

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06742

研究課題名(和文)ミトコンドリアとリソソームの物理的相互作用の分子機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms and the functions of the membrane contact sites between mitochondria and lysosomes

研究代表者

八木沢 芙美 (Yagisawa, Fumi)

琉球大学・研究基盤センター・准教授

研究者番号：70757658

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)：リソソーム(液胞)は細胞内分解を、ミトコンドリアは細胞内のATP生産を担う細胞内小器官である。真核生物の進化の初期に分岐した単細胞紅藻Cyanidioschyzon merolae(通称シゾン)では、細胞分裂期特異的にミトコンドリアとリソソームが物理的に相互作用する。これまでに、ESCRTとよばれる複合体の構成タンパク質VIG1がこの相互作用に関わることが示されていた。本研究では、ミトコンドリアとリソソームの相互作用においてはVIG1がESCRTとは独立して機能することが示された。一方、ESCRTがシゾンの細胞質分裂の最終段階において機能することが副次的に明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物細胞などでは、リソソーム(液胞)とミトコンドリアの物理的な相互作用が脂質輸送やミトコンドリア分裂などに関与する。VIG1は他生物にも存在し、本研究結果は他生物に展開できる可能性がある。また、真核生物は古細菌型の宿主がミトコンドリアを獲得して誕生し、その後、動物・菌類・アメーバ類のもととなる系統と植物などを含む系統に分岐した。細胞質分裂の最終段階におけるESCRTの機能は、これまで一部の古細菌と動物細胞でしか知られていなかった。シゾンの細胞質分裂に関わる本研究結果は、ESCRTが真核生物の原始的な細胞質分裂装置である可能性を示唆し、真核生物の進化を理解する上でも重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lysosomes (vacuoles) play a role in intercellular degradation, and mitochondria are the primary sites for energy production. In simple unicellular red algae Cyanidioschyzon merolae, these compartments interact during mitosis. Previous studies show that the protein VIG1, a component of the ESCRT complex, mediates contact site formation. This study demonstrates that VIG1 functions in the interaction are independent of other ESCRT proteins. Additionally, we also found that ESCRT plays a role in cytokinetic abscission in *C. merolae*.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア リソソーム 物理的相互作用

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめ動物、植物、菌類など地球上の多くの生物を構成する真核細胞は、固有の機能を担う膜で囲まれた細胞小器官、すなわちオルガネラを含む。研究開始当初、異種のオルガネラの物理的な相互作用が細胞の正常な機能に必要であることが分かりつつあった。

ミトコンドリアは呼吸を、リソソーム(液胞)は細胞内分解を担う。これらのオルガネラの機能低下は、ヒトでは神経変性や重篤な代謝病につながる。動物などでリソソームとミトコンドリアは密着して観察され、このことは何らかの生理的な意味を持つと推測された。しかしながら高等生物では、複雑な形をしたミトコンドリアと数百のリソソームが非同調的に相互作用し、その機構や機能の解析は難しいと考えられた。

そこで研究代表者らは、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (通称:シズン) を真核細胞のモデルとして解析を進めてきた。シズンは、殆どのオルガネラを細胞あたり1つずつしか持たず、細胞分裂やそれに伴うオルガネラ分裂を明暗により高度に同調できる (Suzuki et al. 1994)。ゲノムは完読され、遺伝子数は5335個と少なく、イントロンも少ない (Matsuzaki et al. 2004; Nozaki et al. 2007)。また、形質転換技術が確立している (Ohnuma et al. 2008; Fujiwara et al. 2013)。

研究開始以前に代表者らは、シズンのリソソームを同定し、以下のことを示した (Yagisawa et al. 2006, 2009; Fujiwara et al. 2010)。

- (1)シズンのリソソームは、M期においてミトコンドリアに密着する。
- (2)密着したミトコンドリアとリソソームの間には、繊維状の構造が存在する。
- (3)この密着は、VIG1 (Vacuole Inheritance Gene 1) タンパク質に依存する。
- (4)VIG1はS/G2期に発現し、リソソーム表面に現れる。M期にはミトコンドリアとリソソームが密着する面に局在し、分裂期終了後、分解される。

