

論文の内容の要旨

論文題目 プロテアソームとミトコンドリアの遺伝学的相互作用の解析

氏名 白水 亮平

【序論】

26S プロテアソームは真核生物に広く保存されるプロテアーゼ複合体であり、ユビキチン付加されたタンパク質を選択的に分解する。この選択的基質分解は不要タンパク質を除去しタンパク質の品質管理に寄与するばかりではなく、細胞周期や転写、ストレス応答、免疫等多様な生命反応を制御していることが知られている。しかし、それらの制御機構には未解明の部分も多く、またプロテアソームによる新たな制御経路の報告も日々増加している。私は修士課程において、出芽酵母を用いた遺伝学的手法によりプロテアソームによる未知の制御機構を探索したところ、ミトコンドリア機能に關与する複数の遺伝子がプロテアソーム機能低下と遺伝学的相互作用を示すことを見いだした。この遺伝学的相互作用を解析することで、ミトコンドリア機能制御においてプロテアソームがどのような役割を果たしているか解明することを目的として実験を行った。

【方法・結果】

1. Mitofusin 欠損酵母 (*fzo1Δ*) はプロテアソーム機能低下によって生育が回復する

Mitofusin/Fzo1 はミトコンドリア外膜に局在し、ミトコンドリア融合において機能する GTPase であることが知られており、欠損株 (*fzo1Δ*) は野生型株と比較して著しい生育抑制を示す (図 0-1 左)。しかし、26S プロテアソームのサブユニットである $\alpha 3$ および Sem1、プロテアソーム遺伝子群の転写因子として知られる Rpn4 を欠損することにより *fzo1Δ* 株の生育が回復する様子が観察された (図 1 左)。これらの変異株においては実際にプロテアソーム機能が低下していたこと、及び *fzo1Δ* 株はプロテアソーム阻害剤である MG132 で処理することによっても生育が回復したことから (図 1 右)、*fzo1Δ* 株はプロテアソーム機能が低下することで生

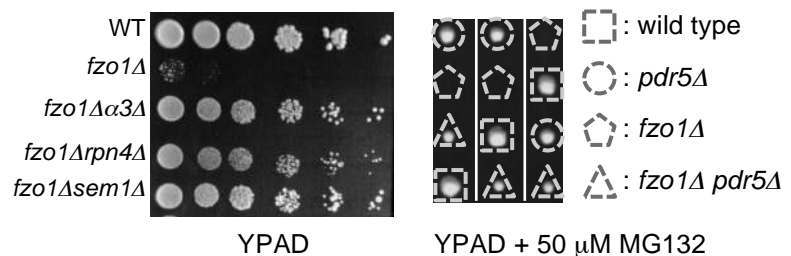


図 1: *fzo1Δ* 株の生育はプロテアソーム機能を低下する変異 ($\alpha 3\Delta$, *rpn4Δ*, *sem1Δ*) やプロテアソーム阻害剤 MG132 により回復する。MG132 感受性を高めるために ABC トランスポーター Pdr5 を欠損させている。

育が回復することが示唆された。

2. プロテアソーム機能低下は Fzo1 非依存的にミトコンドリア融合を促進する

ミトコンドリアは酸化的リン酸化を行うことから、酸化ストレスによる傷害を受けやすいオルガネラであることが知られている。傷害されたミトコンドリアは健康なミトコンドリアと融合したり、逆に傷害部位のみを切り離したりすることによってその機能を維持している。Fzo1 を欠損する細胞はミトコンドリア融合が阻害されているが、その生育はプロテアソーム機能低下により回復することから、プロテアソーム機能の低下がミトコンドリアの融合活性にどのような影響を与えるか検証した。出芽酵母におけるミトコンドリア融合活性は、異なる接合型を持つ酵母のミトコンドリアを蛍光タンパク質 GFP および mCherry でそれぞれ標識し、それらを接合させた後に蛍光の共局在を観察することで見積もることができる。すると、プロテアソーム機能が低下することで Fzo1 を欠損する細胞においてもミトコンドリア融合が促進している様子が観察された (図2)。この Fzo1 非依存的ミトコンドリア融合の分子機構を解析したところ、

