

タンパク質分解系の協調によるミトコンドリア品質管理と 静止期細胞の寿命維持

沖縄科学技術大学院大学 G0 細胞ユニット
武田 鋼二郎

1. はじめに

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー生産の主要な場であるのみならず、鉄代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝などの必須機能を担う重要なオルガネラである。また、エネルギー生産を担う酸化リン酸化の不可避の副産物として、細胞機能に障害を与える酸化ストレスが生成される。それゆえミトコンドリア機能の破綻は細胞生存維持にとって深刻な結果を招くため、ミトコンドリア機能維持機構を理解する事は生物学的にも医学的に重要な課題である。事実、ミトコンドリア機能の不全や破綻が直接の原因となる深刻な疾患としていわゆる‘ミトコンドリア病’が挙げられるし、酸化ストレスが老化の一原因であるとの説も広く受け入れられている。ミトコンドリア機能破綻が何らかの形で関わる疾患としては、パーキンソン病を始めとする神経変性疾患や糖尿病、発がんや腫瘍の悪性化などが報告されており、研究が進展している。特に最近では機能破綻したミトコンドリアの選択的オートファジーによる分解(mitophagy、マイトファジー)とミトコンドリアの形態制御やユビキチン系との関わりが相次いで報告され注目を集めている。出芽酵母ではマイトファジーを誘導するミトコンドリアタンパク質 Atg32 が報告され、ヒト培養細胞からはパーキンソン病の原因遺伝子産物であるユビキチン E3 リガーゼ Parkin やタンパク質キナーゼ PINK1 のマイトファジーへの関わりが報告されている。プロテアソームによるミトコンドリア融合因子の分解機構、ミトコンドリアタンパク質のプロテアソーム系による品質保障機構の存在が提唱されるなど、細胞内タンパク質分解経路(ユビキチン/プロテアソーム経路、オートファジー経路)とミトコンドリアとの間の精妙なクロストークによってミトコンドリアの機能維持、ひいては細胞機能の維持が達成されていると予想されるが、システム全体としての理解は端緒についたばかりである。

本研究の基礎的な知見として、申請者は、分裂酵母をモデル生物としてユビキチン/プロテアソーム経路とオートファジー経路の協調によるミトコンドリアの機能維持が分裂停止した静止期細胞の生存維持に必須である事を報告している(1)。分裂酵母の静止期ではプロテアソーム系はなんらかの形でミトコンドリアの機能を正常に維持する為に重要であり、プロテアソームの失活はミトコンドリアへの酸化ストレスの蓄積をもたらした。一方、このようなダメージを受けたミトコンドリアの処理にはオートファジー系が重要であるらしい(mitophagy)。これらは致死的な酸化ストレスの蓄積を防止する静止期細胞の防御手段であると考えられる。以上の結果を発展・深化させるべく、本研究では以下の二点を目標とする

- #1 ユビキチン/プロテアソーム系とミトコンドリアの関わり の 解明、特に関連する E3 リガーゼの同定
- #2 オートファジー系とミトコンドリアの関わり の 解明、特にミトコンドリアを認識する機構

分裂酵母では、先行するヒトや出芽酵母で報告された mitophagy 誘導因子、Parkin, PINK や Atg32 の明確なホモログは存在しない。また、ヒトには Atg32 はなく、同様にヒト酵母には Parkin, PINK は存在しない。すなわち現状においては、出芽酵母からヒトまで保存された mitophagy の共通機構は不明である。分裂酵母はより動物との相同性が高いとされるため出芽酵母と相互補完的なモデル生物と言える。分裂酵母での研究を推進する事でミトコンドリアの機能維持機構、mitophagy の共通分子機構の理解に貢献する事が本研究の目標である。

2. 方法

2-1. 分裂酵母で高温感受性変異を用いずに簡便にプロテアソームを阻害する方法の確立
これまで用いて来たプロテアソームの高温感受性変異株 *mts3-1* は不稔性(sterile)であるため二重変異株を作成する事が困難であった。本研究においては、E3 リガーゼの遺伝子破壊株やその他のユ

