

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 20日現在

機関番号：38005  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770239  
 研究課題名(和文) タンパク質分解マシナリーの協調によるミトコンドリア機能維持の分子機構の解明  
 研究課題名(英文) Study on the mechanisms of mitochondrial maintenance by cooperation of proteolysis machineries  
 研究代表者  
 武田 鋼二郎 (TAKEDA KOJIRO)  
 沖縄科学技術大学院大学 グループリーダー  
 研究者番号：90426578

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの機能維持に関わるタンパク質分解経路因子を同定する為に分裂酵母をモデルとして遺伝学的スクリーニングをおこなった。その結果、潜在的なRING finger型ユビキチン連結酵素E3のひとつが、細胞が分裂と成長を停止するG0(静止)期において次期特異的にミトコンドリアの形態、分解に関与し、G0期の細胞の寿命の維持に必須であることを発見した。同定されたE3酵素の機能解析が進行中である。

研究成果の概要(英文)：In order to identify proteolysis factors, which are involved in maintaining mitochondrial quality, genetic screening was carried out, using *Schizosaccharomyces pombe* as a model organism. As a result, one potential E3 ubiquitin ligase (RING finger type) was identified to be required for mitochondrial morphology, mitophagy, and maintenance of life span of *S.pombe* cells in G0/quiescent phase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞、蛋白質、ミトコンドリア、蛋白質分解、寿命

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー生産の主要な場であるのみならず、鉄代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝などの必須機能を担う重要なオルガネラである。また、エネルギー生産を担う酸化リン酸化の不可避の副産物として、細胞機能に障害を与える酸化ストレスが生成される。それゆえミトコンドリア機能の破綻は細胞生存維持にとって深刻な結果を招くため、ミトコンドリア機能維持機構を理解する事は生物学的にも医学的に重要な課題である。事実、ミトコンドリア機能の不全や破綻が直接の原因となる深刻な疾患としていわゆる‘ミトコンドリア病’が挙げられるし、酸化ストレスが老化の一原因であるとの説も

広く受け入れられている。ミトコンドリア機能破綻が何らかの形で関わる疾患としては、パーキンソン病を始めとする神経変性疾患や糖尿病、発がんや腫瘍の悪性化などが報告されており、研究が進展している。研究開始当初、機能破綻したミトコンドリアの選択的オートファジーによる分解(マイトファジー)とミトコンドリアの形態制御やユビキチン系との関わりが相次いで報告され注目を集めていたが、種を超えて保存された共通の分子基盤の理解が不十分な状況であった。

## 2. 研究の目的

上記の研究当初の内外の状況であったので、当時、ミトコンドリアの選択的分解の研究が活発におこなわれていたモデル生物、出芽酵母とショウジョウバエやヒト培養細胞といった metazoa の間をつなぐために、分裂酵母 *S.pombe* を採用して研究を開始することを企図した。分裂酵母は出芽酵母とおなじく単細胞の真核生物であるが、遺伝子や分子経路の保存性を考慮すると、より metazoa に近いと考えられる。さらに、申請者のそれまでの研究結果から、分裂酵母の G0(静止)期においてはユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーが協調して、ミトコンドリアの品質保障に貢献していることが示唆されていた。すなわち、プロテアソームは何らかのかたちでミトコンドリアの機能維持にかかわり、プロテアソームの活性の低下は、ミトコンドリアでの酸化ストレスの産生を亢進させる。一方、オートファジーは酸化ストレスの亢進したミトコンドリアを分解していることが示唆された。以上から、ユビキチン/プロテアソーム系がなんらかのミトコンドリアの機能維持に関わる因子を分解することが示唆されるが、詳細は不明であった。また酸化ストレスの亢進したミトコンドリアが認識され分解されるメカニズムも不明であった。以上の背景から、強力な遺伝学的手法と生化学を駆使できる分裂酵母の系を用いて；

