

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15093

研究課題名(和文)ミトコンドリアの内部にオルガネラのリソソームが存在するという仮説を証明する研究

研究課題名(英文)Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria

研究代表者

荒川 博文(Arakawa, Hirofumi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：70313088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア内リソソームの存在についての仮説に関して、Mieapノックアウトマウスを用いて、各種臓器や腫瘍組織における電子顕微鏡によるミトコンドリアの形態学的解析を行った。その結果ミトコンドリア内に形態学的なリソソーム様構造物は認められなかった。一方で細胞株を用いてミトコンドリア内リソソームのライブイメージングを行った。その結果ミトコンドリア内リソソーム発生過程の可視化に成功した。以上のことから、Mieapによるミトコンドリア品質管理機構は、これまでのリソソームの機能とは全く異なる生命現象であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate the existence of the intramitochondrial lysosome, we performed electron microscopic analysis using the various organs and/or tissues of Mieap-wild and knockout mice. As the result, we did not morphologically observe any lysosome-like structures within the mitochondria. However, in the live-imaging experiment with various cell lines, we succeeded to visualize the process of the Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria. These results suggest that Mieap-regulated mitochondrial quality control is critically different from canonical lysosomal function.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：リソソーム ミトコンドリア タンパク質分解 品質管理 活性酸素種 酸化ストレス 酸化タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

不良なミトコンドリアの蓄積は、ミトコンドリアの機能不全を引き起こし、老化、がん、神経変性疾患、循環器疾患などの原因となり得る。しかしながら、ミトコンドリアの品質管理がどのように行われているかのメカニズムについてはほとんどわかっていない。我々は *Mieap* 遺伝子を同定し、そのコードする蛋白質が、ミトコンドリアの構造破壊を伴わないミトコンドリア内へのリソソームタンパク質集積を誘導し、ミトコンドリアの品質管理に極めて重要な役割を果たしている事実を発見した(論文 : Miyamoto Y et al. *PLoS ONE* 6, e16054, 2011. [F1000: Rating 8, Must Read], 論文 : Kitamura N et al. *PLoS ONE* 6, e16060, 2011., 論文 : 荒川博文、実験医学 2012 年 6 月号特集「ミトコンドリアのヒト疾患学」vol.30, No. 9, p1407-1417)。

我々はこれまでの解析から、ミトコンドリアより生成される活性酸素 (ROS) に反応して、(1) *Mieap* が、ミトコンドリアの構造破壊を伴わずに、ミトコンドリア内へリソソームを集積させ (MALM: *Mieap*-mediated Accumulation of Lysosomes within Mitochondria)、ミトコンドリアの酸化蛋白質を特異的に分解し、不良なミトコンドリアを修復するか(論文 )あるいは(2) *Mieap* が液胞形成を誘導し (MIV: *Mieap*-Induced Vacuole)、不良なミトコンドリアを液胞内へ丸ごと飲み込み分解し排除するという二つの機能を制御することでミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たす事実を確認した(論文 )。

### 2. 研究の目的

MALM は従来のオートファジーとは全く異なる現象と考えられ、ミトコンドリア内へのリソソームの移動による、細胞内小器官内の異常蛋白質に対するリソソームによる特異的な分解機構が存在する可能性を示唆するものであり、現在の細胞生物学の常識を書き換える成果が予想される。我々の研究によって、細胞生物学研究に革命的な進歩をもたらすとともに、不良なミトコンドリア蓄積を原因とする個体における老化・がん・神経変性疾患・循環器疾患の発生メカニズムの解明とその治療・予防に多大なる貢献が期待される。この研究の目的は、これまでのリソソームの役割やミトコンドリア内蛋白質分解に関する常識を大きく塗り替え、細胞生物学における未知の領域を明らかとすることである。

