われわれの研究により、allophagy で働く新しいオートファジーアダプター・ALLO-1 が同定された[6]。ALLO-1 は LIR(LC3 interacting region)モチーフを介して LGG-1 (線虫 LC3 ホモログ) と直接結合することができるが、それ以外には既知の機能ドメインを持たない新規タンパク質であった。さらに、allophagy には IKKE-1 も関与することが明らかとなった[6]。IKKE-1 は哺乳類の TBK1/IKK ϵ ファミリーに相同性を示すキナーゼであり、そのキナーゼ活性が allophagy に必須であることなども明らかにした。哺乳類において TBK1 は自然免疫における重要なシグナル因子であるが、不良

ミトコンドリアや感染細菌の選択的オートファジーにおいても機能することが報告されており[7、8]、オートファジーにおける TBK1/IKKE-1 の役割は種を超えて保存されていることがわかった。このように研究は進展してきたが、ALLO-1 はこれまで全く解析されていないタンパク質であったため、その機能に関する情報は非常に限られていた。

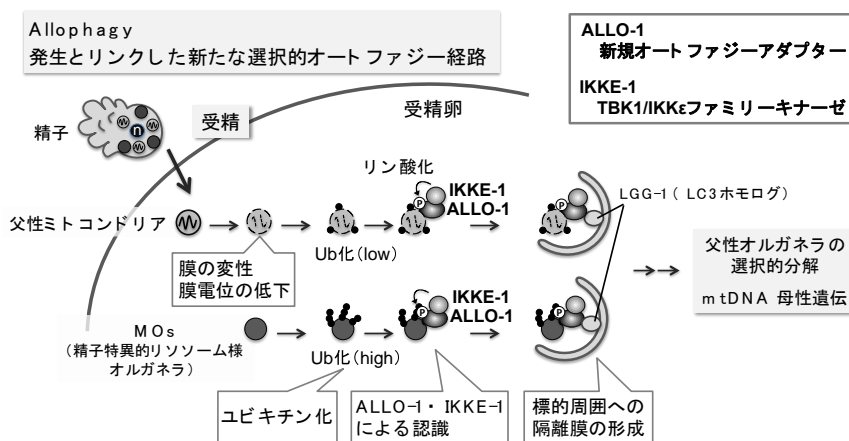


図1. これまでに明らかとなった allophagy による父性オルガネラ分解のメカニズム

2. 研究の目的

本研究ではわれわれのこれまでの研究をさらに発展させ、ALLO-1 の機能ドメインの同定、ライプライミング、相互作用因子の探索など多角的な解析により、ALLO-1 や IKKE-1 がどのように父性オルガネラを認識し、その周囲にオートファゴソーム膜を形成するのか、その分子メカニズムの詳細を明らかにすることにした。また、*allo-1* や *ikke-1* の変異体解析から生殖腺

以外での機能を探索し、個体での生理機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ALLO-1 のアイソフォームや各種部分欠損変異体を線虫で発現し、局在性、*allo-1* 破壊株の相補活性から ALLO-1 の機能ドメインを明らかにする。
- (2) 線虫の受精の瞬間をモニターできるライブイメージング系を構築し、ALLO-1 や IKKE-1、オートファジー因子の局在化様式や時系列の詳細を解析する。また各種変異体における局在性の変化も解析し、関連因子群のヒエラルキーを明らかにする。
- (3) ALLO-1 と物理的に相互作用する因子を質量分析や酵母ツーハイブリッド法などを用いて同定し、ALLO-1 の局在性や局所的オートファジーの制御に関わる因子を探索する。
- (4) *allo-1* や *ikke-1* 変異体の生殖腺以外での表現型を探索し、個体における生理機能を解明する。