VIG1は、約30 kDaのcoiled-coilタンパク質であり、一般に膜の融合・分断を担うESCRT (Endosomal sorting complex required for transport)を構成するVps60/CHMP5のホモログである。オルガネラ間の物理的相互作用におけるESCRTの機能は他に知られておらず、ミトコンドリアとリソソームの結合においてVIG1がESCRT複合体を介して機能するのか、あるいは他のESCRTタンパク質からは独立して機能するのか、という点は不明であった。

また、ミトコンドリアとリソソームの密着がどのような生理的な意味を持つのかという点も不明であった。シズンではリソソームがミトコンドリアとともに娘細胞に均等分配されるため、密着はリソソームの分配機構の1つとも捉えられる。一方、たとえば、シズンにはオートファジーに必要なAPG/ATG (Autophagy related gene) 遺伝子が一つもない。VIG1を介したリソソームの密着は、M期特異的なミトコンドリアタンパク質の分解・更新に関わることが考えられ、このような可能性について検討する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内形態がシンプルであり、分裂期特異的にこれらのオルガネラが相互作用するシズンをモデルにミトコンドリアとリソソームの物理的相互作用機構とその機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ESCRTの解析:

ESCRTの構成因子であるVIG1がミトコンドリアとリソソームの相互作用に関わることから、この現象において他のESCRT構成タンパク質がVIG1とともに果たす可能性を検証した。一般にESCRTはESCRT-IからESCRT-IVの4つのサブコンプレックスを含む数十のタンパク質から構成される。ESCRT-I、IIは下流の因子のリクルート、ESCRT-IIIは膜の変形を担う繊維など機械的な構造を形成し、ESCRT-IVはESCRT-IIIのダイナミクスを制御する。また、ALIXはESCRT-Iと並行して下流のESCRTタンパク質をリクルートする。

シズンのゲノム中にはVIG1やALIXを含む13のESCRTタンパク質がコードされている。本研究では、一般に単独では機能欠損などの表現型が出にくいESCRT-II以外のESCRTタンパク質について解析を進めた。

ESCRTタンパク質がVIG1とともに果たす場合は、VIG1と同様の発現パターンや局在を示す可能性が考えられる。ESCRT-Iの主要なタンパク質であるTSG101、ESCRT-IIIを構成するCHMP1、CHMP2、CHMP4、CHMP5 (VIG1)、CHMP6、ESCRT-IVの主要なタンパク質であるVPS4、およびALIXについてタグを融合した株を用い、間接蛍光抗体染色による局在解析を行った。また、CHMP2、CHMP4については特異的な抗体を用いて、細胞周期における発現パターンや局在を解析した。

VPS4 (ESCRT-IV)はESCRTが機能する上で必須のタンパク質に必須のAAA-ATPaseであり、優性型変異が知られる。ESCRTの機能を解析するため、阻害するため野生型と優勢変異型のVPS4をヒートショックにより発現する細胞株を作成した。発現誘導下、細胞分裂期におけるリソソーム挙動を間接蛍光抗体染色法により解析した。

(2) リソソームの機能欠損株の解析：

ミトコンドリアに対するリソソームの生理的な作用を明らかにするために、リソソームの機能に関わる種々の遺伝子破壊株について表現型解析を行った。

リソソームがミトコンドリアの一部やミトコンドリアタンパク質などの分解に関与する場合、これらのリソソームタンパク質をコードする遺伝子の欠損は、リソソームへのミトコンドリアの断片の蓄積や、ミトコンドリアタンパク質の分解の抑制がおこる可能性が考えられた。この可能性を検討するため、リソソームのペプチダーゼ ECE-1 の破壊を作成した。この ECE-1 は、高発現のリソソーム構成タンパク質であることがリソソームのプロテオーム解析から明らかとなっていた (Yagisawa et al. 2009)。さらにこのバックグラウンドにおいて、ミトコンドリアのマーカータンパク質を発現させ、ミトコンドリアタンパク質への影響を解析した。ミトコンドリアマーカーとしては、Cox1-GFP や、ターゲット配列に GFP を融合したものをを用いた。

またさらに、シゾンを含む下等な真核生物ではリソソームあるいは液胞は、リン酸の直鎖上ポリマーであるポリリン酸の蓄積を介してリン酸や金属イオンの貯蔵を行う。リソソームの持つこれらの機能がミトコンドリアに作用する可能性を検討した。このため、ポリリン酸合成遺伝子について破壊株を作成し、表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1) ESCRT の解析：

