

PRESS RELEASE (2018/11/07)

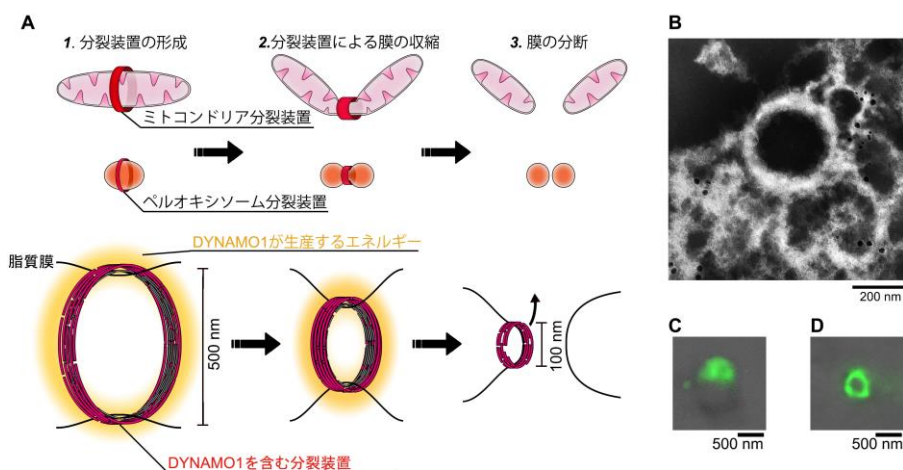
世界初、ミトコンドリアとペルオキシソーム分裂増殖の根幹を成す新規因子を発見
-真核生命の基本原理の解明に期待-

九州大学生体防御医学研究所の藤木幸夫特任教授と、井元祐太日本学術振興会特別研究員(現 Johns Hopkins University)、本学理学研究院奥本寛治助教、日本女子大学黒岩常祥客員教授(東京大学名誉教授)らは、ミトコンドリアとペルオキシソームの増殖を制御する新たなタンパク質の同定に世界で初めて成功しました。この成果はミトコンドリアとペルオキシソームの分裂増殖メカニズムを解き明かし、23億年をかけて作り上げられた我々真核細胞の基本原理を解明することに繋がる発見になります。

地球上は現在から約23億年前に起きた大酸化事変以来、高濃度の酸素で覆われています。この酸素を用いて、ミトコンドリアは我々の生命活動に必須なエネルギー(ATP)を作り出しています。一方で、エネルギー生産の際には活性酸素と呼ばれる猛毒が生じますが、ペルオキシソームがこれを無毒化しています。すなわち、ミトコンドリアとペルオキシソームは、我々ヒトを含む全ての真核生物が地球上で生存するために必須の細胞内小器官(オルガネラ)です。これらのオルガネラは分裂増殖を続け、23億年前から代々受け継がれてきました。現在、ヒトでは細胞当たり数百個ものミトコンドリアとペルオキシソームが含まれており、これらの増殖異常はパーキンソン病や伴性型副腎白質ジストロフィー(X-ALD)等、重篤な神経疾患の原因であることが明らかになっています。そのため分裂の分子機構解明は基礎生物学のみならず、医学などのあらゆる生命科学分野で注目され、重要な課題となっています。

研究チームはこれまで、世界に先駆けてミトコンドリアやペルオキシソームの分裂に重要な分子装置の存在を明らかにしてきました。この装置はリング状構造を形成し、リングの収縮によって膜を分断します(図1)。装置の構成物質や収縮のメカニズムは詳しくは明らかにされていませんでしたが、本研究では、この装置を細胞から取り出し、質量分析や細胞構造生物学的解析を進め、装置を構成する新規分裂タンパク質DYNAMO1を同定することに成功しました。さらに、DYNAMO1は装置の収縮に必要なエネルギーを生み出す重要なタンパク質であることを明らかにしました。自動車や飛行機のエンジンが石油を分解して物理的エネルギーを生み出すのと同様に、オルガネラの分裂においても、DYNAMO1が作り出したエネルギーを使って分裂装置が動作しているものと考えられます。