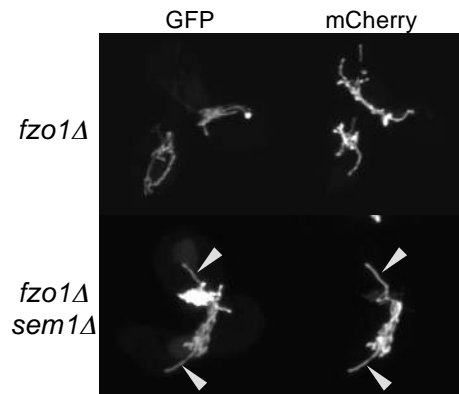


図 2: Sem1 の欠損により GFP と mCherry が共局在している (矢頭)。

プロテアソーム機能の低下がミトコンドリアの融合活性にどのような影響を与えるか検証した。出芽酵母におけるミトコンドリア融合活性は、異なる接合型を持つ酵母のミトコンドリアを蛍光タンパク質 GFP および mCherry でそれぞれ標識し、それらを接合させた後に蛍光の共局在を観察することで見積もることができる。すると、プロテアソーム機能が低下することで Fzo1 を欠損する細胞においてもミトコンドリア融合が促進している様子が観察された (図2)。この Fzo1 非依存的ミトコンドリア融合の分子機構を解析したところ、プロテアソーム機能が低下すると、ミトコンドリア膜間領域に局在し、ミトコンドリア内膜の融合に関わることが知られる Mgm1 の short isoform (s-Mgm1) が選択的に増加していた (図3)。また s-Mgm1 の過剰発現によっても Fzo1 非依存的ミトコンドリア融合が観察されたことから (図4)、s-Mgm1 の増加が Fzo1 欠損条件下でのミトコンドリア融合に重要であることが確認された。

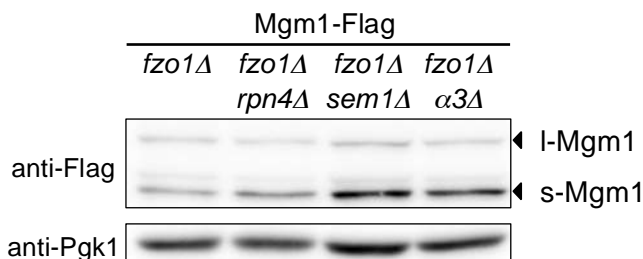


図 3: プロテアソーム機能低下により s-Mgm1 が増加する。Pgk1 はローディングコントロールとして用いた。

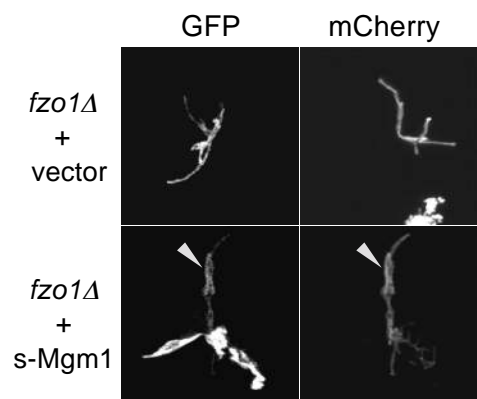


図 4: s-Mgm1 の発現により GFP と mCherry が共局在している (矢頭)。

3. プロテアソーム機能低下は Mia40 を増加させ、ミトコンドリア膜電位を上昇させる

s-Mgm1 は Fzo1 非依存的ミトコンドリア融合を促進したことから、*fzo1Δ* 株の生育も

回復するかどうか検証したところ、s-Mgm1 の発現では *fzo1Δ* 株の生育は回復しなかった (図 5 左)。そこで、プロ

テアソーム機能低下が *fzo1Δ* 株の生育を回復する機構を探るため、出芽

酵母ゲノムライブラリを用いて、過剰発現により *fzo1Δ* 株の生育を回復させる遺伝子を探索したところ、ミトコンドリア内膜に局在する酸化還元酵素である Mia40 の過剰発現によって *fzo1Δ* 株の生育が回復することが明らかとなった (図 5 右)。実際にプロテアソーム機能が低下することで Mia40 のタンパク質量が増加していたこと

から (図 6)、プロテアソーム機能低下は Mia40 の増加を介して *fzo1Δ* 株の生育を回復しているものと考えられる。また、Mia40 の増加がミトコンドリア機能にどのような影響を与えるか検証したところ、

