

研究題目 ミトコンドリア・プロテアーゼの基質探索

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）

【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細胞小器官である（以下、ミトコンドリア・ダイナミクス）。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、Yme1L）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き、その先の生理機能の解明を目指す。

[1-2] 研究の方法・経過

本研究では、OMA1 や Yme1L 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により行った。

i) 現在までに、OMA1 遺伝子 (Myc タグ付加) を OMA1 欠損細胞株に入れ戻した安定発現株（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。一方では、Yme1 遺伝子 (HA タグ付加) の Yme1 欠損細胞株への入れ戻し株の作製も完了した。

ii) 今年度は、上記 OMA1 入れ戻し株を用いて、隣接するミトコンドリア分子をプロテオーム

解析により探索した。その手法としては、培養細胞の培地中に低濃度ホルマリンを添加し、生細胞内で架橋反応を促し、その後に細胞抽出液より免疫沈降産物を回収した。

iii) 上記試料を酵素消化により、ペプチド断片化しその後に質量分析装置（Q Exactive Plus 及び Orbitrap Fusion）に提供し、相互作用因子の探索を進めた。

iv) 上記手法により同定された候補分子をミトコンドリアデータベースと重ね合わせ、ミトコンドリア内の局在箇所と一致する分子を明らかにした。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

本研究により、OMA1 との有力な相互作用分子を複数発見することが出来たため、現在その成果を報告するための原著論文を作成中である。本研究では、過去に報告されている OMA1 基質の一つ OPA1 が再現実験で検出されたことも確認できた。そのために、私たちが構築した入れ戻し株を利用したシステムは成功したと考えている。また、OPA1 以外の基質候補として、ミトコンドリア・ダイナミクスに関わるタンパク質やその他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。以上のことから、本研究によるプロテオーム解析として小迫教授との共同研究は大いに成功したと言える。今後は、Yme1L についても同様の手法を用いて研究を進めていきたい。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

小迫教授らは、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、ミトコンドリアの品質管理（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

Ban, T., Kuroda, K., Nishigori, M., Yamashita, K., Ohta, K., and **Koshiba, T.** (2025) Prohibitin 1 tethers lipid membranes and regulates OPA1-mediated membrane fusion. *J. Biol. Chem.*, 301, 108076.

Nakai, A., Fukushima, Y., Yamamoto, A., Amatsu, Y., Chen, X., Nishigori, M., Yoshioka, Y., Kaneko, M., **Koshiba, T.**, and Watanabe, T. (2024) Increased ROS levels in mitochondrial outer membrane protein Muf1-deficient oocytes result in abnormal preimplantation embryogenesis. *FEBS Lett.*, 598, 1740-1752.

[3-2]学会発表

Koshiba, T. : 「Structural basis of mitochondrial scaffolds by prohibitin complexes」 *International Workshop on Mitochondrial Sciences – Osaka Mito2024 Autumn* (主催; 大阪大学、2024年11月)

小柴琢己 : 「微生物感染に備える宿主ミトコンドリアの役割」 第 45 回 日本薬学会九州山口支部コロキウム(主催; 日本薬学会九州山口支部、2024年10月)

[3-3]成果資料等

特になし。

【4】今後の課題等

特になし。