4. 研究成果

- (1) ALLO-1 の各種欠損変異体の解析から、C 末端が基質への局在化に必須であること、一方 N 末端は LGG-1 や IKKE-1 との結合に働くことがわかった。さらに、線虫では C 末端の配列が異なるアイソフォーム a・b がデータベース上に存在した。アイソフォーム特異的抗体を作製し、線虫での発現を確認したところ、卵母細胞でアイソフォーム a・b がともに発現していることを確認した。さらに、抗体染色や GFP 融合遺伝子を用いた解析から、ALLO-1a は MO s へ、ALLO-1b は父性ミトコンドリアに優先的に局在化することを見出し、C 末端の配列の違いが基質認識に重要であることが明らかになった。
- (2) 線虫生殖腺のライブイメージング系を構築し、ALLO-1 の父性オルガネラへの局在化を詳細に観察した。その結果、ALLO-1 は受精直後、わずか数十秒以内に父性ミトコンドリアへ局在化し、その数分後から LGG-1 の局在化が観察された。また、IKKE-1 やオートファジーの開始を制御する ATG1 複合体構成因子は LGG-1 より早いタイミングで局在化が始まり、その局在化は *allo-1* 変異体では完全に失われていた。一方で、ALLO-1 の受精直後の局在化は IKKE-1 やオートファジー因子を必要としないことから、ALLO-1 が基質特異性を決めることが確認された。

さらに、ALLO-1 の局在化には①上述の受精直後の基質上への局在化と、②その後数分間にわたりさらに多くの ALLO-1 が集積するという少なくとも二つのステップがあり、②の集積のステップは IKKE-1 や ATG1 複合体を必要とすることがわかった。ALLO-1 の基質上への局在化がこれら因子をリクルートし、それによってさらに多くの ALLO-1 が集積するというフィードバック機構により、オートファジーの開始が制御されている可能性が考えられた (図 2)。また、IKKE-1 のリン酸化活性がこの反応に必要なことから、何らかの因子のリン酸化を介した機構であることも示唆された。

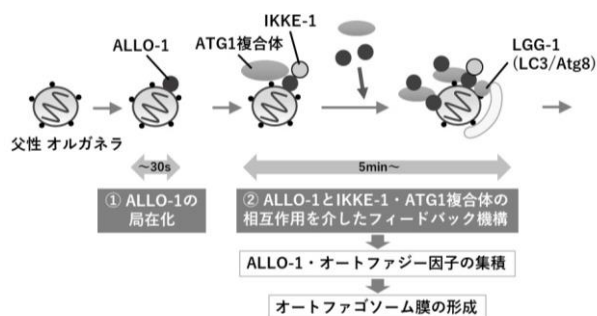


図 2. ALLO-1 を介した局所的なオートファゴソーム膜形成機構のモデル

- (3) 生殖腺において GFP-ALLO-1 a・b 両方または各アイソフォームを特異的に発現する線虫株から受精卵を回収し、GFP-ALLO-1 を免疫沈降した後、質量分析により相互作用因子の同定を行った。免疫沈降については異なるバッファー条件や、架橋剤処理についても検討した。その結果、相互作用因子の候補を複数同定し、その中にはアイソフォーム特異的な相互作用因子も含まれていた (図 3)。これら因子群については RNAi によるノックダウンを行い、*allophagy* への影響を調べている。しかし、現在までのところ単独で強い表現型を示す因子は同定されていない。線虫では精子は RNAi 耐性の細胞であることが知られて

おり、精子で機能するような因子の場合はこの方法では評価できない可能性がある。そのため、変異体を取り寄せる、またはゲノム編集で作製し、再度検討を行う計画である。

ALLO-1 との酵母ツーハイブリッド法により、ALLO-1 は LGG-1 に加えて ATG1 複合体構成因子とも結合することを見出した。(2)の結果と合わせると、この直接的相互作用が ALLO-1 による ATG1 複合体構成因子の局在化のメカニズムであると考えられ、オートファジーアダプターの新しい役割を明らかにできた。最近、類似の機構が哺乳類のオートファジーアダプターについて報告されてきており[9]、この機構は種を超えて保存された選択的オートファジーの基本的仕組みであると考えられる。

- (4) ALLO-1 や IKKE-1 は生殖腺以外にも筋肉や腸細胞など多くの体細胞で発現していた。そこで、体細胞でのマイトファジーに関わる可能性を検証するため、ミトコンドリア局在化シグナルを付加した GFP を筋肉で発現する線虫株と *allo-1*、または *ikke-1* 変異体を掛け合わせてミトコンドリア形態を観察した。変異体では膨潤した形態を示すミトコンドリアが増加する傾向が見られ、ミトコンドリアの turnover が阻害されている可能性が考えられた。しかし、このマーカー株では恒常的な低レベルのマイトファジーを定量的に観察することが困難であったので、新しいマイトファジー観察系を立ち上げている。