ミトコンドリアとリソソームの物理的相互作用において ESCRT タンパク質が機能する場合、これらが VIG1 と同様の局在を示すことが予測されたが、そのような ESCRT タンパク質は見出されなかった。さらに、VPS4 の優勢型変異においても、リソソームの挙動に変化は見出されなかった。これらの結果から、VIG1 がミトコンドリアとリソソームの物理的相互作用において、ESCRT から独立した特異的な機能を持つことが示唆された。

一方、副次的に、ESCRT がシゾンの細胞質分裂の最終段階の進行を担うことが明らかとなった。シゾンの細胞質分裂は、動物細胞と同様に分裂面の細胞膜がくびれこむことにより進行し、最終的に娘細胞間に存在する膜とスピンドル (Intercellular bridge; ブリッジ) が切断されることによって完了する。代表者らは ESCRT の局在解析によって、ALIX, ESCRT-III と VPS4 をブリッジに局在することを示した。また、変異型 VPS4 の発現によってブリッジの切断が阻害されることが分かった。一方で ESCRT-I の主要なタンパク質である TSG101 は、ブリッジに局在しない。これらの結果から、シゾンにおいて ALIX によってリクルートされる ESCRT-III と VPS4 がブリッジの分断を担うことが明らかとなった。真核生物は古細菌型の宿主細胞に、 α -プロテオバクテリアが細胞内共生しミトコンドリアとなったことによって誕生した。その後、動物・菌類・アメーバ類を含む系統と植物などを含む系統に大きく分岐した。細胞質分裂の最終段階における ESCRT の機能は、これまで一部の古細菌と動物細胞でしか知られていなかった。バクテリアは ESCRT を持たず、FtsZ による分裂を行う。本研究でシゾンの細胞質分裂における ESCRT の機能が明らかとなったことにより、ESCRT が真核生物の始原的な細胞質分裂装置であることが示唆された (Yagisawa et al. 2020)。

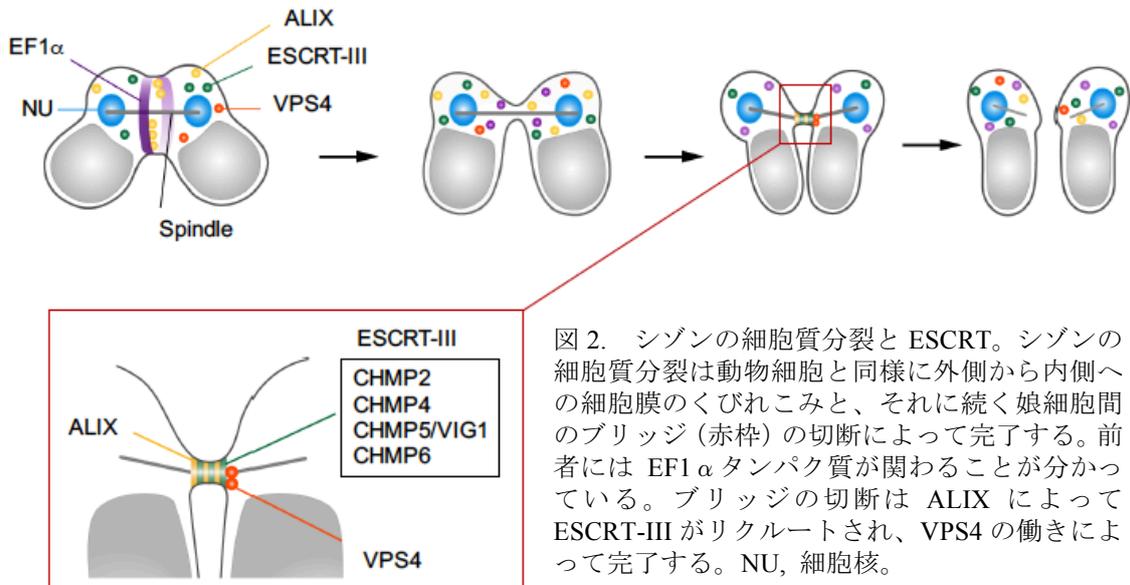


図2. シゾンの細胞質分裂と ESCRT。シゾンの細胞質分裂は動物細胞と同様に外側から内側への細胞膜のくびれこみと、それに続く娘細胞間のブリッジ (赤棒) の切断によって完了する。前者には EF1 α タンパク質が関与することが分かっている。ブリッジの切断は ALIX によって ESCRT-III がリクルートされ、VPS4 の働きによって完了する。NU, 細胞核。