(1) プロテアソーム依存的に分解されるミトコンドリア機能制御蛋白質と、その分解に必要なユビキチン/プロテアソーム経路因子の同定と機能解析

(2) オートファジーによるミトコンドリア分解を促進する蛋白質の同定

以上を本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝学的なアプローチ

分裂酵母には実験的結果や配列上の相同性から約200のユビキチン経路因子(E1, E2, E3やその他)の存在が報告されている(英国 Sanger Institute GeneDB *S.pombe*)。そのうち125は遺伝子破壊株が利用可能であり、その他の遺伝子についても高温感受性変異株が利用できるものが多い。

これらの変異体のなかで静止期にミトコンドリアの劇的な減少や酸化ストレスの蓄積が見られるものを網羅的にスクリーニングする。ミトコンドリア減少はミトコンドリアタンパク質にGFPを付加して蛍光顕微鏡を用いて観察し、減少しているものについてWestern blotで確認実験を行う。

#### (2) 生化学的なアプローチ

ユビキチン化されたミトコンドリアタンパク質が、ミトコンドリア機能の破綻やオートファジーによる分解に関わっている可能性があるため、ミトコンドリアでのユビキチン化タンパク質を次の方法で同定する。ヒスチジンタグを付加したユビキチン(his-Ub)とFLAGタグを付加したユビキチン(FLAG-Ub)を発現する分裂酵母株にプロテアソーム変異を導入する。his-Ubを発現しない株、およびプロテアソーム活性が正常な株を負のコントロールとして用いる。これらの株の静止期細胞から differential centrifuge 法でミトコンドリアを分画する。ミトコンドリア画分からニッケル-NTA カラムを用いてユビキチン化タンパク質を精製し、液体クロマトグラフィー/質量分析機(LC/MS)を用いてタンパク質の同定をおこなう。his-Ubを発現し、かつプロテアソームが失活した株のミトコンドリアから精製/同定されたタンパク質が重要なユビキチン化タンパク質である可能性が高い。重要な基質がミトコンドリア上のみには限らないので細胞抽出液全体からも精製解析をおこなう。一段階の精製で十分なpurityが得られなければ、さらに抗FLAG抗体を用いて二段階精製を行う。非特異的な吸着を減少させるため、一段階目のニッケル-NTA カラムでは塩酸グアニジンか尿素の変性条件下で精製する。同定されたタンパク質に関して、抗体やエピトープタグを付加した分裂酵母株を作成し、質量分析で得られた結果をWestern blotなどで確認する。

### 4. 研究成果

生化学的なアプローチでは、精製したユビキチン化蛋白質(群)の精製度がわるく、改善を試みたものの、困難であった。一方、遺伝学的なアプローチからは成果が得られた。H23年度は、G0期におけるミトコンドリア機能維持に必須なE3ユビキチンリガーゼを遺伝学的に同定する為の網羅的スクリーニングをおこなった。準備として分裂酵母G0期で効率的にプロテアソームを阻害する必要があるため、分裂酵母でも使用可能なプロテアソーム阻害剤を探索した。その結果、抗がん剤として使用されるボルテゾミブが *in vivo* でプロテアソームの活性をよく阻害する事を見出し、論文として報告した(Takeda et al, 2011, PLoS One)。E3リガーゼのスクリーニングは、変異体や遺伝子破壊株が利用可能なE3リガーゼ遺伝子のうち、約8割(70変異株)まで終了した。G0期で生存率を維持できないE3変異株は16株、ミトコンドリアに何らかの異常を示すものは20株、両方の表現型を示す6株であった。G0期で生存率が低下し、かつミトコンドリアに異常を示す変

異株のうち、pqr1 変異株は G0 期においてプロテアソーム阻害によって引き起こされるミトコンドリアのオートファジーによる分解 (mitophagy) に欠損が見られた。pqr1 変異株においてはミトコンドリアが高度に断片化していることから、本研究課題の目標から考えて非常に興味深く、さらに機能解析を行う予定である。Pqr1 遺伝子は RING finger ドメインを持ち、出芽酵母では保存されていないがヒトを含む metazoa は低い率ながら相同性を示すタンパク質が存在する。また、pqr1 以外にもミトコンドリア形態に異常をしめす E3 変異株を取得しており、これらは本研究課題の直接的なターゲットではないが、興味深い副産物と言える。

