

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770124

研究課題名（和文）選択的ミトコンドリア分解に働くタンパク質複合体の同定と機能解析

研究課題名（英文）Biochemical screen and functional analysis of a protein complex required for selective degradation of mitochondria

研究代表者

岡本 徳子（OKAMOTO NORIKO）

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員

研究者番号：90568750

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアが正常に働き、恒常性を保つには、不要ミトコンドリアを分別・処理することが重要である。この選択的にミトコンドリアを丸ごと分解するしくみは「マイトファジー」と呼ばれ、重要な品質管理システムであるが、詳細な分子機構は未だ不明である。これまで我々は出芽酵母をモデルに、マイトファジーの特異的制御因子 Atg32 を同定した。本研究では、この因子と相互作用するタンパク質群を生化学的に探索し、新規因子群を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Selective degradation of damaged or surplus mitochondria is important for cellular homeostasis. Recently, it has been proposed that degradation of mitochondria, termed mitophagy, is critical for mitochondrial quality control system. However, the molecular mechanisms remain largely unknown. We identified the specific mitochondrial receptor Atg32 that is essential for the mitophagy using budding yeast. In this study, we performed the biochemical screening and identified novel factors interacting with Atg32.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	107,761	32,328	140,089
2012年度	1,292,239	387,671	1,679,910
年度			
年度			
総計	3,300,000	989,999	4,289,999

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、出芽酵母、膜ダイナミクス、品質管理、オートファジー、

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアが正常な機能を発揮し恒常性を保つには、傷ついたミトコンドリアを分別・処理することが重要である。この選択的ミトコンドリア分解は「マイトファジー」と呼ばれ、酵母からヒトまで保存された、品

質管理システムとして最近注目を集めているが、その分子機構はよくわかっていない。これまでの研究で、我々は出芽酵母をモデルに、マイトファジーに特異的な制御因子を同定した。本研究では、このマイトファジー制御因子と相互作用するタンパク質群を同定・解析する。このアプローチにより、マイ

オートファジーを実行する複合体の構造と機能が明らかとなり、どのようにミトコンドリアを隔離・除去するのか、という本質的問題についての分子理解が飛躍的に深まるものと考えた。

オートファジーはダイナミックな膜動態を伴う大規模な分解系であり、細胞内の成分を自己分解によってリサイクルする、真核細胞に普遍的な現象である。細胞が栄養飢餓に晒されると、隔離膜と呼ばれる2重膜構造を形成し、分解されるべき細胞質成分を囲み込み、オートファゴソームとして完成する。その後、オートファゴソームはリソソーム（酵母では液胞）と融合し、中身がリソソーム内の加水分解酵素群によって分解される。現在まで、オートファジー関連因子が30以上同定されている。

加えて、この分解経路の生理機能に関する研究が次々と報告され、その重要性が認識されつつある。そして、これまで最もよく研究されていた飢餓時のアミノ酸産生のためのバルク分解以外にも、障害を受けたオルガネラやタンパク質を選択的に分解することも、最近示唆されている。中でも、ミトコンドリアは酸化的リン酸化を経てATPを作り出すとともに、酸化ストレスからの障害を受けやすい。そのため、ミトコンドリア品質管理のための分解機構はミトコンドリア機能維持に極めて重要であると考えられる。その分解にはミトコンドリア・オートファジー（マイトファジー）の関与が示唆されているながらも、その詳細なメカニズムは不明であった。ほ乳類では、酸化ストレス等のダメージによる、異常なミトコンドリア蓄積から引き起こされる病態や神経変性疾患も知られており、マイトファジー解明の期待は大きいと考えられた。

2. 研究の目的

そこで我々は、ミトコンドリア分解の分子基盤を獲得するため、出芽酵母をモデルに、マイトファジーに関わる因子のスクリーニングを行った。まず、ミトコンドリア・マトリックス局在シグナル付き GFP (mito-GFP) をマーカーとして発現させ、ミトコンドリアに局在した GFP が液胞へと移行する様子を観察し、これをマイトファジー可視化システムとした。加えて、Fig1 の電子顕微鏡写真に示すように、野生株ではマイトファジー誘導条件下に、液胞にミトコンドリアが取り込まれ

ている様子が観察されるが、オートファジー変異株では、液胞内へのミトコンドリアの取り込みが見られず、マイトファジーが阻害されていることから、ミトコンドリアの分解はオートファジーによることも確認された。