ビキチン経路因子の遺伝子破壊株において、静止期におけるプロテアソーム阻害のミトコンドリアに与える影響を網羅的に調べる必要がある。その観点からは、二重変異株を作るのが難しい *mts3-1* 変異を用いる事は困難である。よって、まず効率的にスクリーニングを行う為に、分裂酵母で効果があるプロテアソーム阻害剤の使用を検討した。

2-2. 静止期ミトコンドリア動態に以上をもたらす E3 リガーゼ変異体の同定

現在、プロテアソーム機能が静止期のミトコンドリア維持に必要である事は判明しているが、その関係が直接的であるのかどうかは明らかではない。換言すれば、ミトコンドリア上の何らかのタンパク質を分解する事が大事であるのか、そうではないのか。あるいはプロテアソームの失活による細胞内環境の変化が、二次的にミトコンドリアに影響を与えている事も否定は出来ていない。この問題に答える為にはプロテアソームよりもより狭い役割を担う E3 リガーゼやその他の因子の中で静止期ミトコンドリアに関与する因子を同定し、それを研究する事が重要であろう。そのような因子の同定の為にとった戦略は以下に述べる。

分裂酵母でも、最近、Bioneer 社（韓国）から ORF を網羅的にノックアウトした遺伝子破壊株のセットが販売されており利用が可能である。この遺伝子破壊株セットからデータベース上 E3 リガーゼあるいはユビキチン経路因子と考えられるものをピックアップし、それらの静止期細胞でプロテアソームを阻害してミトコンドリアへの影響、生存率の変化、を観察し、以上を示すものを選択する。、呼吸鎖複合体 II のサブユニット Sdh2 に GFP を融合することで、ミトコンドリアの可視化、定量を行う。

3. 結果

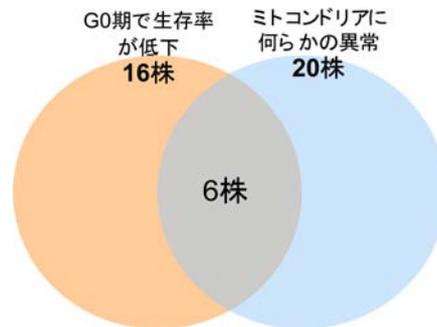
3-1. 簡便なプロテアソーム阻害方法の確立

これまで用いて来たプロテアソーム高温感受性変異株 *mts3-1* が不稔であり、網羅的に他の変異と組み合わせる事が難しいので、分裂酵母でも有効なプロテアソーム阻害剤を探索した。その結果、多発性骨髄腫の治療に用いられている Bortezomib（ベルケイド）が顕著な効果を持つ事が判明した。分裂酵母培養液に 250-1000 μ M の Bortezomib を添加する事で、増殖期においてはユビキチン化されたサイクリンの蓄積を伴う M 期停止、静止期においては mitophagy の亢進が観察される。これらはいずれも、*mts3-1* 変異で誘導される表現型と同様であった。以上から、分裂酵母においては *mts3-1* 変異の代替として Bortezomib を用いてプロテアソームを阻害できると結論し、以後の実験では Bortezomib を用いて網羅的なスクリーニングを行った。

さらに、プロテアソーム阻害に対して超感受性となる遺伝子破壊株を網羅的に探索した。2815 の遺伝子破壊株（全 ORF の 56%）の Bortezomib 感受性をロボットを用いて調べた結果、19 の遺伝子破壊株が、100 μ M の Bortezomib を含む培地上ではコロニーを形成できない超感受性を示した。このうち 13 の遺伝子はヒトまで保存されており、この結果を PLoS ONE 誌に発表した(2)。

