

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291045

研究課題名(和文) 選択的ミトコンドリア分解の分子基盤と制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms and molecular bases of selective mitochondria degradation

研究代表者

岡本 浩二 (OKAMOTO, Koji)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：40455217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーに依存したミトコンドリアの選択的分解は「マイトファジー」と呼ばれ、酵母からヒトまで保存された基本的な機構であり、ミトコンドリアの質や量を管理する仕組みとして寄与している。本研究では、酵母の変異体を用いた解析により、リン脂質メチル化酵素・タンパク質N末端アセチル化酵素・新生ポリペプチド鎖結合因子が、効率よくマイトファジーを起こすのに重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Autophagy-dependent degradation selective for mitochondria, termed mitophagy, is a fundamental mechanism conserved from yeast to humans that contributes to mitochondrial quality and quantity control. In this study, we analyzed yeast mutants and demonstrated that phospholipid methyltransferase, protein N-terminal acetyltransferase, and nascent polypeptide chain-associated factor are important for efficient mitophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア オートファジー リン脂質メチル化酵素 タンパク質N末端アセチル化酵素 新生ポリペプチド鎖結合因子 出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは「細胞の発電所」とも呼ばれる ATP 産生の要であり、細胞はそのエネルギー需要によって、ミトコンドリアの量をダイナミックに増減させる。一方ミトコンドリアは、そのエネルギー変換の過程で生じる活性酸素種に直接曝されている。過去の知見から、余剰なミトコンドリアや酸化ストレスによるダメージを蓄積したミトコンドリアは丸ごと隔離され、分解コンパートメントであるリソソーム（酵母や植物では液胞）に運ばれて除去されると考えられている。この機構はオートファジーの系を利用していることから「マイトファジー」と呼ばれ、近年注目されてきた。オートファジーが非特異的かつ大規模に細胞質成分を分解する仕組みであるのに対し、マイトファジーはミトコンドリアの除去に特化した、いわゆる選択的オートファジーの一種である（図1）。最近、神経変性疾患であるパーキンソン病の関連因子が、ミトコンドリア分解に関与していることが明らかとなり、品質管理システムとしてのマイトファジーの役割が示唆された。このように、マイトファジーの重要性が明白となる一方、病態を理解するのに不可欠な分子機構や生理機能については、不明な点が多い。

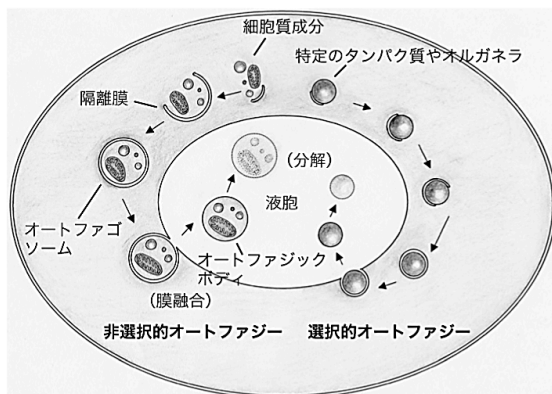


図1. オートファジーの膜動態

申請者らの研究グループは出芽酵母をモデルに用いて、2009年に選択的ミトコンドリア分解（マイトファジー）の分子基盤をゲノムワイドに獲得し、ミトコンドリアを分解すべき基質として特異的に認識するための分別マーク・タンパク質 Atg32 を世界に先駆けて同定・解析した。Atg32 はミトコンドリア外膜へ局在する膜貫通型タンパク質であり、オートファジー（自食作用）関連タンパク質 Atg8 及び Atg11 と物理的に結合する。オートファジーは、2重膜でできた袋状構造（オートファゴソーム膜）に細胞質成分を閉じ込め、それをリソソーム（酵母では液胞）に運んで分解する、細胞内リサイクル機構である。Atg8 はオートファゴソーム膜やその中間体構造（隔離膜）に局在するユビキチン様の脂質結合分子であり、Atg11 はこれら膜形