DYNAMO1と同様のタンパク質は、ヒトでは脳や生殖器官等の重要な組織でも高度に発現されており、膜分断に関わる根本的なメカニズムの解明のみならず、神経伝達や個体の増殖・生殖等の基本的な生理現象の解明にも発展することが今後期待されます。本研究成果は、2018年11月6日午前5時(米国東部時間; 日本時間6日午後7時)に「Nature Communications」電子版に公開されました。



研究者からひとこと：
DYNAMO1は膜分断、すなわちオルガネラ増殖、神経伝達、細胞運動といった基本現象を解明する上での鍵となるタンパク質です。

図1. (A)オルガネラは分裂によって増殖します。本研究で同定されたDYNAMO1は分裂装置収縮のためのエネルギーを生産します。(B)単離されたペルオキシソーム分裂装置の電子顕微鏡写真。(C)単離されたミトコンドリア分裂装置、(D)ペルオキシソーム分裂装置におけるDYNAMO1(緑)の局在。

＜研究の背景と経緯＞

我々真核細胞生物が高濃度の酸素で覆われた地球上で生存するためには、ミトコンドリアとペルオキシソームの機能が必須です。ミトコンドリアは、細胞内における発電所の役割を担い、酸素と糖を用いて生命活動に必要なエネルギーATPを生産しています。一方で、酸素を用いた代謝では有害な活性酸素が生じますが、ペルオキシソームに含まれるタンパク質カタラーゼが1秒あたりに4千万分子という驚異的な速さでこれらを分解することで、細胞内へのダメージを最小限に抑えています。従って、細胞内に～数百存在するこれらのオルガネラを維持することは、真核細胞にとって必須です。しかしミトコンドリアやペルオキシソームは、細胞内で新規合成されません。それでは細胞分裂の際、どのようにして親から娘細胞へと受け継がれているのでしょうか。1993年に黒岩常祥博士らは、電子顕微鏡観察でミトコンドリアの分裂面に電子密度の高いリング「ミトコンドリア分裂リング(MD ring)」があることを発見しました。その後、MD ringが細い繊維の束を中心とした分裂装置であり、ミトコンドリアはこの装置の収縮によって二つに分断され娘細胞へと分配されることで増殖することが分かりました。同様に、ペルオキシソームについても1985年に藤木幸夫博士らによって分裂によって増殖することが提唱され、2013年には黒岩常祥博士、黒岩晴子博士、井元祐太博士らによって独自の分裂装置「ペルオキシソーム分裂リング(POD ring)」が発見されました。これらの分裂装置は単純な単細胞生物から獲得されており、ミトコンドリアとペルオキシソームは約23億年前に始原真核細胞で確立されて以来、分裂によって増殖し、現在に至るまで受け継がれてきたものと思われます。しかし、これら分裂装置の分子メカニズムは長らく不明瞭でした。MD ringやPOD ringは数百ナノメートル単位の極小の装置であり、細胞内からの単離が難しくその詳細な解析が困難であったためです。

＜研究の内容＞

このような問題を解決するため、研究グループはシゾンに着目してきました(図2)。シゾンは、1細胞あたりにミトコンドリアとペルオキシソームをそれぞれ一つずつしか含みません。さらに光の明暗刺激によって、オルガネラの分裂を高度に同調することが可能です(光同調培養法^{*1})。従って光刺激後、任意の時間に細胞を回収することで、分裂装置を含む細胞を大量に回収することが可能です。

1) 新規分裂因子 DYNAMO1 が単離したペルオキシソーム分裂装置のプロテオームから同定される。

オルガネラ分裂装置の構成分子を特定するために、研究チームはまずPOD ringの解析から進めました。POD ringは非常に高い純度に精製できるからです。光同調培養法により分裂中のペルオキシソームを含む細胞を大量に回収し、細胞破碎により分裂期ペルオキシソームを単離しました。包膜と基質を可溶化して除き、リングの構造を維持したまま装置を単離することに成功しました(図3)。装置の構成物質を同定するために、九州大学生体防御医学研究所プロテオミクスセンターの支援を受け、質量分析^{*2}によるタンパク質解析を行いました。その結果、リングの機能に必要なダイナミン^{*3}を含む、多数のリング構成物質遺伝子群を同定しました。研究チームはこれらの遺伝子群の中に、全ての真核生物に広く保存された重要な遺伝子を見出しDYNAMO1と名付けました。