本研究により、ALLO-1 の選択的オートファジーにおける新しい役割が明らかになった。また、ALLO-1 の機能ドメインが明らかになり、基質認識については C 末端配列が重要であることが判明した。相互作用因子の探索や個体における表現型解析については今後も継続的に解析を進める予定である。

<引用文献>

- [1] Sato M and Sato K. (2011) *Science* 334: 1141-4.
 [2] Al Rawi S, et al. (2011) *Science* 334: 1144-7.
 [3] Politi Y, et al. (2014) *Dev. Cell* 29: 305-20.
 [4] Rojansky R, et al. (2016) *Elife* 5: e17896.
 [5] Zhou Q, et al. (2016) *Science* 353: 394-399.
 [6] Sato M, et al. (2018) *Nat Cell Biol* 20: 81-91.
 [7] Wild P, et al. (2011) *Science* 333: 228-33.
 [8] Yamano K, et al. (2016) *EMBO Rep.* 17: 300-16.
 [9] Vargas J N S, et al. (2019) *Mol Cell* 74: 347-362 e6.

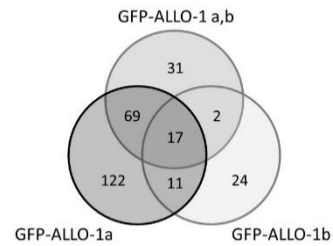


図3. 質量分析によるALLO-1相互作用因子の同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 佐藤 美由紀、佐藤 裕公、佐藤 健	4. 巻 91
2. 論文標題 初期発生におけるリソソーム分解の生理機能と分子メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 643-651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910643	査読の有無 無
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 佐藤美由紀	4. 巻 69
2. 論文標題 ミトコンドリアのオートファジーによる分解とその生理機能	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 586-590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Sasaki Taeko, Sato Miyuki	4. 巻 1865
2. 論文標題 Degradation of paternal mitochondria via mitophagy	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 129886-129886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2021.129886	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-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 佐藤美由紀	4. 巻 272
2. 論文標題 オートファジーによる父性ミトコンドリアの選択的分解	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ 第5土曜特集	6. 最初と最後の頁 811-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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9件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤美由紀, 佐藤健, 小迫英尊
2. 発表標題 線虫遺伝学 × プロテオミクスのコラボ: 父性オルガネラオートファジー制御機構の解明を目指して
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 佐々木妙子, 佐藤健, 佐藤美由紀
2. 発表標題 The mechanism of specific elimination of paternal mitochondria via autophagy receptor ALL0-1
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木妙子, 佐藤健, 佐藤美由紀
2. 発表標題 オートファジーレセプター-ALL0-1による父性ミトコンドリアの選択的分解制御機構
3. 学会等名 第12回 オートファジー研究会 若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤美由紀, 佐藤健
2. 発表標題 キナーゼとアダプターによる父性オルガネラ選択的オートファジーの制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤美由紀, 佐藤健
2. 発表標題 The autophagy receptor ALLO-1 and the TBK1/IKK -related kinase regulate clearance of paternal mitochondria in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyuki Sato
2. 発表標題 Selective autophagy of paternal mitochondria for maternal inheritance of mitochondrial DNA
3. 学会等名 The 4th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyuki Sato
2. 発表標題 Selective autophagy of paternal mitochondria via the autophagy receptor ALLO-1 and TBK1-related kinase IKKE-1
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taeko Sasaki, Yasuharu Kushida, Ken Sato, Miyuki Sato
2. 発表標題 The mechanism underlying selective elimination of paternal mitochondria in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤美由紀, 佐々木妙子, 榎田康晴, 佐藤健
2. 発表標題 ALLO-1とIKKE-1による父性オルガネラの選択的分解機構
3. 学会等名 第 12 回 オートファジー研究会 若手の会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所生体膜機能分野 http://makukinou.showa.gunma-u.ac.jp/index.html

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