

令和 6 年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究		
研究課題名		マイトファジーの分子機構の解明		
新規・継続の別		新規・継続		
研究代表者	所属	公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所	40 歳 以下○	35 歳 以下○
	職名・氏名	主任研究員・的場 一晃		
研究分担者 (適宜行を追加し て下さい)	所属	公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所	/	/
	職名・氏名	上級研究員・丸山 達朗	○	
	所属		/	/
	職名・氏名			
受け入れ教員	職名・氏名	教授・野田 展生		
概要 (100～150 字程度)		マイトファジーはミトコンドリアの品質管理機構であり、細胞機能の維持に寄与する。本研究では、マイトファジー関連タンパク質の相互作用様式を構造生物学的手法および試験管内再構成により解析し、マイトファジー始動に重要な基点形成のメカニズムの一端を明らかにした。		
研究目的 (300 字程度)		マイトファジーは、損傷または蓄積したミトコンドリアをオートファジー経路により選択的に分解し、細胞機能の恒常性維持に寄与する機構である。マイトファジーが誘導されると、関連タンパク質がミトコンドリア膜上で集合し基点を形成する。この基点形成はマイトファジーの始動を担う重要な過程であるが、そのメカニズムは十分には理解されていない。また、関連タンパク質は機能未知ドメインを含んでおり、相互作用様式にも不明な点が残されている。そこで本研究では、相互作用様式を構造生物学的手法にて解析するとともに、試験管内にて基点形成を再構成することで、マイトファジーの分子機構を解明することを目的とした。		
研究内容・成果 (1000 字程度・Web 会議の回数 も記載)		マイトファジーの基点形成に関与する各種タンパク質を大量発現させ、アフィニティタグおよび各種クロマトグラフィーを用いて高純度で精製する方法を確立した。さらに、構造情報に基づいて様々に作製した各種コンストラクトを用い、核磁気共鳴法や等温滴定型カロリメトリー法により相互作用を網羅的に解析した。その結果、構造非形成領域である天然変性領域内に複数の相互作用部位が存在し、それぞれの解離定数は数 μM のオーダーであることから、弱い相互作用であることが明らかになった。また、マイトファジー始動に必須なリン酸化について、キナーゼを調製して試験管内リン酸化反応を行い、リン酸化を介した相互作用も核		

	磁気共鳴法および等温滴定型カロリメトリー法にて調べた。その結果、リン酸化部位を介した相互作用も同様に数μM の解離定数を示す弱い結合であることが分かった。さらに、相互作用情報に基づいて変異体を設計して調製し、実際に相互作用が減弱された変異体をいくつか同定した。これらの変異体のなかには細胞内におけるマイトファジーの活性が顕著に抑制されるものがあり、新たに見出した相互作用はマイトファジーの活性においても重要であることが示された。以上の解析から、マイトファジーにおける重要な相互作用部位を新たに同定するとともに、これまで機能未知であったドメインの構造的役割を明らかにすることができた。 次にマイトファジー関連タンパク質の基点形成を再構成するため、蛍光標識したマイトファジー関連タンパク質とリポソームを用い、脂質膜上における各タンパク質の挙動を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。その結果、関連タンパク質は単独では脂質膜上を分散し均一に存在しているが、相互作用に伴って局所的に集合することが明らかになった。マイトファジーに必須なリン酸化は、その集合を促進することに寄与していることが示唆された。さらに上述の相互作用が減弱した変異体を用いて同様の実験を行ったところ、野生型で観察された各タンパク質の集合が顕著に抑制された。このことから、マイトファジー関連タンパク質は天然変性領域を介した多価相互作用により局所的に集合することが明らかになり、このような現象がマイトファジーの始動に重要な基点形成を担うことが示唆された。 以上の研究を推進するにあたり、Web 会議を週一回、可能な限り実施した（計約 40 回）。定期的な進捗報告とディスカッションにより、本研究課題を円滑に推進することができた。								
成果	<table><tr><td>【学会発表】</td></tr><tr><td>なし</td></tr><tr><td>【論文発表】</td></tr><tr><td>なし</td></tr><tr><td>【新聞報道】</td></tr><tr><td>なし</td></tr><tr><td>【学位取得者】</td></tr><tr><td>なし</td></tr></table>	【学会発表】	なし	【論文発表】	なし	【新聞報道】	なし	【学位取得者】	なし
【学会発表】									
なし									
【論文発表】									
なし									
【新聞報道】									
なし									
【学位取得者】									
なし									