

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570144

研究課題名 (和文) ミトコンドリアの選択的分解に必要な新規因子の網羅的探索と機能解析

研究課題名 (英文) Genome-wide screen and functional analysis of novel factors required for selective degradation of mitochondria

研究代表者

岡本 浩二 (OKAMOTO KOJI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任准教授

研究者番号：40455217

研究成果の概要 (和文)：ミトコンドリアは細胞の発電所として、生命機能に必須の役割を果たしている細胞小器官である。最近、ミトコンドリアを丸ごと除去する仕組み「マイトファジー」が、ミトコンドリアの品質管理にとって重要であると提唱されてきたが、その分子機構は殆どわかっていなかった。本研究では出芽酵母を用い、選択的ミトコンドリア分解を解析可能な現象として捉えるとともに、マイトファジーに関与する因子を網羅的に同定することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：Mitochondria serve as “the power plants of the cell”, playing essential roles in cellular functions. Recently, it has been proposed that degradation of mitochondria as whole organelles, termed mitophagy, is critical for mitochondrial quality control. However, the molecular mechanisms remain largely unknown. In this study, we utilized budding yeast, and succeeded to establish selective degradation of mitochondria as a phenomenon to be analyzed, and systematically identify mitophagy-related factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ミトコンドリア、オートファジー、膜輸送、オルガネラ・ダイナミクス、品質管理、出芽酵母、細胞内分解、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞内の成分を自己分解する、真核生物に普遍的なシステムである。出芽酵母が栄養飢餓に曝されると、オートファゴソームと呼ばれる2重膜構造体が形成され、それが分解すべき成分を隔離する。完成したオートファゴソームは液胞と膜融合し、取り込まれた細胞質成分が液胞内の加水分解酵素群によって分解される。栄養飢餓誘導

型オートファジーにおいて、リボソームを含む細胞質やオルガネラは非選択的バルク分解を受ける。一方、ある種の加水分解酵素の液胞への輸送にも、オートファジーに類似した Cvt (Cytoplasm to vacuole targeting) 経路が働いている。Cvt は選択的オートファジーであり、富栄養条件下で恒常的に起きている。また、メタノール資化性酵母で培地変換により誘導されるペルオキシソーム分解も、選択的オートファジーの一形態である。これ

までに、これらオートファジー関連経路で働く Atg タンパク質 (autophagy-related protein)が 31 個同定され、分子機能の解析が進められている。

選択的オートファジーによる分解は、ミトコンドリアのような巨大オルガネラの質・量を管理するシステムとしても、威力を発揮しうると考えられる。これまでに、酵母や哺乳類を含む様々な細胞でのミトコンドリア・オートファジーが報告され、その重要性が示唆されている。また、オートファジー欠損によってミトコンドリアに障害が起こることから、ミトコンドリアの品質管理にもオートファジーが働いていると考えられる。しかし、過去の報告のほとんどは栄養飢餓誘導型等の非選択的オートファジーが起こる条件下での現象を見たものである。また、分解コンパートメントへのオートファジー依存性かつ選択的なミトコンドリアの取り込みが、実際に存在することを示す形態学的証拠は得られていない。最近、酵母の遺伝子 *AUP1* と *UTH1* がミトコンドリア・オートファジーに必要であると報告されたが、私が確立した方法により、両遺伝子ともミトコンドリアの選択的オートファジーに必須でないことが明らかとなった。

私はこれまで、ミトコンドリアの構造と機能に関する研究を一貫して行ってきた。その過程で、生合成とは逆のベクトルである分解が、ミトコンドリアの質・量管理を行なうプロセスとして重要なのではないかというアイデアに至り、その本質に迫るためには、出芽酵母をモデルとした分子機構の解明が不可欠であると考えた。そこでまず、液胞の主要なプロテアーゼを欠失した株 (*pep4Δ*)を用いて、様々な生育条件下でミトコンドリアの液胞への取り込みを調べてみた。非発酵性培地での呼吸成長から増殖停止状態 (定常期)への移行期において、GFP で可視化したミトコンドリアの一部が凝集し、FM4-64 で染色した液胞と共局在する。すなわち、ミトコンドリアの液胞標的化が顕著に起こることを見出した。この現象は、*atg7Δ*変異株では見られず、オートファジー依存性である。

上記の観察を踏まえ、実際にミトコンドリアが液胞に取り込まれているかどうかを明らかにするために、透過型電子顕微鏡による微細構造の解析を行なった。その結果、*ATG7 pep4Δ*細胞の液胞内に、2重膜およびクリステ構造を持つミトコンドリアが多数観察された。対照的に、*atg7Δ pep4Δ*細胞の液胞内には、ミトコンドリアは認められなかった。また、いずれの場合においても、ミトコンドリア以外の細胞質成分を含む膜構造は、液胞