(2) ミトコンドリアとリソソームの機能的相互作用の探索：

ペプチダーゼの欠損株を用いた解析では、ミトコンドリアの一部やタンパク質分解が遅れるという証拠は得られなかった。興味深いことに欠損株では Cox1-GFP の発現低下が見られたことから、さらなる解析が必要である。ポリリン酸の解析においては、シゾンのポリリン酸合成酵素を同定し、その遺伝子破壊株の表現型解析を行った。破壊株では細胞内の金属イオン量の変動や

エネルギー代謝の変化が認められた (Yagisawa et al. in preparation) 。これらの現象とミトコンドリアとの関係性について解析を継続中である。

<引用文献>

- ① Fujiwara T, Kuroiwa H, Yagisawa F, Ohnuma M, Yoshida Y, Yoshida M, Nishida K, Misumi O, Watanabe S, Tanaka K, Kuroiwa T (2010) The coiled-coil protein VIG1 is essential for tethering vacuoles to mitochondria during vacuole inheritance of *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Cell* 22: 772-781
- ② Fujiwara T, Ohnuma M, Yoshida M, Kuroiwa T, Hirano T (2013) Gene targeting in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*: single- and multi-copy insertion using authentic and chimeric selection markers. *PLoS One* 8: e73608
- ③ Matsuzaki M, Misumi O, Shin IT, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y, Kuroiwa T (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653-657
- ④ Nozaki H, Takano H, Misumi O, Terasawa K, Matsuzaki M, Maruyama S, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Fujiwara T, Takio S, Tamura K, Chung SJ, Nakamura S, Kuroiwa H, Tanaka K, Sato N, Kuroiwa T (2007) A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol* 5: 28
- ⑤ Ohnuma M, Yokoyama T, Inouye T, Sekine Y, Tanaka K (2008) Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol* 49: 117-120
- ⑥ Suzuki K, Ehara T, Osafune T, Kuroiwa H, Kawano S, Kuroiwa T (1994) Behavior of mitochondria, chloroplasts and their nuclei during the mitotic cycle in the ultramicroalga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur J Cell Biol* 63: 280-288
- ⑦ Yagisawa F, Fujiwara T, Takemura T, Kobayashi Y, Sumiya N, Miyagishima SY, Nakamura S, Imoto Y, Misumi O, Tanaka K, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2020) ESCRT machinery mediates cytokinetic abscission in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Cell Dev. Biol.* 8: 169
- ⑧ Yagisawa F, Nishida K, Kuroiwa H, Nagata T, Kuroiwa T (2007) Identification and mitotic partitioning strategies of vacuoles in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 226:1017-1029
- ⑨ Yagisawa F, Nishida K, Yoshida M, Ohnuma M, Shimada T, Fujiwara T, Yoshida Y, Misumi O, Kuroiwa H, Kuroiwa T. (2009) Identification of novel proteins in isolated polyphosphate vacuoles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant J.* 60:882-893

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yagisawa F., Fujiwara T., Takemura T., Kobayashi Y., Sumiya N., Miyagishima S. Y., Nakamura S., Imoto Y., Misumi O., Tanaka K., Kuroiwa H., Kuroiwa T.	4. 巻 8
2. 論文標題 ESCRT machinery mediates cytokinetic abscission in the unicellular red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.00169	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木沢英美、藤原崇之、宮城島進也、三角修己、中村宗一、黒岩晴子、黒岩常祥
2. 発表標題 単細胞紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> におけるポリリン酸キナーゼPPK1の役割
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	藤原 崇之 (Fujiwara Takayuki)		
研究協力者	宮城島 進也 (Miyagishima Shinya)		
研究協力者	黒岩 晴子 (Kuroiwa Haruko)		

6. 研究組織（つづき）

	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	黒岩 常祥 (Kuroiwa Tsuneyoshi)		

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