2) DYNAMO1 は MD ring と POD ring の主要構成物として含まれる。

POD ringの解析から同定されたDYNAMO1ですが、驚くべきことにこの遺伝子から作られるDYNAMO1タンパク質はMD ringとPOD ring両方に含まれていることが分かりました。DYNAMO1はダイナミンタンパク質と同様に、リング構造に沿って均一に局在していることが免疫蛍光顕微鏡法により明らかになりました(図4)。従って、DYNAMO1はMD ringとPOD ringの主要構成物の一つであると考えられます。さらに、免疫電子顕微鏡観察法による微細構造学的解析を単離したPOD ring上で行いました。装置は骨格となる繊維状リングと装置の収縮力を発揮するダイナミンリングから構成されていますが、DYNAMO1はダイナミンリング上に局在することが明らかになりました。また、生化学的解析によってDYNAMO1はダイナミンタンパク質に直接結合していることが分かりました。ダイナミンリングは装置を収縮させるための動力“エンジン”として働く構造ですが、これらの実験結果から、DYNAMO1はこのエンジンに深く関係しているタンパク質であることが推測されました。では、実際にDYNAMO1はどのような機能を持っているのでしょうか？

3) DYNAMO1 が MD ring と POD ring 収縮のためのエネルギーを合成する。

MD ringやPOD ringはこれまでに述べてきたように、細胞内で働く微小な装置、ナノマシンです。我々の身の回りには、自動車や飛行機といった機械が働くためには動力を生み出すエンジンと、燃料である石油が必要です。同じように、MD ringやPOD ringではエンジンとして働くダイナミンリングと、その燃料であるGTPと呼ばれる物質が必須です。興味深いことに、研究チームはDYNAMO1がGTP結合性のアミノ酸配列を持つことを見出しました。この情報を基に、GTP代謝に関する機能をDYNAMO1が持つかどうか、阿部雄一博士(九州大学生体防御医学研究所)の支援を受け、LC-ESI-MS/MS装置^{*4}を用いて調べました。その結果、DYNAMO1は1:1の割合でATPをGTPに変換していることが明らかになりました。また、このGTP合成に必須なアミノ酸残基を別のアミノ酸に置き換えることで、GTP合成を完全に阻害

する変異型 DYNAMO1 を作製することにも成功しました。そこで、この DYNAMO1 遺伝子のドミナントネガティブ変異体^{※5}を導入し、細胞内において DYNAMO1 の機能阻害実験を行いました。その結果、DYNAMO1 ドミナントネガティブ体発現下では、ミトコンドリアとペルオキシソームの分裂が阻害されていることが分かりました(図 5)。従って、MD ring と POD ring 上において DYNAMO1 は装置が収縮するためのエネルギー-GTP を生産、供給するためのタンパク質であるということが明らかになりました。それでは、この DYNAMO1 が生産したエネルギーを使って、分裂装置の構造はどのようにして収縮力を発揮しているのでしょうか？

4) DYNAMO1 から供給されたエネルギーを使って、ダイナミンリング繊維は強力な収縮力を発揮する。

研究チームは微細構造学的な視点から DYNAMO1 が分裂装置へ与える影響を調べるため、精製した DYNAMO1 タンパク質、ダイナミンタンパク質、そして ATP や GTP を使って *in vitro*^{※6} 電子顕微鏡解析を行いました。2) と 3) で行った結果と一致して、DYNAMO1-ダイナミンタンパク質の複合体繊維が観察されました。ATP 等の化学物質を加え、DYNAMO1 に GTP を生産させると、複合体繊維は急激に構造変化を起こし収縮することが分かりました。一方で、変異型 DYNAMO1 を含む複合体では、同様の条件では収縮できませんでしたが、人工的に合成した GTP を加えることで野生型同様に収縮することが出来ました(図 6)。