内にほとんど見られなかった。これらのデータから、呼吸成長から増殖停止状態への移行期において、ミトコンドリア・オートファジーは選択的に起こることが初めて明らかになった。

2. 研究の目的

オートファジーは、酵母からヒトまで保存された主要な分解経路であり、その分子機構と生理的役割に関する研究が飛躍的に進展してきた。もう一つの主要経路、ユビキチン・プロテアソーム系との特筆すべき相違点は、オートファジーはタンパク質分子のみならず、細胞内膜構造であるオルガネラの分解にも作用していることである。最近、細胞の生と死を司るオルガネラ、ミトコンドリアの質・量管理システムとしての選択的オートファジーの重要性が示唆されているが、その分子機構は、ほとんど理解されていない。本研究では、オートファジーの選択性に焦点を絞り、出芽酵母をモデルに用いて、ミトコンドリアの特異的分解に必須な因子を同定・解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア・オートファジーを欠損した遺伝子破壊株の探索と表現型解析

①ミトコンドリア GFP マーカーを発現した遺伝子破壊株の作製

ミトコンドリア・オートファジー (ミトコンドリアの液胞への取り込み)を蛍光顕微鏡で可視化するため、ミトコンドリア・マトリックス局在シグナル配列を付けた GFP (mito-GFP)を用いた。この mito-GFP マーカーをコードしたプラスミドで細胞をハイスクリーン形質転換し、ミトコンドリア可視化株コレクションを作製した。具体的には、96 ウェルマイクロプレート上の約 5,000 株の非必須遺伝子破壊 1 倍体アレイに、市販のキットを用いて mito-GFP 発現プラスミドを導入し、グルコースを含む発酵性選択寒天培地にスポッティング後、培養した。

②蛍光顕微鏡を用いた網羅的 1 次スクリーニング

マイクロプレート寒天培地上のミトコンドリア可視化株を、グリセロールを含む非発酵性の 96 ウェル選択液体培地に殖菌後、培養した。一定の O.D.に達した細胞から順次、蛍光顕微鏡で観察するとともに、画像データを取得した。液胞への取り込み後、ミトコンドリアの膜構造と多くのタンパク質は消化されるが、分解されにくい GFP は液胞に残

る。mito-GFP で可視化されたミトコンドリアに加えて、やや蛍光の暗い球状の GFP シグナルを持つものをネガティブ、持たないものをポジティブとし、2次スクリーニングへ進んだ。

(2) ミトコンドリア・オートファジー変異株の2次スクリーニングと表現型解析

①2次スクリーニング

蛍光顕微鏡による網羅的1次スクリーニングで単離されたミトコンドリア・オートファジー変異株について、栄養飢餓誘導型の非選択的オートファジーやCvt経路(液胞酵素の生合成に働く選択的オートファジー)が正常に働いているかどうかを、酵素学的アッセイ、ウェスタンブロット、電子顕微鏡解析、光学顕微鏡観察の手法を用いて調べた。

②表現型解析

上記2次スクリーニングの結果、ミトコンドリア・オートファジーに特異的な異常が認められた変異株について、ミトコンドリア分解を定性的かつ定量的に調べるため、ウェスタンブロット、蛍光顕微鏡観察、電子顕微鏡解析を行った。

(3) 新規ミトコンドリア・オートファジー関連タンパク質の機能解析

前年度までの研究で、蛍光顕微鏡による網羅的1次スクリーニングで単離されたミトコンドリア・オートファジー変異株について、栄養飢餓誘導型の非選択的オートファジーやCvt経路が正常に働いているかどうかを、酵素学的アッセイ、ウェスタンブロット、電子顕微鏡解析、光学顕微鏡観察の手法を用いて調べた。また、ミトコンドリア・オートファジーに特異的な異常が認められた変異株について、ミトコンドリア分解を定性的かつ定量的に調べるため、ウェスタンブロット、蛍光顕微鏡観察、電子顕微鏡解析を行った。これらの解析で、選択的ミトコンドリア分解に特異的に働いていると示唆されたタンパク質について、その発現・局在・タンパク質間相互作用の時空間動態を解析した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア・オートファジーを欠損した遺伝子破壊株の探索と表現型解析