Fzo1 欠損でミトコンドリア膜電

位 ($\Delta\Psi_m$) が低下していたが、プロテアソーム機能低下や Mia40 発現により膜電位が上昇していることが明らかとなった (図 7)。一方で Mia40 過剰発現ではミトコンドリア融合は促進されておらず (図 8)、*fzo1Δ* 株の生育とミトコンドリア融合活性には相関が低いことが確かめられた。これらのことから、プロテアソーム機能低下時に *fzo1Δ* 株の生育が回復する過程においては、ミトコンドリア膜電位が上昇することが重要であることが示唆された。

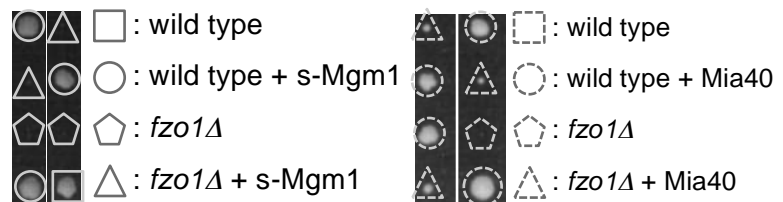


図 5: *fzo1Δ* 株の生育は s-Mgm1 の発現では回復しないが Mia40 の発現により回復する。

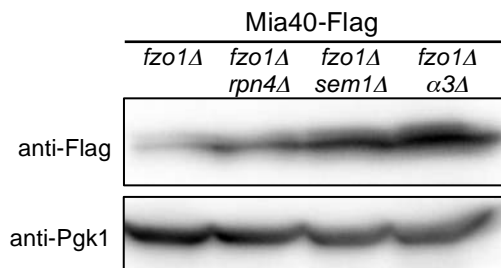


図 6: プロテアソーム機能低下により Mia40 が増加する。

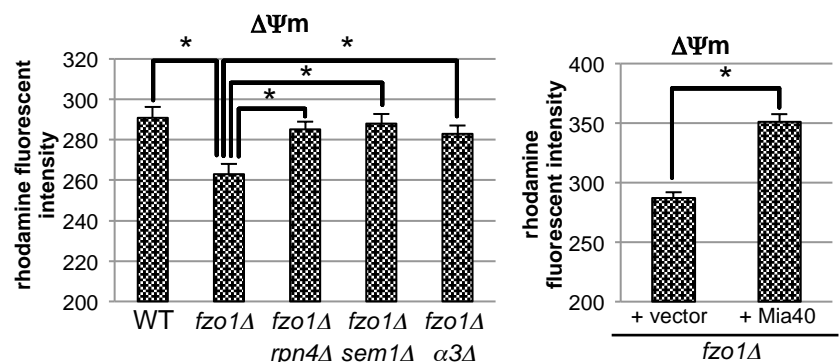


図 7: プロテアソーム機能低下 (左) 及び Mia40 過剰発現 (右) によりミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) が上昇する。*: $p < 0.01$

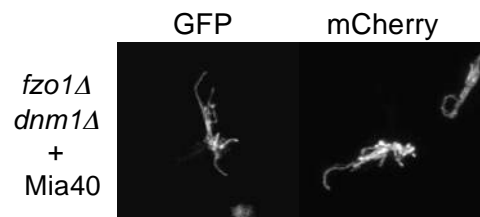


図 8: Mia40 過剰発現では Fzo1 非依存的ミトコンドリア融合は促進されない。

【総括】

本研究によりプロテアソーム機能が低下することで、Fzo1 非依存的ミトコンドリア融合が促進したりミトコンドリア膜電位が上昇したりするという、独立な二つのプロテアソームによるミトコンドリアの新奇制御機構が明らかになった。特に Fzo1 はミトコンドリア融合に必須であると考えられていたことから、Fzo1 非依存的な融合経路の発見の意義は大きい。しかし、*fzo1Δ*株の生育はミトコンドリア膜電位と相関しており、s-Mgm1 を発現させて Fzo1 非依存的ミトコンドリア融合を誘導しても生育の回復が見られなかった。逆に Mia40 を発現させて *fzo1Δ*株の生育を回復させた条件においても Fzo1 非依存的ミトコンドリア融合は観察されなかった。これらのことは、ミトコンドリアの動態と膜電位はそれぞれ異なる機構によって制御されていることを示唆するものであり、またそれらがともにプロテアソームによって制御されうるということは、ミトコンドリア機能の制御機構について新たな知見であると考ええる。