### 3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア内リソソーム存在の形態学的証明

(2) ミトコンドリア内リソソーム存在の生化学的証明

の2つであり、これらを解明するために、以

下の実験を行った。

*Mieap* ノックアウトマウスの各種臓器や腫瘍組織を用いたミトコンドリアの電子顕微鏡による形態学的解析

GFP-*Mieap* を用いた MALM 及び MIV 発生過程のライブイメージングによる可視化解析

### 4. 研究成果

(1) ミトコンドリア内リソソームの形態学的証明

*Mieap* ノックアウトマウスを作成し、抗マウス *Mieap* ミトコンドリア抗体によって、*Mieap* 蛋白質の正常臓器・組織における発現の分布・局在を調べた。その結果、心臓・肝臓・腎尿細管・胃壁細胞・角膜内皮細胞などのミトコンドリアの豊富な臓器・組織に *Mieap* 蛋白質の高いレベルの特異的発現を認めた。この結果からこれら臓器・組織の細胞において MALM あるいは MIV が発生している可能性が考えられた。

心臓・肝臓・腎尿細管・胃壁細胞の組織に対して、*Mieap* 正常型及び欠損型の両者において電子顕微鏡解析を行いミトコンドリア及びリソソームの形態学的解析を行った。*Mieap* 正常型の組織において、*Mieap* 欠損型に対して、明らかにミトコンドリア内にリソソーム様のオルガネラを形態学的に認める事ができなかった。

*Mieap* ノックアウトマウスを利用して、*Mieap* 欠損型 *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスを作成したところ消化管腫瘍の発生数の増加と腫瘍の悪化・がん化の顕著な促進作用を認めた。そこで MALM 及び MIV が何らかのがん抑制作用として機能している可能性を考え、*Mieap* 正常型及び欠損型の腫瘍組織に対する電子顕微鏡解析を行った。その結果、*Mieap* 正常型の組織において、*Mieap* 欠損型に対して、ミトコンドリア内にリソソーム様のオルガネラを形態学的に認める事ができなかった。

以上の結果から、これまで細胞株で観察されていたように MALM 発生時においてはリソソーム蛋白質がミトコンドリア内へ集積しているにもかかわらず、ミトコンドリア内にリソソーム様のオルガネラ構造は形態学的に観察されない可能性が高いと推測された。

(2) ミトコンドリア内リソソームの生化学的証明

GFP-*Mieap* 発現ベクターを作成し、外来性 *Mieap* の一過性過剰発現に伴う MALM 及び MIV の発生過程の可視化を試みた。大腸がん細胞株 HCT116 細胞 (*Mieap* 欠損細胞株) への GFP-*Mieap* 遺伝子の導入後 9 時間から 28 時間まで 6 分ごとに共焦点蛍光顕微鏡で撮影を行った。ミトコンドリアを Mitotracker-red で標識した。導入後 12 時間頃より細胞質へ均一な *Mieap* 蛋白質の発現を認めた後、*Mieap* 蛋白質のミトコンドリアへの集積を観察し

た。

24 時間頃より細胞内ミトコンドリア各所より MIV 様の円形の構造物の発生を認めた。

MIV 様構造物はミトコンドリアを取り込み、互いに融合しながら巨大化していった。

最終的に細胞内のすべてのミトコンドリアを取り込み巨大な液胞様構造物となった。

以上の結果から、Mieap の発現とともにまずは MALM が発生して、その後 Mieap の発現が増加することで MIV 様の構造物の出現とミトコンドリアの分解が発生することが推察された。従って MALM と MIV は互いに密接に関係した現象であると推察された。

今後は本実験系においてリソソームを可視化し、MALM 及び MIV 発生過程との関係を調べる事でミトコンドリア内へのリソソーム蛋白質集積のメカニズムが明らかになると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Nakamura Y, Arakawa H. Discovery of Mieap-regulated mitochondrial quality control as a new function of tumor suppressor p53. *Cancer Science*, 査読有, 5 巻, 2017, 809 - 17, DOI:10.1111/cas.13208

2. Kamino H, Nakamura Y, Tsuneki M, Sano H, Miyamoto Y, Kitamura N, Futamura M, Kanai Y, Taniguchi H, Shida D, Kanemitsu Y, Moriya Y, Yoshida K, Arakawa H. Mieap-regulated mitochondrial quality control is frequently inactivated in human colorectal cancer. *Oncogenesis*, 査読有, 4 巻, 2016, e181, DOI:10.1038/oncsis.2015.43

3. Tsuneki M, Nakamura Y, Kinjo T, Nakanishi R, Arakawa H. Mieap suppresses murine intestinal tumor via its mitochondrial quality control. *Scientific Reports*, 査読有, 5 巻, 2015, 12474, DOI:10.1038/srep12472