①ミトコンドリア GFP マーカーを発現した遺伝子破壊株の作製

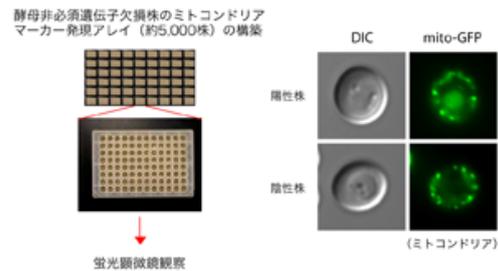
ミトコンドリア・オートファジー(マイトファジー)を蛍光顕微鏡で可視化するため、

ミトコンドリア・マトリックス局在シグナル配列付き GFP (mito-GFP)をコードしたプラスミドで細胞を形質転換し、約 5150 株のミトコンドリア可視化株コレクションを作製した。

②蛍光顕微鏡を用いた網羅的1次スクリーニング

上記コレクションを、グリセロールを含む非発酵性の96ウェル選択液体培地に殖菌後、培養し、蛍光顕微鏡での観察を行った。液胞への取り込み後、ミトコンドリアの膜構造と多くのタンパク質は消化されるが、分解されにくいGFPは液胞に残る。mito-GFPで可視化されたミトコンドリアに加えて、球状のGFPシグナルを持つものをネガティブ、持たないものをポジティブとし、1次スクリーニングを行った結果、53株のマイトファジー欠損変異株を単離した。そのうち、顕著な表現型を示すもので未解析の遺伝子を *MTV1* (Mitochondria Transport to Vacuoles)と命名し(後に *ATG32*に遺伝子名を変更)、機能解析を進めた。

ゲノムワイド可視化探索によるミトコンドリア分解因子Atg32の同定



Category	No.	%
Screened YKO mutants	5,129	100
Mitophagy-defective KOs	53	1.03
Others	5,076	98.97

Pathways involving mitophagy-related genes

Autophagy	17
Membrane trafficking	19
Protein modification/degradation	3
Lipid metabolism	2
Mitochondrial function	5
Others	7

(2) ミトコンドリア・オートファジー変異株の2次スクリーニングと表現型解析

①2次スクリーニング

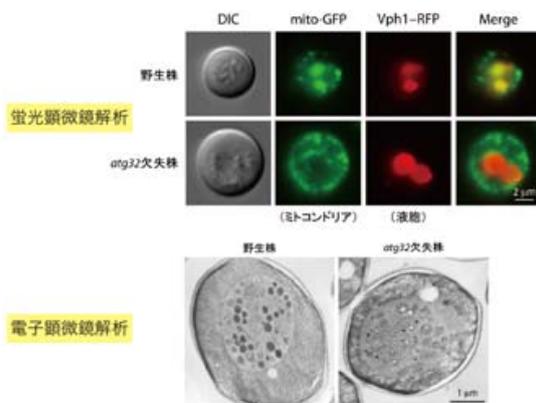
蛍光顕微鏡による網羅的1次スクリーニングで単離されたミトコンドリア・オートファジー変異株について、栄養飢餓誘導型の非選択的オートファジーやCvt経路が正常に働いているかどうかを、酵素学的アッセイとウェスタンブロットの手法を用いて調べた。その結果、4種類の変異株において、栄養飢餓誘導型オートファジーおよびCvt経路が正常に起こっていることを示唆するデータが得られた。

②表現型解析

上記2次スクリーニングの結果、ミトコンドリア・オートファジーに特異的な異常が認められた変異株について、ミトコンドリア分解を調べるため、ウェスタンブロットと蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、ミトコンドリア分解が顕著に低下していることを明らかにした。これらの変異株でミトコンドリアや液胞の形態に異常は認められなかったことから、変異株が欠失しているタンパク質がミトコンドリア分解に直接関与する可能性が考えられる。

(3) 新規ミトコンドリア・オートファジー関連タンパク質の機能解析

前年度までの研究で、蛍光顕微鏡による網羅的1次スクリーニングで単離されたミトコンドリア・オートファジー変異株について、栄養飢餓誘導型の非選択的オートファジーやCvt経路(液胞酵素の生合成に働く選択的オートファジー)が正常に働いているかどうかを、酵素学的アッセイ、ウェスタンブロット、電子顕微鏡解析、光学顕微鏡観察の手法を用いて調べた。また、ミトコンドリア・オートファジーに特異的な異常が認められた変異株について、ミトコンドリア分解を定性的かつ定量的に調べるため、ウェスタンブロット、蛍光顕微鏡観察、電子顕微鏡解析を行った。



その結果、エンドソーム・リソソーム系の膜輸送、タンパク質のアセチル化、脂質合成、

タンパク質の新規合成の標的化に関与するタンパク質の欠損でミトコンドリア分解が顕著に低下することを確認した。またこれら因子の欠失変異細胞において、ミトコンドリア・オートファジーの選択性を規定する鍵タンパク質 Atg32 の発現は正常であることがわかった。興味深いことに、これら新規ミトコンドリア分解関連因子は、その多くが酵母からヒトまで保存されている。これらの知見は、選択的ミトコンドリア分解が細胞内の様々なプロセスと密接に結びついて起こること、その仕組みは共通のメカニズムで制御されていることを示唆するものである。今後の詳細な解析により、ミトコンドリア・オートファジーの分子機構の全貌に迫ることができると期待される。

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6件)

① Kanki, T., Klionsky, D.J., and Okamoto, K. (2011) Mitochondria autophagy in yeast. *Antioxid. Redox Signal.* 14: 1989-2001. (査読有).