成に必須なコア Atg タンパク質群の集積の「足場」として働く。Atg32 が Atg8 や Atg11 と直接相互作用することで、ミトコンドリアに対する基質認識が成立すると考えられる。Atg32 はマイトファジーに特異的かつ必須な、唯一の因子である（図2）。

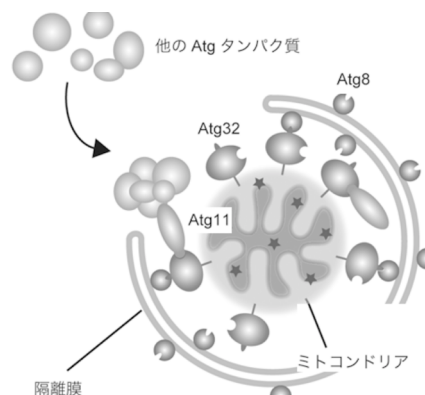


図2. マイトファジーにおけるミトコンドリア隔離のモデル

マイトファジーは酵母からヒトまで保存された基本的な仕組みであり、ミトコンドリアの品質と量の管理を行う上で重要な役割を果たすと考えられる。その破綻は細胞の正常な機能を損ない、様々な病態を引き起こすことが指摘されている。このように、マイトファジーに関する研究が世界中で脚光を浴び、爆発的に進展している一方、そのメカニズムは未だ多くの謎に包まれている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はマイトファジーの分子機構を解明することであり、この「オルガネラ丸ごと除去システム」を人為的に制御する技術基盤の確立へ繋げる。研究期間内では、マイトファジー特異的因子の中で酵母からヒトまで保存された3つのタンパク質に焦点を当て、以下のことを達成してゆく。

- (1) リン脂質メチル基転移酵素 Opi3 欠損細胞に見られる、脂質化 Atg8 の過剰蓄積の原因およびマイトファジーに及ぼす影響を明らかにする。
- (2) タンパク質 N 末端アセチル化酵素 NatA (Ard1, Nat1 のヘテロダイマーで構成) の欠損によって引き起こされる、マイトファジーにおける異常を明らかにする。
- (3) 新生ポリペプチド鎖結合複合体の構成因子 Egd1 のマイトファジーにおける分子機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)平成 25 年度においては、①opi3 欠損細胞のリン脂質組成の 2 次元薄層クロマトグラフィーによる解析、②opi3 欠損細胞で Atg8 に共有結合しているリン脂質 X の質量分析に

よる同定、③Atg8-X の脱脂質化の *in vitro* 解析、を計画した。

(2)平成 26 年度においては、①Ard1 および Nat1 への変異を導入と、マイトファジー活性の解析、②マイトファジーの初期段階である隔離膜の形成についての顕微鏡観察、③基質候補タンパク質の N 末端アセチル化の役割と Atg32 の発現レベルの解析、を計画した。

(3)平成 27 年度においては、①Egd1 と結合するリボソームサブユニットへの変異導入と、マイトファジー活性の解析、②マイトファジー誘導条件下での、Egd1 の相互作用因子の同定、を計画した。

(4)平成 28 年度においては、①Egd1 の相互作用因子 Om14 の分子機能の解析、②膜形態制御ダイナミン様 GTPase の関与の検討、を計画した。

#### 4. 研究成果

(1)リン脂質メチル基転移酵素 Opi3 を欠失した酵母細胞では、マイトファジーが強く抑制される。細胞の主要なリン脂質フォスファチジルコリン(PC)は、フォスファチジルエタノールアミン(PE)のメチル化によっても生成される。酵母においては、PE にメチル基を 1 つ付加してフォスファチジルモノメチルエタノールアミン(PME)を生成する酵素 Cho2 と、PME にメチル基を 2 つ付加して PC を生成する Opi3 が存在する。細胞から Atg8 を精製し質量分析を行った結果、opi3 欠失細胞に蓄積した PME が Atg8 に共有結合することがわかった。野生型細胞で生成される Atg8-PE とは異なり、Atg8-PME はマイトファジーを効率よく起こすことができない。加えて、Opi3 欠失によって Cho2 の発現が異常に亢進していた。リン脂質のメチル化は、抗酸化物質グルタチオンの生成と共役している。グルタチオン量が上昇すると、マイトファジーに必須なタンパク質 Atg32 の発現は抑制されるが、実際に opi3 欠失細胞ではグルタチオン量が増加し、Atg32 のレベルも顕著に低下していることがわかった。これらの知見は、Cho2 および Opi3 によるリン脂質メチル化反応の適切な制御が、マイトファジーに重要であることを示唆している。

