

研究題目 ミトコンドリア局在型メタロプロテアーゼの網羅的な基質探索

研究組織

研究代表者：小柴 琢己（福岡大学理学部）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：錦織 充広（福岡大学理学部）

平田 聖里菜（福岡大学理学部）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

ミトコンドリアは細胞内において、融合と分裂を繰り返すダイナミックなオルガネラである（以下、ミトコンドリア・ダイナミクスと称す）。このようなミトコンドリア・ダイナミクスは、どのように調節・維持（メカニズム）されており、さらにその生理的な意義は何か？これらの学術的な問いに対する明確な答えは今までのところ得られていない。本研究では、ミトコンドリア形態の調節に関わるメタロプロテアーゼ (OMA1) の構造機能解析を通じて、ミトコンドリア・ダイナミクスの仕組みを分子レベルで紐解くことを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

本研究では、OMA1 を介したミトコンドリア・ダイナミクスに関わる新規タンパク質群（基質候補）の同定をプロテオーム解析により網羅的に探索し、その後に候補分子の切断部位の特定を以下のような研究計画を立てた。

i) 初めに、マウス由来 OMA1 遺伝子 (cDNA) に Myc タグを付加した組換え遺伝子 (Bait) を作製し、OMA1 欠損細胞株（マウス胚繊維芽細胞；OMA1^{-/-} MEFs）への遺伝子導入により安定発現株（ピューロマイシン選択）を樹立した。同時に、プロテアーゼ活性が消失した OMA1 変異細胞株 (E324Q) の樹立も行った。

ii) 次に、これら安定発現株を用いて、Bait 分子との隣接分子群（又は複合体形成）をプロテオーム解析により明らかにした。具体的な手法として、各発現株の培地中に架橋剤（0.2% ホ

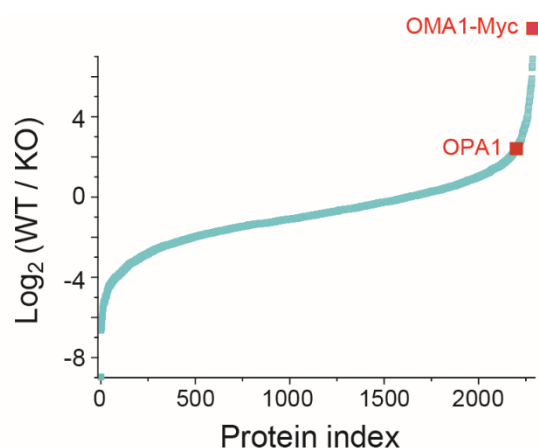
ルムアルデヒド）を添加することにより、Bait 分子との隣接距離内に局在する相互作用因子に生細胞内で架橋反応を行い、その後に細胞分画よりミトコンドリア画分を抽出し、その抽出産物から抗 Myc 抗体 (My3) 及び Protein G 樹脂 (Bio-Rad Laboratories) による架橋産物の精製を行った（免疫沈降法）。

iii) 上記の免疫沈降物を酵素消化後に質量分析計 (LC-MS/MS) に提供し、Proteome Discoverer を用いたラベルフリー定量解析により相互作用因子の探索を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本研究を進めた結果、OMA1 の有力な相互作用分子を複数発見することが出来た。下図は、OMA1^{-/-} MEFs に対して、野生型 OMA1-Myc コンストラクトを入れ戻した細胞株でのミトコンドリア内における相互作用ネットワーク解析の一例を示した（対照細胞として KO 細胞）。



IP-MS 法によるプロテオーム解析は小迫教授との共同研究として行い、生細胞内における OMA1 の相互作用分子を網羅的に探索した。その結果、正のコントロールである自己分子 (OMA1-Myc) を筆頭に、有力な新規分子を約数十個同定し、既存の基質として知られている OPA1 も上位候補として同定することが出来た。今後の予定は、再現性を含めた実験と共に、OMA1 の基質候補の探索 (切断箇所の特定) も進める。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

小迫教授の研究グループは、これまでプロテオーム解析を軸にした網羅的な探索や、高性能質量分析計を駆使した特定部位の翻訳後修飾の高感度な同定や定量法の確立により、ミトコンドリアの選択的分解 (マイトファジー) に関わるタンパク質群の詳細な分子機構を明らかにしてきた (Koyano *et al.* 2014 *Nature* ; Sato *et al.* 2018 *Nature Cell Biology* など)。

また、研究代表者とも過去に共同研究の実績があり、本研究の OMA1 関連分子の解析において同手法が決定的な貢献を果たした (Yoshinaka *et al.* 2019 *iScience* ; Koshiba & Kosako 2020 *J.B.*)。以上、本研究の推進は今後の飛躍な成果に繋がることが期待され、その効果はミトコンドリア研究領域全体も波及する進歩的な発展性が予想される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Yasukawa, K. and **Koshiba, T.** (2021) Mitochondrial reactive zones in antiviral innate immunity. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1865**, 129839.

平田聖里菜、**小柴琢己** (2021) ミトコンドリアと免疫機能. *FOOD Style 21*, **25**, 39-41.

[3-2]学会発表

小柴琢己 : 「ノンコーディング RNA によるミトコンドリア動態・代謝の調節」第20回ミトコンドリア学会年会 (学習院大学、2021年12月)

小柴琢己 : 「質量分析法によるミトコンドリアタンパク質複合体の解析」第59回日本生物物理学会年会 (Web開催、2021年11月)

[3-3]成果資料等
特になし。

【4】今後の課題等
特になし。