② 岡本徳子, 岡本浩二, 大隅良典. (2010) 酵母のマイトファジー, ー観察からの始まりー. *顕微鏡・特集「オートファジー: 形態学と分子生物学の融合」.* 45: 83-86. (査読無).

③ 岡本浩二, 岡本徳子. (2010) マイトファジー. *細胞工学・特集「その時ミトコンドリアは動いた: 独自の品質管理システムから疾患に迫る」.* 29: 423-428. (査読無).

④ 岡本浩二. (2010) 選択的ミトコンドリア分解のしくみ. *医学の歩み・第1土曜特集「ここまでわかったミトコンドリア研究の新展開」.* 232: 665-670. (査読無).

⑤ Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2009) A landmark protein essential for mitophagy. *Autophagy*, 5: 1203-1205. (査読有).

⑥ Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell*, 17: 87-97. (査読有).

[学会発表] (計12件)

① Okamoto, K. (2011) Mechanism of Atg32-mediated mitophagy in yeast.

Barcelona Biomed Conference on Mitochondrial Autophagy. March 22 in Barcelona, Spain. 招待講演 (英語).

② 岡本浩二. (2011) 選択的ミトコンドリア分解: 現象から分子理解へ. 第7回宮崎サイエンスキャンプ. 宮崎, 2月26日. 招待講演 (日本語).

③ Okamoto, K. (2010) Regulation of mitochondria-specific degradation in yeast. 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit). December 17 in Fukuoka, Japan. 招待講演 (英語).

④ 岡本浩二. (2010) ミトコンドリア品質管理の制御機構. 第69回日本癌学会学術総会, シンポジウム「がんとオートファジー」. 大阪, 9月23日. 招待講演 (日本語).

⑤ Kondo-Okamoto, N., Noda, N.N., Takahashi, I., Matsunami, M., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Okamoto, K. (2010) Molecular mechanisms of mitophagy in yeast. 3rd International Symposium on Protein Community. September 15 in Nara, Japan. 招待講演 (英語).

⑥ Okamoto, K. (2010) Molecular mechanism of mitophagy. Gordon Research Conference on Mitochondria and Chloroplasts. July 14 in Lucca, Italy. 招待講演 (英語).

⑦ 岡本浩二. (2010) ミトコンドリア分解を司る選択的オートファジーの制御機構. 第19回酵母合同シンポジウム. 東京, 6月24日. 招待講演 (日本語).

⑧ 岡本浩二, 岡本徳子, 高橋郁子, 大隅良典. (2009) 選択的オートファジーによるミトコンドリア分解の分子機構. 第82回日本生化学会大会, シンポジウム「ミトコンドリアが語る細胞機能・病態研究の新たな潮流」. 神戸, 10月23日. 招待講演 (日本語).

⑨ Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., Takahashi, I., and Ohsumi, Y. (2009) Molecular basis of mitochondrial degradation via selective autophagy in yeast. 5th International Symposium on Autophagy. September 26 in Otsu, Japan. 招待講演 (英語).

⑩ 岡本浩二, 岡本徳子, 大隅良典. (2009) 選択的ミトコンドリア・オートファジーの分子基盤. 平成21年度日本生化学会関東支部例会, シンポジウム「タンパク質制御研究の新展開」. 筑波, 6月20日. 招待講演 (日本語).

⑪ Okamoto, K. (2008) The novel protein Mtv1 mediates mitophagy, an autophagy-related membrane dynamics specific for mitochondria. Nagoya University G-COE International Mini-Symposium. December 13 in Nagoya, Japan. 招待講演 (英語).

⑫ Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2008) Molecular basis of mitophagy, degradation of mitochondria via selective autophagy. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会, シンポジウム「オルガネラ・ダイナミクスー形成・分解と機能制御」. 神戸, 12月9日. 招待講演 (英語).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 浩二 (OKAMOTO KOJI)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任准教授
研究者番号: 40455217

(2) 研究協力者

岡本 徳子 (OKAMOTO NORIKO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員
研究者番号: 90568750