

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) これまでに、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）への遺伝子入れ戻しにより、その安定発現株（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) についても樹立出来た。

ii) 上記の安定発現株を用いて、OMA1 に隣接するミトコンドリア内分子群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）を添加し、OMA1 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促し、その後に細胞分画よりミトコンドリア画分を抽出し、それら抽出産物から抗 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。

iv) 上記手法により同定された OMA1 結合候補分子群からその基質候補の探索を試みた。その実験手法としては、野生型 OMA1 遺伝子の入れ戻し細胞株と欠損細胞株 (KO) 間でのペプチド断片量の比較を行い、試料のトリプシン消化後に片側の切断部位がトリプシン消化のルールに従わない検索法 (Tryp-N) を利用し、OMA1 による切断部位の探索を進めた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本研究を行った結果、OMA1 の有力な相互作用分子を複数発見することが出来た（論文準備中）。本研究による実験系の検証としては、これまでに報告されている OMA1 基質の一つである OPA1 が 複数回の再現実験で毎回検出されていたことから目的とするシステムの立ち上げには成功したと考えている。また、本方法により OMA1 の基質候補として、ミトコンドリアの形態調節に関わる膜タンパク質群や、ミ

トコンドリアタンパク質の輸送に関わる複合体の一部も検出されていた。以上の実験は、IP-MS 法によるプロテオーム解析として小迫教授との共同研究として行い、生細胞内における OMA1 の有力な相互作用分子を探索することに成功したと言える。さらに、これらの候補因子の一部では、OMA1 による切断も再現させており（未発表）、今後はこれら切断における生理的な意義を解析したいと考えている。

【4】今後の課題等
特になし。

[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もその手法が決定的な貢献を果たしている（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

安川開、小柴琢己 (2023) 炎症制御におけるミトコンドリアの新規機能の解明. *実験医学*, 印刷中.

平田聖里菜、小柴琢己 (2022) 自然免疫応答におけるミトコンドリアの役割. *医学のあゆみ*, **281**, 1157-1161.

[3-2]学会発表

小柴琢己:「Mitochondria and parasite interactions」
第 45 回 日本分子生物学会年会（年会長；深川竜郎 教授、幕張メッセ、2022 年 12 月）

[3-3]成果資料等
特になし。