(2)出芽酵母のタンパク質 N 末端アセチル化酵素 NatA を欠失した細胞では、マイトファジーが強く抑制される。Nat は酵母からヒトまで保存されており、リボソームと結合しながら新生鎖の N 末端のアセチル化を触媒する。酵母には 5 種類の Nat があり、1 つの触媒サブユニットと 1 または 2 つのアダプターサブユニットからなる複合体を形成して、アセチル CoA のアセチル基を新生鎖の N 末端

に転移する。NatA は触媒活性をもつ Ard1 と、リボソーム結合部位を有する Nat1 から構成される。Ard1 の触媒活性に重要なアミノ酸へ変異を導入した結果、アセチル化反応を触媒する NatA の活性がマイトファジーに必要であることがわかった。加えて、Nat1 欠失細胞でもミトコンドリア分解の強い抑制が見られたことから、リボソームへの NatA の結合もマイトファジーに重要であることが示唆された。これらの知見は、NatA によってアセチル化される基質タンパク質の中に、マイトファジーを促進する因子が存在し、その因子の機能がアセチル化によって制御されている可能性を提起している。ミトコンドリアは、「オートファゴソーム」と呼ばれる 2 重膜構造によって隔離される。ミトコンドリアを隔離した構造体は「マイトファゴソーム」と呼ばれる。興味深いことに、ard1 あるいは nat1 欠損細胞でマイトファゴソームの形成が抑制されていることが、蛍光顕微鏡観察によって明らかとなった。さらに、Atg32 の過剰発現によって、NatA 欠失細胞におけるマイトファジーが部分的に回復されることがわかった。NatA 欠失細胞で Atg32 の発現レベルが低下していることから、Atg32 の発現抑制がマイトファジー障害の要因の一つであると考えられる。一方、NatA によるアセチル化で制御されている未知のマイトファジー関連因子が存在し、その機能不全は Atg32 の過剰発現で間接的に補えるのかもしれない。

(3)マイトファジー関連因子の中には、タンパク質の生合成に関与する新生ポリペプチド結合複合体 NAC の構成因子 Egd1 が含まれる。興味深いことに、Egd1 は選択的ペルオキシソーム分解にも重要であることがわかった。NAC は進化的に保存されており、リボソームと結合しながら新生ポリペプチドに働く分子シャペロンの一つとして、転写調節・小胞体ストレス応答・タンパク質標的化などに役割を果たすと考えられている。出芽酵母において、NAC は 2 つのサブユニット  $\alpha$  と  $\beta$  から成るヘテロダイマーを形成する。 $\alpha$ -NAC にはユビキチン結合に関与する UBA ドメインを持つ Egd2、 $\beta$ -NAC にはリボソーム結合に関与するモチーフを持つ Egd1 と Btt1 が存在している。遺伝子欠失変異解析の結果、Egd2 と Btt1 はマイトファジーに重要でないことがわかった。これらの結果から、Egd1 はパートナーである Egd2 に依存せず、また Edg2-Btt1 複合体とも独立して、ミトコンドリアやペルオキシソームの分解、すなわちオルガネラファジーに共通かつ特異的に関与していると考えられる。Egd1 のリボソーム結合部位モチーフにアラニン置換を導入すると、マイトファジーとペキソファジーが障害される。加えて、Egd1 と相互作用することが示唆されているリボソームのサブユニット Rpl31 の欠損細胞におい

ても、Egd1 の発現には影響が見られないにも関わらず、同様のマイトファジー障害が見られた。これらの知見は、リボソームでの新規合成過程で Egd1 と直接相互作用する未知のタンパク質が存在し、マイトファジーに特異的かつ重要な役割を果たしていることを示唆している。