以上の結果をまとめますと(図 7)、まず DYNAMO1 タンパク質とダイナミンタンパク質はミトコンドリアやペルオキシソームの分裂面の外側で形成される繊維状の骨格に沿ってリング構造を作ります。この DYNAMO1-ダイナミンタンパク質が分裂装置の原動力であり、DYNAMO1 が ATP を基に生み出す GTP をエネルギー源として、ダイナミンが収縮力を発揮し膜をくびり切っていると考えられます。二つに分断されたミトコンドリアやペルオキシソームはそれぞれ娘細胞へと受け継がれていきます。

〈今後の展開と応用〉

DYNAMO1 はシゾンでその機能が明らかになりましたが、同様の遺伝子は始原的な単細胞生物から我々ヒトに至る全ての真核生物に保存されています。DYNAMO1-ダイナミンを基盤とした分裂装置は、かつて独立した生活環を持っていた好気性バクテリア(酸素を頻繁に使い生命活動を行う)の増殖を制御するのに重要であったと考えられます。生物の本質の一つは自己増殖にあります。我々宿主細胞が共生体である好気性バクテリアの増殖を完全に支配し、独立性を失わせることが、細胞内共生システムの確立に重要だったのではないのでしょうか。また、これまでのバイオインフォマティクスの研究や、近年の細胞生物学的解析から、ミトコンドリアが始原ペルオキシソームの起源の一つとして強く示唆されてきましたが、我々が明らかにしたような MD ring と POD ring が全く同じタンパク質を原動力として活用しているという点からも、ペルオキシソームの誕生にはミトコンドリアと深い結びつきがあるものと考えられます。酸素呼吸を行うミトコンドリア、そして活性酸素を分解するペルオキシソームを 23 億年前に獲得し、分裂させ現在の我々へ受け継がせてきたことが、高濃度の酸素にさらされた地球上での真核生物の確立、生存を可能にしたのかもしれない。現在、この分裂異常は我々のからだに神経変性疾患等の重篤な病気(ミトコンドリア病、ペルオキシソーム病)を引き起こすことから、本研究の成果は基礎生物学のみならず、医療や農業など多岐にわたる生命科学分野へ貢献することが期待されます。

原著論文情報

Journal: Nature Communication (2018 年 11 月 6 日電子版)

Authors: Imoto, Y., Abe, Y., Honsho, M., Okumoto, K., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., Fujiki, Y. 井元 祐太(九州大学、現ジョーンズホプキンス大学)、阿部 雄一(九州大学)、本庄 雅則(九州大学)、奥本寛治(九州大学)、大沼 みお(広島商船高等専門学校)、黒岩 晴子(日本女子大学)、黒岩 常祥(日本女子大学)、藤木 幸夫(九州大学)

Title: Onsite GTP fuelling via DYNAMO1 drives division of mitochondria and peroxisomes

【用語解説】

※1 光同調培養法

葉緑体を含むシズンは、光を感知し細胞の分裂周期を同調化します。哺乳動物や陸上植物細胞では、細胞内、細胞ごとにランダムにオルガネラが分裂するため、特定の時期のオルガネラを回収することは出来ませんでした。光同調法により、高度にオルガネラの分裂を同調化し、任意の時間に分裂中のオルガネラを含む細胞を大量に回収することが可能になりました。

※2 質量分析によるタンパク質解析

タンパク質を断片化し、その質量の違いによってタンパク質のアミノ酸配列を特定する手法です。ゲノム情報を参照することで、微細構造のタンパク質やそれらをコードする遺伝子を特定することが出来ます。

※3 ダイナミン

真核生物を代表するモータータンパク質で 1995 年に米国 Sandra Schmit 博士によって、その構造と機能が発見されました。これまでに 20 種類以上の異なる機能を持ったダイナミンタンパク質が特定されており、オルガネラの分裂、細胞分裂、神経伝達やウイルス感染等の重要な現象に関わっています。GTP をエネルギー源とし、リング状、あるいは螺旋状構造を作り、収縮することで脂質膜に圧力を加え切断する機能を持っています。