H24年度はPqr1の機能解析をおこなった。Pqr1に緑色蛍光タンパク質を融合したPqr1-GFPの細胞内の局在を観察したところ、Pqr1は細胞質にドット状に局在することがわかった。これがミトコンドリアであるかどうかは現在のところ不明である。Pqr1-GFPはGFP付加によってタンパク質の活性が低下するようであったので、ポリクローン抗体作製の準備を開始し、現在も継続している。Pqr1遺伝子破壊株の示すmitophagy欠損の表現型が;

(1) mitophagy特異的であるのか

(2) オートファジーの活性が一般的に異常となるのか、

がPqr1研究の上で重要なポイントとなる。これを明らかとする為に、GFP-Atg8を用いた general autophagy活性を評価するシステムを導入し、pqr1遺伝子破壊株でオートファジー活性を検討した。結果、pqr1遺伝子破壊株中ではオートファジー活性自体が(完全に阻害される訳ではないけれども)影響を受けることが判明した。Pqr1はmitophagy特異的な因子ではなく、むしろ全般的なオートファジー活性に関わるタンパク質であるのかもしれない。この実験系では定量的な評価が重要となるので、どちらの可能性も留保しつつ、引き続き研究を進める。今後、論文発表の準備を開始する予定である。

## 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 3 件)

- (1) Takeda, K., Tonthat, N., Glover, T., Xu, W., Koonin, E., Yanagida, M., and Schumacher, M. “Implications for proteasome nuclear localization revealed by the structure of the nuclear proteasome tether protein Cut8” *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16950-16955, 2011 査読あり
- (2) \*Takeda, K., Mori, A., and Yanagida, M. “Identification of genes affecting the toxicity of anti-cancer drug Bortezomib by genome-wide screening in *S. pombe*” *PLoS One* 6(7), e22021, 2011 (\*: corresponding author) 査読有り
- (3) Shiroiwa, Y., Hayashi, T., Fujita, Y., Villar-Briones, A., Ikai, N., Takeda, K., Ebe, M., and Yanagida, M. “Mis17 is a regulatory models of the Mis6-Mal2-Sim4 centromere complex that is required for the recruitment of CenH3/CENP-Ain fission yeast” *PLoS One* 6(3), e17761, 2011 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Kojiro Takeda, Nam K tonthat, Tiffany Glover, Weijun Xu, Eugene V. Koonin, Mitsuhiro Yanagida and Maria Schumacher. “The nuclear proteasome tethering factor Cut8 directly binds to the nuclear envelope through 14-3-3-like structure” 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日 (ワークショップ 口頭発表)
- (2) Kojiro Takeda, Nam K tonthat, Tiffany Glover, Weijun Xu, Eugene V. Koonin, Mitsuhiro Yanagida and Maria Schumacher. “The nuclear proteasome tethering factor Cut8 directly binds to the nuclear envelope through 14-3-3-like structure” 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日 (ポスター発表)
- (3) 武田鋼二郎, 森礼郁, 柳田充弘. “抗がん剤ボルテゾミブ添加と合成致死となる分裂酵母遺伝子破壊株の単離” 第 44 回酵母遺伝学フォーラム, 福岡, 2011 年 9 月 5-7 日 (ポスター発表)

(4) 武田鋼二郎

“蛋白質分解系の協調によるミトコンドリア品質管理と静止期細胞の寿命維持”  
アステラス病態代謝研究会  
第42階研究報告会  
2011年10月15日（東京）

(5) Kojiro Takeda, Nam K tonthat, Tiffany Glover, Weijun Xu, Eugene V. Koonin, Mitsuhiro Yanagida and Maria Schumacher.

“Implications for proteasome nuclear localization revealed by the structure of the nuclear proteasome tether protein Cut8”  
The 5<sup>th</sup> International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, Okinawa  
2011年10月23-27日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 鋼二郎 (TAKEDA KOJIRO)  
沖縄科学技術大学院大学  
GO細胞ユニット グループリーダー  
研究者番号：90426578

(2) 研究分担者

研究分担者はおいていない。  
研究者番号：

(3) 連携研究者

連携研究者はおいていない。  
研究者番号：