3-2. 静止期ミトコンドリア動態に以上をもたらす E3 リガーゼ変異体の同定

分裂酵母の約 5000 個の ORF のうち、E3 リガーゼを E3 リガーゼをコードするものは 121 個がデータベースに登録されている。そのうち、前述の Bioneer 社の遺伝子破壊株セットや我々が独自に構築した高温変異株ライブラリーなどに含まれ利用可能なのは、98 個であり、ミトコンドリアを可視化するための Sdh2-GFP マーカーの導入が終了したものが 78 個である。これらを母集団として以下のスクリーニングを行い、静止期のミトコンドリアの維持に関与する E3 リガーゼの同定を試みた。遺伝子破壊株を静止期に導入し、Bortezomib を添加する群、添加しない群にわけ、それぞれ処理後、1, 3, 12, 28 日後に細胞生存率、ミトコンドリアの形態を経時的に観察した。野生株においては、Bortezomib を添加しない条件では 28 日後まで高い生存率を保った。Bortezomib 添加すると、野生株では 1 日後に顕著な mitophagy 亢進が認められ、3 日後に生存率が 10%程度に低下した。ミトコンドリア維持に関わる E3 リガーゼ遺伝子破壊株で期待される表現型は、例えば、Bortezomib 添加無しで mitophagy の顕著な亢進が認められる、あるいは、Bortezomib 存在下でも mitophagy の亢進が認められない、などが予想されるので、これらに特に注目して顕微鏡による観察を行った。現在までに 70 株の経時観察が終了し、静止期で生存率が低下する 16 株、ミトコンドリアになんらかの示す 20 株が明らかとなった(図 1)。静止期に生存率を低下させ、且つ、ミトコンドリアに異常が認められる 6 株のうち、Bortezomib 添加後も mitophagy の亢進が顕著でない遺伝子破壊株もふくまれ興味深い。



(図1) スクリーニング結果の概要

4. まとめ

本研究の成果として、分裂酵母においても Bortezomib がプロテアソームを有効に阻害することを見出した事が挙げられる。この発見は本研究の主旨からはそれる副産物的な結果だが、これまで分裂酵母においては *in vivo* で有効なプロテアソーム阻害剤を用いた研究はほとんど行われておらず、実験上有用な発見であると考えられる。Bortezomib に対して超感受性を示す変異株の網羅的スクリーニングを行い、19 の遺伝子の破壊が Bortezomib 超感受性を付与することを見出した。このスクリーニングではコロニー形成能を指標にしたが、Bortezomib に対する超感受性のスクリーニングを静止期で効率的に行う事ができれば、これまでの経緯から、静止期ミトコンドリア機能維持に関わる因子が多数取得される事が期待されるので、今後、方法の開発を推進したい。

静止期に、プロテアソーム阻害の有無双方の条件で、生存率やミトコンドリアに異常を示す E3 リガーゼ遺伝子破壊株のスクリーニングを行い、図1で示すように、静止期で生存率を低下させる 16 株、ミトコンドリアに異常が認められる 20 株が取得された。これまでのところ、Bortezomib の非存在下で mitophagy が亢進するような遺伝子破壊株、すなわちプロテアソーム阻害と同様の表現型を呈する E3 変異株、は取得されなかったが、逆にプロテアソーム阻害条件で mitophagy が亢進しない遺伝子破壊株は取得されている。現時点で、スクリーニングが完全に終了している訳ではないので残りの E3 リガーゼ変異株の観察を終了させる事と、すでに取得されている興味深い表現型を示す変異株の解析を今後推進したい。

今回の研究期間では、「オートファジー系とミトコンドリアの関わり、特にミトコンドリアを認識する機構」に関しては解析を進める事ができなかった。E3 リガーゼで行ったような戦略を 2815 株の遺伝子破壊株セットで実行する事で mitophagy に異常を持つ遺伝子破壊株を取得できると考えられる。効率的なスクリーニング方法を今後検討したい。

5. 発表論文・参考論文

(1) **Takeda, K.**, Yoshida, T., Kikuchi, S., Nagao, K., Kokubu, A., Pluskal, T., Villar-Briones, A., Nakamura, T., and Yanagida, M. (2010). Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107, 3540-3545.

(2) ***Takeda, K.**, Mori, A., and Yanagida, M. (2011) Identification of genes affecting the toxicity of anti-cancer drug Bortezomib by genome-wide screening in *S.pombe*. **PLoS One** 6(7), e22021

(*: corresponding author)