※4 LC-ESI-ESI-MS/MS 装置

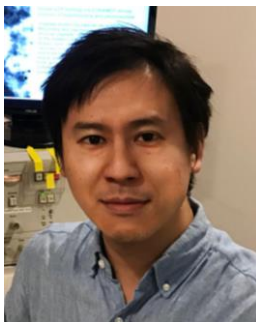
エレクトロスプレーイオン化法 (ESI; Electrospray Ionization) を用いた極性化学物質の種類や量を同定、定量する装置です。これにより、本研究では ATP や GTP の物質量変化を測定し DYNAMO1 の機能を明らかにしました。

※5 ドミナントネガティブ変異体

遺伝子の変異産物(異常な機能、構造をもったタンパク質)が正常なタンパク質に対してドミナント(優位)に働くことで、正常なタンパク質の作用を阻害する現象です。本研究では、人工的に変異型 DYNAMO1 を細胞内に導入し、内在性の DYNAMO1 の機能を阻害しました。この機能阻害で生じる結果を観察することで、DYNAMO1 の機能を特定しました。

※6 *in vitro*

細胞内で起きている現象を、人工的に細胞外で再現し、観察する実験手法です。細胞内では、何百種類ものタンパク質や化学物質、それに加え温度や浸透圧等、非常に複雑な系がお互いに影響を及ぼしているため特定の化学反応の変化を捉えるのは困難です。*in vitro*では任意の物質のみを存在させることが出来るので、狙った現象を観察することが出来ます。本研究では、DYNAMO1 タンパク質、ダイナミンタンパク質、ATP や GTP 等のエネルギー物質を混合させることで、エネルギーに着目してダイナミンリング繊維の構造変化を観察しました。



井元祐太 日本学術振興会特別研究員(現 Johns Hopkins University)



黒岩常祥 日本女子大学客員教授



藤木幸夫 九州大学生体防御医学研究所 特任教授

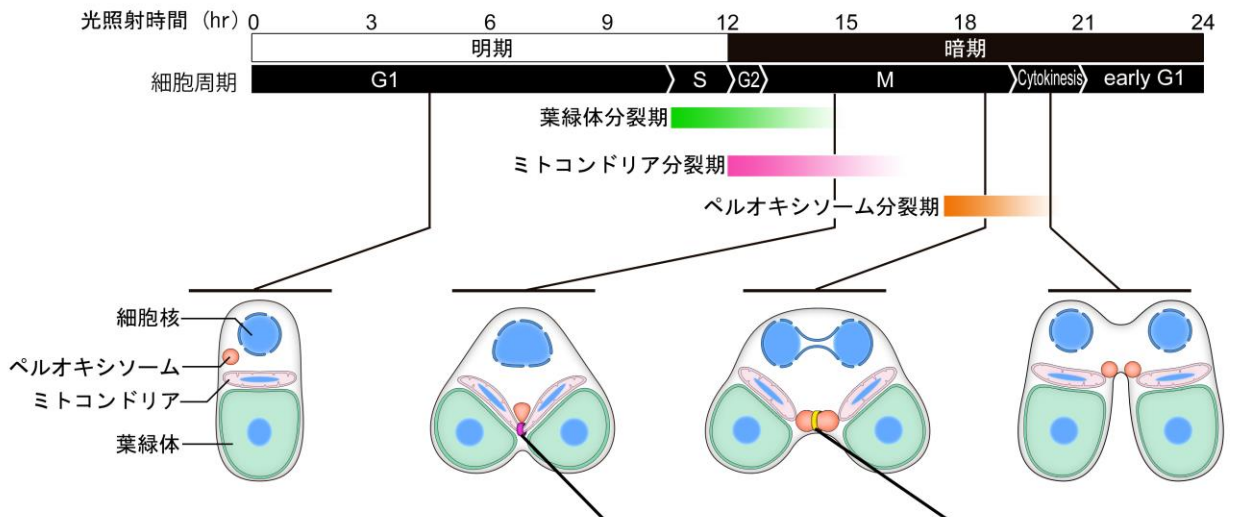
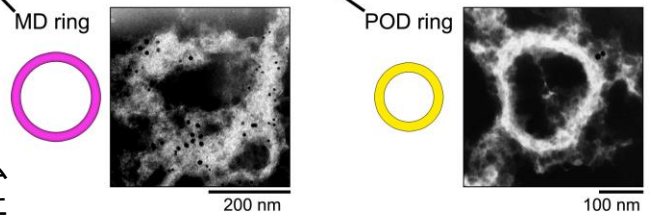
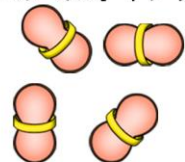


