

研究題目 ミトコンドリア DNA のシェルター構造を形成するタンパク質の同定

研究組織

研究代表者：柳谷耕太（大阪大学大学院生命機能研究科）

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：吉川治孝（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

ミトコンドリアは独自の DNA（mtDNA）を持っており、呼吸鎖複合体の一部のサブユニットをコードしている。我々は、ミトコンドリアが劇的に減少する条件では、mtDNA を豊富に含んだ巨大な球状のミトコンドリア（Mito-L）が生じ、mtDNA を保護することを見出している。本共同利用では、Mito-L の構成タンパク質を同定し、Mito-L 形成を引き起こすタンパク質を見出す。

[1-2] 研究の方法・経過

HeLa 細胞などの哺乳動物細胞を低酸素状態にすると、転写因子 HIF1 を介した低酸素応答が引き起こされる。低酸素応答下では、ミトコンドリアのオートファジーによる消化（ミトファジー）が引き起こされ、ミトコンドリアが大規模に減少する。我々はその際に、mtDNA を詰め込んだ大きな球状のミトコンドリア（Mito-L）と mtDNA をほとんど含まない小さな球状のミトコンドリア（Mito-S）が現れることを見出している。Mito-L の形成を阻害すると、低酸素応答下の mtDNA の減少が顕著に引き起こされることから、Mito-L は mtDNA を保護するシェルターのような構造体なのではないかと、我々は考えている。興味深いことに、Mito-S の形成を阻害した場合、Mito-L の形成も抑制される。これは、Mito-S の形成を通じて、Mito-L が合成されることを示唆している。本共同利用では、Mito-L と Mito-S に含まれるタンパク質を質量分析法で網羅的に同定することで、Mito-L 形成を引き起こす候補因子をあぶり出すことを目的とした。

Mito-L と Mito-S は密度勾配超遠心分離法によって、通常のミトコンドリアと分離できる。

そこで、HIF1 を活性化させた HeLa 細胞のミトコンドリアを、この方法で分画し、それぞれの画分に含まれる構成タンパク質をラベルフリープロテオミクスで大規模に調べた。

最初の挑戦では、post nuclear homogenate (PNH) を超遠心分離に供し、各画分を等量ずつプロテオミクスに供したが、Mito-S が分画される軽い画分のタンパク質量が多すぎて、解析の定量性に問題が生じているようであった。そこで、Mito-S 画分をさらに膜浮揚法で分画したところ、Mito-S を夾雑タンパク質と分離することができた。そこで、Mito-L、Mito-S、通常のミトコンドリアの三種類の画分を準備し、プロテオミクスで解析した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

上記の解析の結果、Mito-S 画分には、低酸素応答依存的に、ミトコンドリアタンパク質やオートファジー関連因子が濃縮されることを確認できた（図 1）。免疫蛍光抗体染色法による顕微鏡での観察では、Mito-S はミトコンドリアがオートファゴソームに覆われたミトファゴソームであることが明らかになっている。今回のプロテオミクスでは、この顕微鏡での観察結果を支持する結果が得られた。

Mito-L、Mito-S、通常のミトコンドリアのタンパク質組成に顕著な違いが検出されるのかを、得られたデータから検証したところ、Mito-S にミトコンドリアの特定の機能に関するタンパク質群が濃縮されることが示唆された。この傾向は免疫蛍光抗体法でも確認されている（図 2）。

一方、Mito-L に劇的に集積するミトコンドリアタンパク質は、数は少ないながら、候補が見出されている。現在は、これらのタンパク質が、実際に低酸素応答が活性化する条件下で Mito-

L に集積するかどうかを検証しているところである。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究によって、Mito-L と Mito-S の分子レベルでの素性が明らかになってきている。意外性のあった点としては、ミトファゴソーム (Mito-S) に取り込まれるミトコンドリアタンパク質群には、何らかの選択性がありそうなどところである。今回の共同研究では、低酸素応答を活性化させた状況下で生じるミトファゴソームについての研究であったが、他の状況下でのミトファゴソームや、オートファゴソームに取り込まれるタンパク質群の選択性についても、同様の方法で調べられるかもしれない。