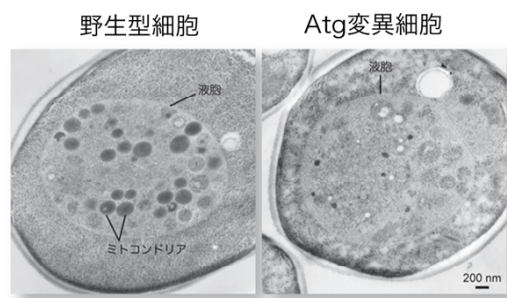


Fig1. ミトコンドリアの選択的オートファジー

次に、生存に必須でない遺伝子破壊株ライブラリー（約5,150種）を用意し、mito-GFP プラスミドを形質転換した。そして前述した条件にて、mito-GFP が液胞へと取り込まれず液胞が光っていない変異体（マイトファジー欠損株）を顕微鏡下でスクリーニングした。これにより、約53のマイトファジー関連タンパク質が同定され、そのうち最もマイトファジーが顕著に阻害されていた変異体の欠失している新規のタンパク質を、Atg32と命名し解析を行った。Atg32は約59kDaのミトコンドリア外膜タンパク質であり、N末側をサイトゾル、C末側をミトコンドリア膜間部に向けている。興味深いことに、このタンパク質はマイトファジー誘導時に発現が上昇し、マイトファジーの進行とともに、下がってゆく。また、オートファゴソーム形成に必須なAtg8は、マイトファジー誘導時にAtg32依存的にミトコンドリアに局在しているのが観察された。さらに、Atg8とともに選択的オートファジーに必要とされるAtg11と免疫共沈降されることから、Atg32とこれらのAtgタンパク質は相互作用していることが示唆された。

以上の知見から、Fig3に示すようなマイトファジーのモデルを考えている。通常生育時には酸化ストレスのレベルも低く、Atg32のレベルも低く保たれているが、酸化ストレスの上昇などによるマイトファジー誘導シグナルに伴ってAtg32のレベルも上昇し、ミトコンドリア表面に局在したAtg32はAtg8およびAtg11と協調して、ミトコンドリア特異的オートファゴソーム（マイトファゴソーム

ム)を形成する。さらに、図中の○で示した未知の Atg32 相互作用因子がマイトファジー制御に関与していることも考えられる。酸化ストレスがマイトファジーの誘導に関わるとすれば、ミトコンドリアの生理活性状態を認識するために、ミトコンドリア膜間スペースあるいは内膜のタンパク質が Atg32 と相互作用する可能性も想定される。マイトファジーを理解するための最も重要なポイントの一つは、マイトファゴソームがミトコンドリアを隔離する分子機構であり、ミトコンドリア上の「分解目印」として働く Atg32 がどのように制御されているのかは大変興味深い。

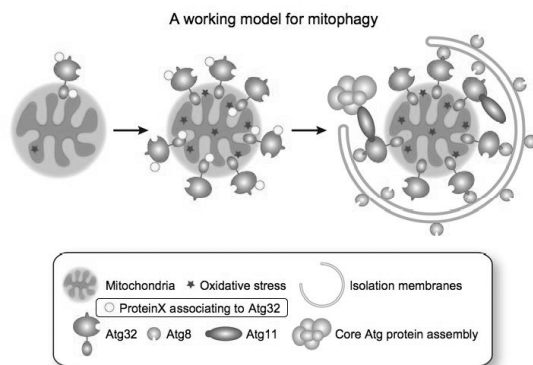


Fig.3 マイトファジーのモデル図 Okamoto et al., Autophagy, in press (2009), modified

本研究では、ミトコンドリア上のタンパク質レセプターである Atg32 がどのように制御され、マイトファジーが起こるべき時と場所で、隔離膜が形成されるのかを解明するために、Atg32 と相互作用するタンパク質を生化学的に探索し、同定・解析することを目的とした。

3. 研究の方法

研究目的に前述したように、Atg32 はマイトファジーの条件下で、一過性発現プロファイルを持つことから、Atg32 の制御因子が存在する可能性が考えられる。また、酸化ストレス等、ミトコンドリアの生理活性状態を伝達するようなミトコンドリア内在性因子が Atg32 と相互作用する可能性も想定されることから、質量分析から相互作用因子を同定するという生化学的スクリーニングの手法を選択し、以下のアプローチをとった。

(1) マイトファジー誘導条件下にて、タグ付き Atg32 の精製のための発現系の構築とミトコンドリアの単離をおこなった。

(2) 次にその単離ミトコンドリアを用いて、アフィニティー・クロマトグラフィー精製を

行い共沈される因子 Aip (Atg32-interacting protein) を LC-MS にて同定した。その後、それらの欠損株表現型を詳細に調べるとともに、Aip タンパク質の機能解析を行った。