(4)最近、NAC がミトコンドリア外膜タンパク質 Om14 と結合し、合成と共役したタンパク質輸送に機能していることが報告された。なお、NAC のミトコンドリアタンパク質輸送の機能は、Egd1 だけでなく Egd2 も必要とするが、Egd2 欠損細胞でマイトファジーは大きな影響を受けていないことを確認している。一方、Om14 欠損細胞でマイトファジーを調べたところ、顕著に低下していることがわかった。さらに、野生株や Egd1 および Egd2 欠損細胞で見られるミトコンドリアの断片化が、Om14 欠損細胞では強く抑制されていることを見出した。ミトコンドリアが小さく断片化することは、マイトファジーが効率よく起こるために重要であると考えられている。既知のミトコンドリア分裂制御因子 Dnm1 を欠損してもマイトファジーは 8 割程度の効率で起こるが、Om14 欠損細胞では 6 割近くまで顕著に低下することがわかった。Om14 はミトコンドリア外膜に局在する膜タンパク質であり、オートファジーやタンパク質を積み荷とした選択的オートファジーには必要ない。以上の知見から、マイトファジーにリンクして駆動するミトコンドリア断片化機構があり、Om14 はその経路で重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、ミトコンドリア分裂に必須なダイナミン様 GTPase Dnm1 がミトコンドリアに局在しているかどうかを調べるため、Dnm1-GFP を Om14 欠損細胞で発現させ蛍光顕微鏡で解析した。その結果、野生株同様、Dnm1-GFP はミトコンドリアへ正常に局在していることが明らかとなった。次に、他のダイナミン様 GTPase の欠損細胞におけるミトコンドリア断片化を調べた。その結果、エンドサイトーシスに機能する Vps1 や小胞体の形態形成を担う Sey1 を欠損した細胞でも、ミトコンドリアは断片化することがわかった。以上の知見は、ダイナミン様 GTPase 以外のタンパク質が、マイトファジー誘導時のミトコンドリア断片化に働く可能性を提起している。

## 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 10 件)

- ① Eiyama A, Okamoto K. (2017) Assays for mitophagy in yeast. *Methods Mol. Biol.*, 1567, 337-347. (査読有り)  
DOI: 10.1007/978-1-4939-6824-4\_20

- ② Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M, Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, Nakatogawa H, Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, Okamoto K. (2015) Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J.*, 34, 2703-2719. (査読有り)  
DOI: 10.15252/embj.201591440
- ③ Eiyama A, Okamoto K. (2015) Protein N-terminal acetylation by the NatA complex is critical for selective mitochondrial degradation. *J. Biol. Chem.*, 290, 25034-25044. (査読有り)  
DOI: 10.1074/jbc.M115.677468
- ④ Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah, AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K., Sakata Y, Otsu K. (2015) Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat. Commun.*, 6, 7527. (査読有り)  
DOI: 10.1038/ncomms8527
- ⑤ Eiyama A, Okamoto K. (2015) PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 33, 95-101. (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.ceb.2015.01.002
- ⑥ Liu L, Sakakibara K, Chen Q, Okamoto K. (2014) Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Res.*, 24, 787-795. (査読有り)  
DOI: 10.1038/cr.2014.75
- ⑦ Okamoto K. (2014) Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J. Cell Biol.*, 205, 435-445. (査読有り)  
DOI: 10.1083/jcb.201402054
- ⑧ Kanki T, Okamoto K. (2014) Assays for autophagy II: Mitochondrial autophagy. *Methods Mol. Biol.*, 1163, 165-173. (査読有り)  
DOI: 10.1007/978-1-4939-0799-1\_11
- ⑨ Shiroma S, Jayakody LN, Horie K, Okamoto K., Kitagaki H. (2014) Enhancement of ethanol fermentation

in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 1002-1012. (査読有り)  
DOI: 10.1128/AEM.03130-13

- ⑩ Eiyama A, Kondo-Okamoto N, Okamoto K. (2013) Mitochondrial degradation during starvation is selective and temporally distinct from bulk autophagy in yeast. *FEBS Lett.*, 587, 1787-1792. (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.04.030

[学会発表] (計 17 件)