図 2. シズンの細胞構造

単細胞モデル真核生物シズンは、基本的なオルガネラを一つずつしか持ちません。代表的なオルガネラである、細胞核、ミトコンドリア、葉緑体、ペルオキシソームは光の明暗周期をかけることで、細胞ごとに分裂が同調します。分裂は、葉緑体、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、そして細胞核の順に行われたのち、細胞が二つに分裂し娘細胞へ各オルガネラが分配されます。ミトコンドリアの分裂は MD ring が、ペルオキシソームの分裂は POD ring (電子顕微鏡写真) が収縮し膜を分断することで行われます。



細胞から単離した
分裂中のペルオキシソーム



単離した POD ring



タンパク質質量分析
(プロテオミクス)

構成タンパク質の
同定

単離した POD ring の光学顕微鏡写真 (緑蛍光、ダイナミン抗体染色)

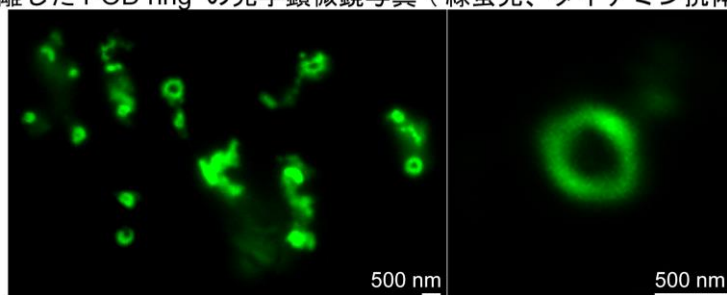


図 3. POD ring の単離

光同調後、ペルオキシソームの分裂期に細胞を回収し、細胞破碎、密度勾配超遠心法等により分裂中のペルオキシソームを大量に単離できます。界面活性剤を加え、脂質膜を可溶化したのち残った画分から POD ring を精製します。精製した POD ring 画分は質量分析器によって解析し、構成タンパク質の同定を行いました。