[学会発表](計 16 件)

1. 中村康之、常木雅之、荒川博文  
演題「Mieap-induced vascuole(MIV)によるミトコンドリア分解とそのメカニズム」第 10 回オートファジー研究会 2016 年 11 月 14 日 - 15 日(新潟県)

2. 常木雅之、中村康之、荒川博文  
演題「Mieap は胃腺がんの発生及び悪性形質獲得を抑制する」第 10 回オートファジー研究会 2016 年 11 月 14 日-15 日(新潟県)

#### 3. 荒川博文

演題「Mieap-regulated mitochondrial quality control and cancer: a new function of tumor suppressor」第 13 回アジアミトコンドリア学会・第 16 回日本ミトコンドリア学会年会合同学術集会 2016 年 11 月 1 日(東京都)

#### 4. 中村康之、常木雅之、荒川博文

演題「Mieap, the mitochondria-eating protein, induces cell death by eating unhealthy mitochondria」第 13 回アジアミトコンドリア学会・第 16 回日本ミトコンドリア学会年会合同学術集会 2016 年 10 月 30 日-11 月 1 日(東京都)

#### 5. 常木雅之、中村康之、荒川博文

演題「Mieap deficiency promotes vascular invasion of gastric adenocarcinoma in Gan mice」第 13 回アジアミトコンドリア学会・第 16 回日本ミトコンドリア学会年会合同学術集会 2016 年 10 月 30 日-11 月 1 日(東京都)

#### 6. 中村康之、常木雅之、荒川博文

演題「Mieap によって誘導されるミトコンドリアの分解除去を介した新しい細胞死の発見」第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 7 日(神奈川県)

#### 7. 常木雅之、中村康之、荒川博文

演題「Mieap deficiency promotes vascular invasion of gastric adenocarcinoma in Gan mice」第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 7 日(神奈川県)

#### 8. 中村康之、常木雅之、相川知徳、曾我朋義、荒川博文

演題「Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の破綻によるがん特異的異常ミトコンドリアの集積とその代謝特性について」第 4 回がん代謝研究会 2016 年 7 月 7 日-8 日(鹿児島県)

#### 9. 荒川博文

演題「Mieap によるミトコンドリア品質管理のメカニズムとがん～新しい抗加齢戦略としてのミトコンドリア酸化ストレス制御について～」第 16 回日本抗加齢医学会総会 2016 年 6 月 11 日(神奈川県)

#### 10. 中村康之、常木雅之、中西るり、荒川博文

演題「Mitochondria-eating protein は巨大液胞様構造物を誘導してミトコンドリアを食べることで細胞死を引き起こす」第 15 回日本ミトコンドリア学会年会 2015 年 11 月 19 日-20 日(福井県)

11. 常木雅之、中村康之、中西るり、荒川博文

演題「マウス全身組織における Mieap 発現とミトコンドリア局在の関連性」第 15 回日本ミトコンドリア学会年会 2015 年 11 月 19 日-20 日 (福井県)

12. 中村康之、常木雅之、中西るり、荒川博文

演題「Mitochondria-eating protein は巨大液胞様構造物を誘導してミトコンドリアを食べることで細胞死を引き起こす」第 9 回オートファジー研究会 2015 年 11 月 16 日-17 日 (兵庫県)

13. 常木雅之、中村康之、中西るり、荒川博文

演題「マウス全身組織における Mieap 発現とミトコンドリア局在の関連性」第 9 回オートファジー研究会 2015 年 11 月 16 日-17 日 (兵庫県)

14. 中村康之、常木雅之、金城貴夫、荒川博文

演題「Mieap はミトコンドリア品質管理を介してマウス腸管腫瘍を抑制する」第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日-10 日 (愛知県)

15. 常木雅之、中村康之、金城貴夫、荒川博文

演題「Mieap suppresses malignant progression of gastric neoplasia」第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日-10 日 (愛知県)

16. 中村康之、常木雅之、金城貴夫、喜多村憲章、荒川博文

演題「Critical role of Mieap, a p53-inducible protein, in intestinal tumor suppression」American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015 2015 年 4 月 18 日-22 日 (米国フィラデルフィア)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nccri.ncc.go.jp/s004/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 博文 (ARAKAWA, Hirofumi)

国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：70313088