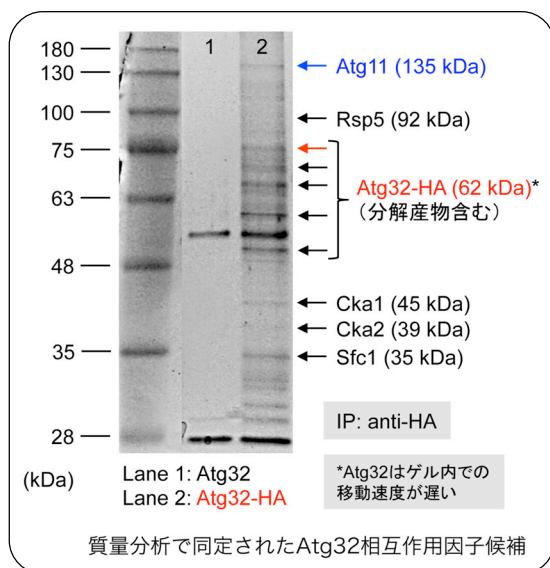
4. 研究成果

(1) 生化学的探索において、精製目的のタンパク質複合体が機能的であることを前提とするため、マイトファジー誘導条件下の細胞にて、Atg32-3xStrep-8xHis が内在性の Atg32 と同等にマイトファジーに機能することをまずは検証した結果、このタグ付きコンストラクトも内在性のものと同様に機能することが確認された。

(2) Atg32-3xStrep-8xHis を ATG32 内在性プロモーター制御下で発現させた細胞においてマイトファジーを誘導後、ミトコンドリアを単離し、アフィニティークロマトグラフィーの手法を用いて2段階精製を行った。Atg32-3xStrep-8xHis 自身の精製純度を上げることはできたが、精製途中のタンパク質分解の問題や、共沈殿する因子も減少傾向にあることが明らかとなったために、Atg32-HA と HA 抗体アガロースを用いた一段階の精製に戻り、アフィニティー精製を行うこととした。

まず、マイトファジー誘導条件下の細胞から Atg32-3xHA とその免疫共沈降物を精製した後、電気泳動で分離した。次に、銀染色で検出されたバンドのうち、HA タグなしのネガティブ・コントロールに見られないものを切り出し、質量分析を行った。また、マイトファジーが起こらない条件下でのサンプルや、いくつかの変異体のコンストラクトの精製を繰り返し試みて再現性の確認をしつつ、相互作用候補因子 Aip (Atg32 interacting protein) の絞り込みを行った。その結果、精製産物 Atg32-HA 自体や共沈することが既に判っている Atg11 とともに約 20 の Aip 因子が同定でき、解析をすすめた。この Aip のいくつかの遺伝子は破壊により、酵母は致死に至る(そのために、前回の遺伝学的スクリーニングではなく今回の生化学的手法によって新たに得られるという期待に一致)ため、まずはそのタンパク質に MYC タグを付けて、実際に in vivo で Atg32-HA との相互作用を検証した。その中でも、ミトコンドリア上で機能する、ある ABC トランスポーターである膜タンパク質において、共沈降を再確認出来、

これらのタンパク質間相互作用が強く示唆された。興味深いことに、ミトコンドリア内での特異的な相互作用を示すデータとして、Atg32のC末端側ミトコンドリアの膜間スペースに面した側を欠失したコンストラクトとこの因子との共沈降がみられなくなる結果も得られている。今後は、生化学的手法によって得られているAip因子群の更なる機能解析をすすめることで、マイトファジーの活性化(または収束)のシグナリングにおいて、Atg32がどのように他のタンパク質群と協同して、機能しているのか、詳細な機序の理解を深めることが期待される。他の新規相互作用因子候補として、Rsp5(E3 ユビキチン・リガーゼ)、Cka1, Cka2(カゼイン・キナーゼ2のサブユニット) Sfc1(コハク酸-フマル酸トランスポーター)等が、特異的に検出されており、細胞内での他の現象とのクロストークを解明も期待される。これらのAipとAtg32の詳細解析データを積み重ねにより、マイトファジーにて働く複合体の機能理解は今後より深まると期待される。



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4件)

- ① Kondo-Okamoto, N., Okamoto, K. (2012) Mitochondria and autophagy: critical interplay between the two homeostats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1820: 595-600. (査読無し)
DOI:10.1016/j.bbagen.2011.08.001

- ② Kondo-Okamoto, N., Noda, N.N., Suzuki, S.W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., Hashimoto, A., Inagaki, F., Ohsumi, Y., Okamoto, K. (2012) Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *J. Biol. Chem.*, 287: 10631-10638. (査読有り)
DOI: 10.1074/jbc.M111.299917

- ③ 岡本徳子, 岡本浩二, 大隅良典. (2010) 酵母のマイトファジー, ~観察からの始まり~. 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. (査読無し).

- ④ 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. (査読無し).

[学会発表] (計1件、招待講演)

岡本徳子, 鈴木翔, 岡本浩二, 大隅良典 「選択的ミトコンドリア分解の分子機構」第11回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ講演 (大阪) 2011年6月9日

[その他]

ホームページ等

ミトコンドリア動態学研究室ホームページ
http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/okamoto/Okamoto_Lab/

ミトコンドリア動態学研究室紹介
<http://www.omoroi-seimei.info/introduction/lab27-okamoto.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連帯研究者

なし

(4) 研究協力者

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