- ① 岡本浩二. 酵母が語るマイトファジー誘導の分子機構. 蛋白質研セミナー. 大阪大学蛋白質研究所 (大阪府吹田市). 2017 年 3 月 21 日. (招待講演)
- ② 岡本浩二. 体の中のエネルギー・環境問題～ミトコンドリアを丸ごと分別・除去する仕組み～. 生化学若い研究者の会近畿支部冬のセミナー. 大阪大学大学院生命機能研究科 (大阪府吹田市). 2017 年 1 月 15 日. (招待講演)
- ③ 岡本浩二. ユビキチン様タンパク質 Atg8 の新規結合様式. 蛋白質研セミナー. ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市). 2016 年 3 月 4 日. (招待講演)
- ④ Okamoto, K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *2015 TSMRM Symposium on Mitochondrial Dysfunction in Human Diseases*. Taipei, Taiwan. December 5, 2015. (招待講演)
- ⑤ Okamoto K. Multiple pathways regulating mitochondria-specific autophagy. *Cold Spring Harbor Asia Conference on Mitochondria*. Suzhou, China. October 14, 2015. (招待講演)
- ⑥ 岡本浩二. マイトファジー: ミトコンドリアを丸ごと分解する分子機構と生理機能. 第 34 回分子病理学研究会. 神戸ホテル フルーツ・フラワー (兵庫県神戸市). 2015 年 7 月 25 日. (招待講演)
- ⑦ 岡本浩二. オートファジーが駆動する選択的ミトコンドリア分解. 第 135 回日本薬学会. 神戸学院大学 (兵庫県神戸市). 2015 年 3 月 27 日. (招待講演)
- ⑧ Okamoto K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *7th International Symposium on Autophagy*. Anhui, China. March 21, 2015. (招待講演)

- ⑨ 岡本浩二. ミトコンドリアを丸ごと隔離・除去する仕組み. 第 25 回フォーラム・イン・ドージン「温故知新のミトコンドリア学」. 熊本ホテルキャッスル (熊本県熊本市). 2014 年 11 月 14 日. (招待講演)
- ⑩ 岡本浩二. リン脂質メチル化を介した選択的ミトコンドリア分解の制御. 第 9 回臨床ストレス応答学会大会, シンポジウム「オルガネラストレスとエピジェネティクス」. 岡山大学 (岡山県岡山市). 2014 年 11 月 1 日. (招待講演)
- ⑪ 岡本浩二. 酵母が語る選択的ミトコンドリア分解の基本原則. 第 87 回日本生化学会大会, シンポジウム「細胞と個体におけるミトコンドリアの形成と機能維持」. 京都国際会館 (京都府京都市). 2014 年 10 月 18 日. (招待講演)
- ⑫ Okamoto K. An unexpected link between phospholipid methylation and mitophagy. *2nd International Picobiology Institute Symposium*. 兵庫県立大学 (兵庫県赤穂郡). October 10, 2014. (招待講演)
- ⑬ 岡本浩二. オートファジーが駆動するミトコンドリア分解の仕組み. 第 52 回日本生物物理学会年会, シンポジウム「膜動態から探るミトコンドリア・ネオバイオロジー」. 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市). 2014 年 9 月 26 日. (招待講演)
- ⑭ Okamoto K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *4th Asia Pacific Protein Association Conference*. Jeju, Korea. May 18, 2014. (招待講演)
- ⑮ Okamoto K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *Keystone Symposium on Mitochondrial Dynamics and Physiology*. Santa Fe, USA. February 21, 2014. (招待講演)
- ⑯ Okamoto K. Targeting autophagy for mitochondrial clearance. *10th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM)*. Seoul, Korea. November 5, 2013. (招待講演)
- ⑰ 岡本浩二. リン脂質代謝の異常から垣間見えてきたマイトファジーの分子機構. 第 86 回日本生化学会大会, シンポジウム「ミトコンドリアワールド」. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市). 2013 年 9 月 11 日. (招待講演)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/34/>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
岡本 浩二 (OKAMOTO, Koji)  
大阪大学・生命機能研究科・准教授  
研究者番号：40455217