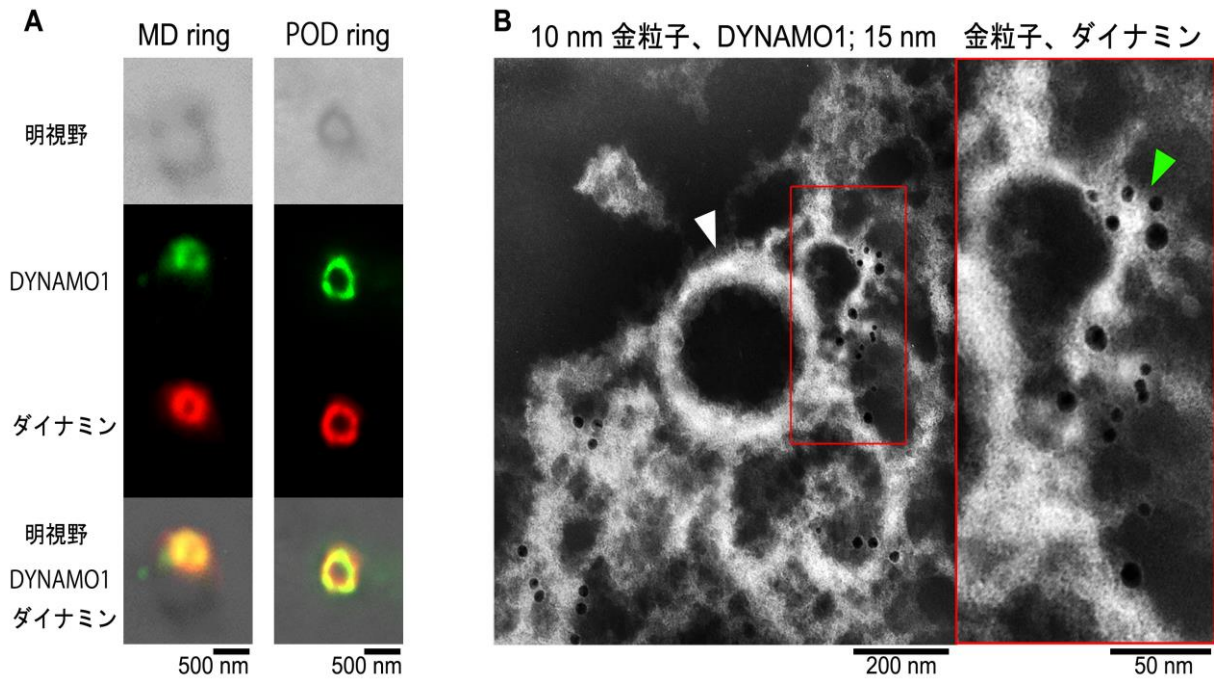


図 4. 単離した MD ring と POD ring 上における DYNAMO1 タンパク質の局在解析

(A) MD ring と POD ring 上において、DYNAMO1 はダイナミンと共局在することが、蛍光顕微鏡観察により明らかになりました。(B) 単離した POD ring を用いた、免疫電子顕微鏡観察によって、DYNAMO1 がダイナミンリング繊維上に局在することが明らかになりました。単離した POD ring は物理化学的性質から、骨格となる繊維状リング(白矢印)とダイナミンリング繊維(緑矢印)に容易に乖離するため、それぞれの構造を明瞭に観察できます。

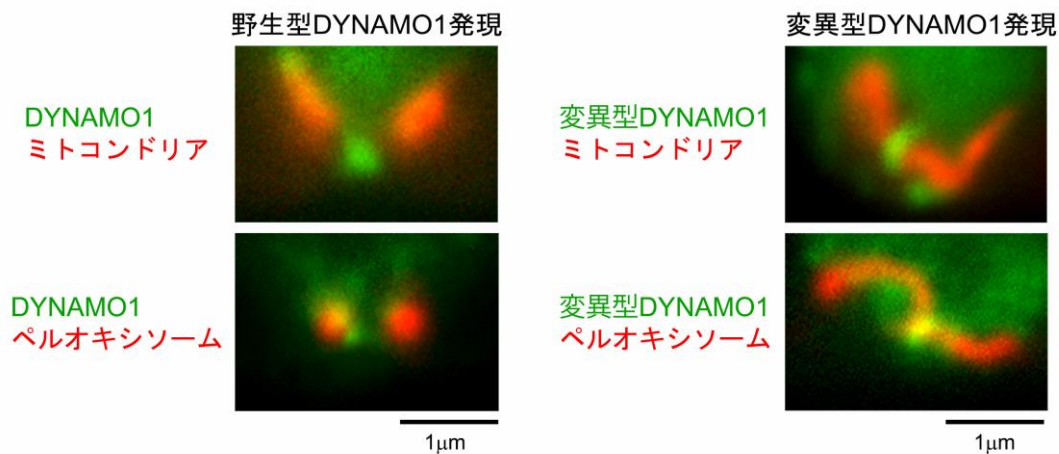


図 5. ドミナントネガティブ変異体導入による DYNAMO1 の機能解析。

正常な野生型 DYNAMO1 を細胞内に導入した場合、ミトコンドリアやペルオキシソームは正常に分裂しますが、変異型 DYNAMO1 を導入した細胞では分裂が出来ないことが分かりました。

