

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620135

研究課題名(和文)細胞内でのミトコンドリアの動きには酵素活性が必要なのか？

研究課題名(英文) Does enzymatic activity involve in mitochondrial movement?

研究代表者

小柴 琢己 (Koshiba, Takumi)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70403970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生命機能の根幹に位置するミトコンドリアは、細胞質全体に管状の網様構造を形成・分布し、融合と分裂を絶えず繰り返す動的なオルガネラである。このミトコンドリア形態のバランスが崩れると、高次生命機能に様々な悪影響を及ぼすことが次第に明らかになってきた。本研究では、上記未解明の点が多い「ミトコンドリアの形の謎」を、その関連タンパク質(GTPase及びメタロプロテアーゼ)の構造機能解析を通じて、分子レベルで明らかにした。特に、ミトコンドリア形態維持に重要なOPA1(GTPase)のプロテアーゼによるプロセッシングが、ミトコンドリアの微妙な形のバランス維持に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are dynamic organelles that undergo continuous fusion and fission, and these processes are believed to be essential for physiologic function of organisms. Once their balances become to be disrupted, it has been revealed that much of unexpected influences accumulate on physiologic functions.

Our aims of the project is to elucidate their mystery of the mitochondrial shape, and try to understand the mechanism by a molecular level. In this study, we focused on the role of a mitochondrial GTPase, OPA1 and the regulatory molecule of metalloproteases. We identified that OPA1 processing by the proteases would be an essential process for the maintaining of mitochondrial morphology.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：ミトコンドリア 酵素活性 GTPase

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、エネルギー産生やカルシウム貯蔵などにおいて重要な役割を果たすオルガネラであるが、その形態は特徴的で、一般に細胞質全体に管状の網様構造を形成・分布し、ダイナミックに融合と分裂を繰り返している。ところで、このようなミトコンドリアの形はどのように調節、また保たれており、さらにその生理的な意味は何なのだろうか？

これまでミトコンドリア形態の調節に働くタンパク質は十数例報告されており、興味深いことに、その多くが GTPase である。そのため、ミトコンドリアの形態調節には GTP 加水分解時に獲得されるエネルギー差が駆動力として使われていると考えられてきた(小柴、2005、生物物理)。また近年、ユビキチン活性を有するタンパク質も、ミトコンドリアの形態調節に関わっていることが明らかになってきた。このように、ミトコンドリアの形を考える上で酵素活性は一つのキーワードになるが、その作用機序は依然として未解明のまま残されてきた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内におけるミトコンドリアの形態調節機構の作用機序を明らかにすることを目的とした。そこで本研究では、その調節機構に関わる関連酵素群の構造機能解析を行い、どのようにオルガネラ膜を再構成するのか、分子レベルで明らかにすることを目指した。特に、本研究ではミトコンドリア融合に関わる GTPase・OPA1 が、ミトコンドリア局在型メタロプロテアーゼ (Yme1、及び OMA1) によるプロセッシングとどのように関連するのか、その謎に迫った。

3. 研究の方法

本研究では、OPA1、Yme1、及び OMA1 がそれぞれ欠損したマウス由来の胚性線維芽細胞 (MEF) を用いた。これら細胞株に、遺伝子工学的手法により各機能ドメインに点変異を導入した OPA1、Yme1、及び OMA1

変異体を作製、それら変異遺伝子を入れ戻した細胞株を樹立し、プロテアーゼ活性による OPA1 の切断をはじめ、その表現型とミトコンドリア形態との関連を詳細に調べた。

4. 研究成果

(i) 細胞性ストレスによる OMA1 の活性化に関する解析

これまでの先行研究 (Baker *et al.*, 2014, *EMBO*) により、細胞に薬剤 (脱共役剤) 処理などのストレスを与えると OMA1 は活性型分子に転じ (自己限定消化)、その後のミトコンドリア分裂を誘引することが明らかになっていた。本研究では、まず初めに OMA1 の自己活性化に関する検証実験から計画を開始した。野生型の MEF に対して 20 μ M CCCP を添加し、その後、免疫染色法によるミトコンドリアの形態観察、及びウエスタンブロットによる OMA1 の自己消化の確認を行ったところ、これまでの報告通り、OMA1 は自己消化に伴う活性型に転じており、その結果、OPA1 を消化し、最終的にミトコンドリアの分裂が観察された。そこで、OMA1 のプロテアーゼドメイン内にある 324 番目のアミノ酸残基 (Glu) を置換し、不活性型 OMA1 を作製して同様の実験を行ったところ、ミトコンドリアの分裂は観察されなかった。同様に、OMA1 欠損細胞を用いた実験においても OPA1 の消化、ならびにミトコンドリア分裂は確認されなかった。このことにより、OMA1 によるプロテアーゼ活性は、自身の活性化以外にも、その下流にある分子 OPA1 の切断にも必須であることが明らかになった。