Mito-L の形成を促進するタンパク質に関しては、現在のところまだ同定には至っていない。しかし、低酸素応答活性化条件で、特異的に Mito-L に集積するタンパク質が、候補として挙がってきている。この候補を解析することで、ミトコンドリア DNA のシェルター構造 (Mito-L) が形成される仕組みや意義を検証できるようになる可能性がある。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

現在、準備中

[3-2] 学会発表

現在、準備中

[3-3] 成果資料等

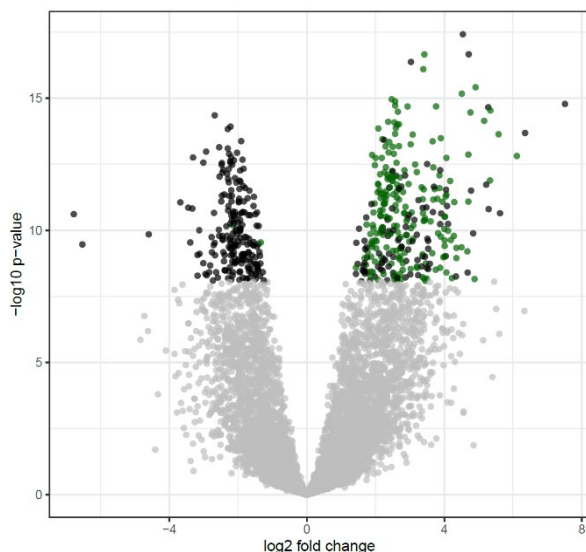


図 1. 低酸素応答活性化前後の Mito-S プロテオミクスの Volcano plot 低酸素応答活性化前後で、存在量が増加したタンパク質のほとんどが、ミトコンドリアタンパク質 (緑色) であった。

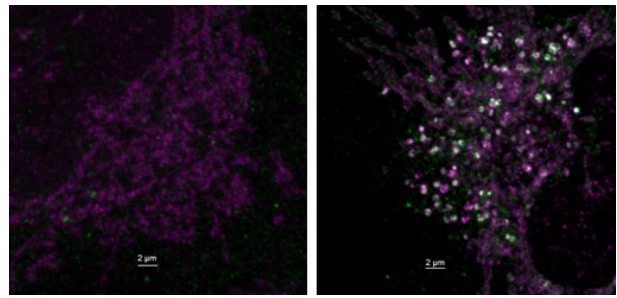


図 2. 低酸素応答活性化前後の免疫蛍光抗体法 低酸素応答活性化条件下で、Mito-S 画分に濃縮されることがプロテオミクスで判明したタンパク質 X (紫) を免疫蛍光抗体法で、検証した。通常条件の HeLa 細胞 (左図) では、タンパク質 X は、ミトコンドリアパターンで分布するが、低酸素刺激下 (右図) では、その条件で出現する Mito-S マーカーである BNIP3 (緑) と分布が重なるようになる。

【4】今後の課題等

現在行っている解析では、Mito-S のタンパク質量が非常に低いので、定量的な解析に若干、問題がある。サンプルの量を増やす、または、調製方法を改善することで、より、定量的な議論ができるようになるはずである。

今回解析したミトコンドリアタンパク質の中で、膜貫通タンパク質が同定されにくい傾向があった。特に、免疫蛍光抗体法でミトコンドリアマーカーとして使用している TOMM20 が同定されなかった点は、免疫蛍光抗体法とプロテオミクスのデータを比較するためにも克服する必要がある。プロテオミクスで使用するタンパク質分解酵素や、ペプチド濃縮の方法など、吉川治孝博士と相談しながら、改善点を見つけて、この問題を解決したい。

Mito-L の構成因子を同定する方法として、近接依存性ビオチン化修飾法を試みても良いかもしれない。免疫蛍光抗体法やライブイメージングで、Mito-L のマーカーをすでに見出しているので、そのマーカータンパク質に近接依存性ビオチン化酵素を融合したタンパク質を利用することで、Mito-L 構成因子群が同定できる可能性がある。