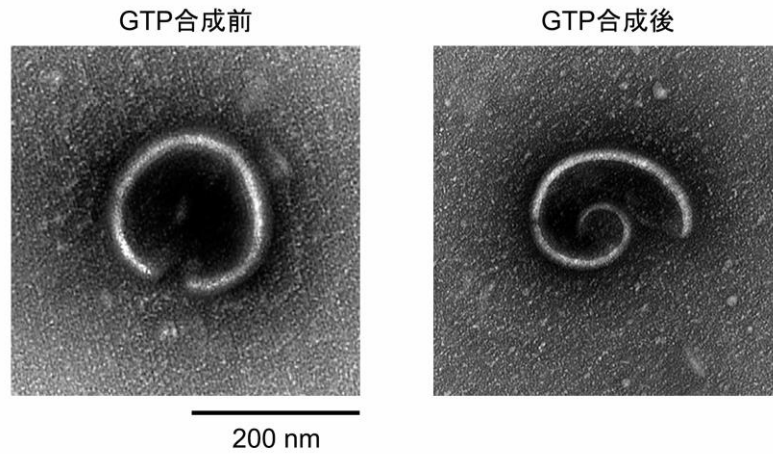


図 6. DYNAMO1 からの GTP 供給による DYNAMO1-ダイナミン複合繊維の収縮

MD ring や POD ring を構成する DYNAMO1-ダイナミン複合繊維は、DYNAMO1 による GTP 合成によって著しく収縮します。この収縮力が、オルガネラ分裂の駆動力であると考えられます。

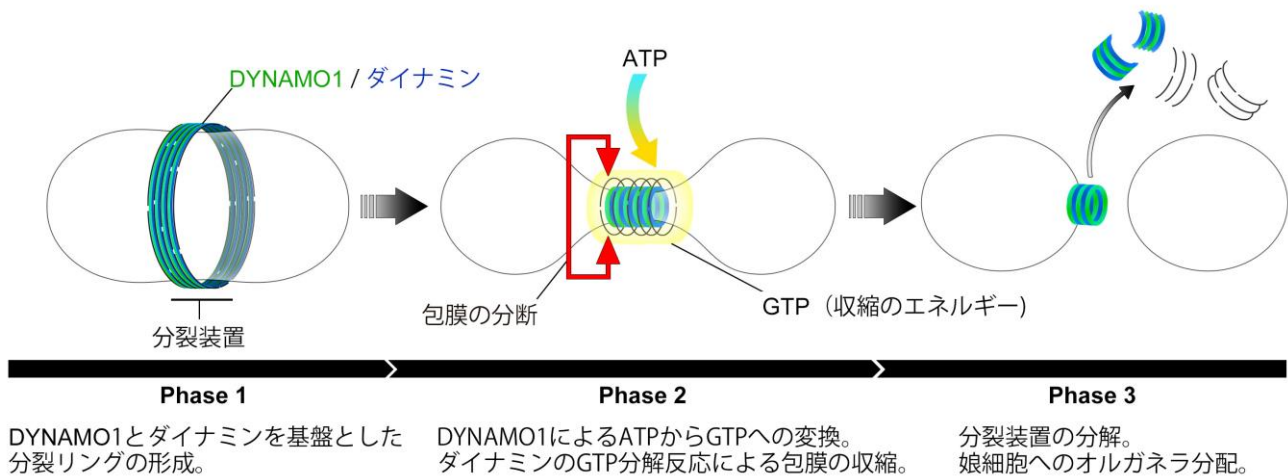


図 7. MD ring と POD ring 収縮における DYNAMO1 作用機構のモデル図

<謝辞>

本件は文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金（14J04556、JWU2014-1018、JP16H04813、JP24247038、JP25112518、JP25116717、JP26116007、JP15K14511、JP15K21743）、武田科学振興財団等の支援を受けて行われました。

<問い合わせ先>

【研究に関するお問い合わせ】

九州大学生体防御医学研究所 特任教授 藤木幸夫
電話：092-642-4232 FAX：092-642-4233 E-mail：yfujiki@kyudai.jp

【広報に関するお問い合わせ】

九州大学広報室
電話：092-802-2130 FAX：092-802-2139 E-mail：koho@jimu.kyushu-u.ac.jp

日本女子大学 入学・広報部 広報課
〒112-8681 東京都文京区目白台 2-8-1
TEL:03-5981-3163 FAX:03-5981-3164
URL：<http://www.jwu.ac.jp/>

E-mail：postmaster@atlas.jwu.ac.jp