(ii) 細胞性ストレスによる Yme1 の役割に関する解析

次に、細胞の脱共役ストレスによる Yme1 の寄与を検討した。上記同様に、野生型 MEF の CCCP 処理後の細胞抽出液をウエスタンブロットにより Yme1 の解裂を観察したところ、コントロールと比較して

違いが観察されなかった。そこで、Yme1 欠損細胞を用いて、同様の CCCP 処理を施した細胞抽出液を OPA1 によるウエスタンブロットを行ったところ、野生型細胞と同様に、Yme1 欠損細胞でも OPA1 の切断が行われていた。この結果は、内在性の OMA1 による OPA1 の解裂が原因と考え、OMA1/Yme1 両欠損細胞にて同様の実験を行った結果、OMA1 による OPA1 のプロセッシングが確認できた。従って、ミトコンドリア局在型メタロプロテアーゼである OMA1 及び Yme1 はそれぞれ異なる作用機序により OPA1 の切断を行っており、ミトコンドリア形態を調節していることが示された。

(iii) OMA1 の大量発現系の構築

以上のようなプロテアーゼ活性によるミトコンドリアの形態変化の作用機序を明らかにする目的で、本研究では *in vitro* によるプロテアーゼアッセイの確立を試みた。マウス由来の OMA1 cDNA を PCR 法により増幅し、大腸菌用発現ベクター pGEX6P-1 にクローニングし、発現実験を行ったところ、培地 1L あたり、1mg 程度の発現を確認することができた。そこで、その発現菌体を回収、精製し、組換え体を用いたプロテアーゼ活性を調べた。しかしながら、組換え体による OPA1 の切断は確認できず、その原因として、ミトコンドリア膜への局在の重要性が考えられた。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

- 1). Shibata, T., Maki, K., Hadano, J., Fujikawa, T., Kitazaki, K., Koshiba, T., and Kawabata, S. (2015) Crosslinking of a peritrophic matrix protein protects gut epithelia from bacterial exotoxins. *PLoS Pathog.*, 11, e1005244. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005244
- 2). Kobayashi, T., Takahashi, T., Shibata, T., Ikeda, S., Koshiba, T., Mizumura, H., Oda, T., and Kawabata, S. (2015) Factor B is the second lipopolysaccharide-binding protease

zymogen in the horseshoe crab coagulation cascade. *J. Biol. Chem.*, 290, 19379-19386. DOI: 10.1074/jbc.M115.653196

3). #Koshiba, T. (2015) Protein-protein interactions of mitochondrial-associated protein via bioluminescence resonance energy transfer. *Biophysics and Physicobiology*, 12, 31-35. (#責任著者)

4). Yoshizumi, T., Ichinohe, T., Sasaki, O., Otera, H., Kawabata, S., Mihara, K., and #Koshiba, T. (2014) Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat. Commun.*, 5, 4713. (#責任著者) DOI: 10.1038/ncomms5713

5). Nguyen, T.T., Oh, S.S., Weaver, D., Lewandowska, A., Maxfield, D., Schuler, M.H., Smith, N.K., Macfarlane, J., Saunders, G., Palmer, C.A., Debattisti, V., Koshiba, T., Pulst, S., Feldman, E.L., Hajnóczky, G., and Shaw, J.M. (2014) Loss of Miro1-directed retrograde mitochondrial movement results in a novel murine model for neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, E3631-E3640. DOI: 10.1073/pnas.1402449111

6). Kobayashi, Y., Shiga, T., Shibata, T., Sako, M., Maenaka, K., Koshiba, T., Mizumura, H., Oda, T., and Kawabata, S. (2014) The N-terminal Arg residue is essential for autocatalytic activation of a lipopolysaccharide-responsive protease zymogen. *J. Biol. Chem.*, 289, 25987-25995. DOI: 10.1074/jbc.M114.586933

[学会発表](計 3 件)

1). 小柴琢己: 「Mitochondria and antiviral signaling」*BMB2015* (会頭: 遠藤斗志也 教授、神戸ポートアイランド(神戸)、2015 年 12 月)

2). Koshiba, T.: 「Influenza A viral protein PB1-F2 and mitochondria」*The 5th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology (CMCB-2015)* (Organizers; BIT Congress Inc., Nanjing, China, April 2015)

3). 小柴琢己: 「ミトコンドリアと抗 RNA ウイルス自然免疫」*第 52 回 日本生物物理学会年(年会長: 川端和重 教授、札幌コンベンションセンター(札幌)、2014 年 9 月)*

[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

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~koshiba/>

http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/faculty2_j.cgi?ID=K002718

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小柴 琢己 (KOSHIBA TAKUMI)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70403970

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし