

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18501

研究課題名(和文)オートファジーによって分解されるミトコンドリアの形態制御機構の解明

研究課題名(英文)Morphological analysis of mitochondria during mitophagy

研究代表者

山下 俊一 (YAMASHITA, Shunichi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30529095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、細胞内のエネルギーの大部分を作り出す、非常に重要な細胞内小器官で、細胞が生きていくために必須である。機能不全ミトコンドリアはオートファジーによって選択的に分解される(マイトファジー)が、その時のミトコンドリアの形態変化については未解明であった。本研究で、ミトコンドリア分解に伴うミトコンドリアの形態変化を経時的に観察したところ、分解されるミトコンドリアの一部は、隔離膜に包み込まれながら引きちぎられるように分裂することを明らかにし、新たなモデルとして提唱した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria produce the vast majority of cellular energy and are essential organelles for cell survival. A damaged portion of mitochondria is degraded by autophagy (termed mitophagy) and mitophagy contributes to mitochondrial homeostasis. It has been believed so far that mitochondrial division occurs first and then the divided mitochondrial portion is recognized by autophagy. However, morphological properties of mitochondria during mitophagy remain unclear. In the present study, I have discovered a novel division pathway of mitochondria during mitophagy. In the course of this pathway, first, mitochondrial portion of tubular mitochondria is recognized by isolation membrane. And then, the portion buds simultaneously with isolation membrane elongation. Finally, the mitochondrial portion is separated from tubular mitochondria and is completely enwrapped by autophagosome.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マイトファジー オートファジー ミトコンドリア Drp1 ミトコンドリア分裂 オートファゴソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは内膜の電子伝達系を介して形成された膜電位を利用して ATP 産生などを行う重要なオルガネラである。しかし、電子伝達系から漏れた電子から発生する活性酸素種によって傷害を受けることが知られている。機能不全に陥ったミトコンドリアは、ミトコンドリアオートファジー(以下、マイトファジー)によって選択的に分解され、その恒常性が維持されている。

(2) ミトコンドリアは融合と分裂のバランスによってその形態を変化させ、様々な環境に適応している。ミトコンドリアの分裂は、dynamamin-related protein 1 (以下、Drp1) が中心的な役割を担っており、Drp1 欠損細胞ではミトコンドリアの分裂が阻害され、融合のみが行われるため、非常に大きなミトコンドリアや、長いミトコンドリアが見られる。

(3) マイトファジー時には、ミトコンドリアが完全にオートファゴソームに包み込まれるが、オートファゴソームの大きさは直径約 1 μm であるため、ミトコンドリアはそれ以下の大きさまで小さくなる必要がある。よって、ミトコンドリア分裂因子である Drp1 はマイトファジーにおいても必須であると考えられてきた。

(4) ミトコンドリア分裂に必須な Drp1 であるが、マイトファジーへの寄与については様々な報告があり、幾つかの報告では Drp1 欠損細胞においてもマイトファジーが検出されることが示されていた。しかし、Drp1 によるミトコンドリアの分裂がマイトファジーに必須かどうかや、ミトコンドリアがマイトファジー時にどのようにして小さくなるのかについては明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

(1) Drp1 をはじめとする、ミトコンドリア分裂因子が、マイトファジーに必須であるかどうかを、様々な細胞と、異なるマイトファジー誘導条件によって解析することで、明らかにする。

(2) これまで、マイトファジー時には、ミトコンドリアが分裂して小さくなると信じられてきたが、その過程を経時的に解析した報告はない。そこで、マイトファジー誘導時のミトコンドリアの形態を経時的に解析し、どのような形態制御機構が存在するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マイトファジーを検出する細胞

HeLa 細胞 (Drp1 KO 細胞)

SH-SY5Y 細胞 (Drp1 siRNA 処理)

マウス胚性線維芽細胞 (Drp1^{-/-} MEF)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Dnm1

哺乳類 Drp1 のホモログ欠損細胞)

(2) マイトファジー検出方法

哺乳類培養細胞においては、ミトコンドリア移行型 Keima (mito-Keima) を安定発現させ、リソソームへと移行後の mito-Keima の pH 変化に応答した励起スペクトル変化で検出する。

出芽酵母においては、ミトコンドリアマトリクスタンパク質 Idh1 に GFP を融合し発現させ、マイトファジー誘導後 Idh1-GFP をウエスタンブロット解析によって検出する。出芽酵母の液胞内では GFP は比較的安定に保たれるため、Idh1-GFP のマイトファジーによる分解を遊離 GFP のバンドによって評価する。

(3) マイトファジーの誘導

低酸素条件

鉄キレート剤処理

ミトコンドリア脱分極剤 (同時に Parkin を発現させる)

飢餓条件

(4) マイトファジー時に Drp1/Dnm1 欠損細胞でミトコンドリアが分裂しているかどうかを判定するために、透過型電子顕微鏡による観察を行う。

(5) マイトファジー時のミトコンドリア形態の変化を解析するために、mito-mCherry、GFP-LC3B を安定発現する細胞を作製し、鉄キレート剤存在下でタイムラプス解析を行う。

4. 研究成果

(1) mito-Keima を用いた高感度マイトファジー検出系によって、低酸素、鉄キレート剤、ミトコンドリア脱分極剤 (Parkin を同時に発現させる) によるマイトファジーを野生型および Drp1 KO 細胞で解析した。その結果、全ての条件において Drp1 KO 細胞でも有意なマイトファジーが検出された。

(2) *S. cerevisiae* においても Dnm1 欠損細胞で飢餓によるマイトファジーが検出された。このことから、Dnm1 に依存しないマイトファジー時に見られるミトコンドリア分裂は酵母から哺乳類まで保存された機構であると考えられた。

(3) 免疫蛍光顕微鏡解析と電子顕微鏡解析によって、マイトファジー条件下で断片化したミトコンドリアが見られるかを解析した。その結果、野生型および Drp1 KO 細胞においても断片化したミトコンドリアが観察されたことから、マイトファジー条件下では、Drp1 非依存的にミトコンドリアが分裂していることが明らかとなった。

(3) mito-mCherry, EGFP-LC3B を安定発現する細胞を用いて、マイトファジー条件下でのタイムラプス解析を行った。その結果、マイトファジー条件下では、まずチューブ状のミトコンドリア一部が EGFP-LC3B で標識される隔離膜によって認識され、その後その部分のミトコンドリアが隔離膜によってちぎり取られるようにして分裂することが明らかとなった。またこの現象は、Drp1 KO 細胞でも同様にみられ、Drp1 非依存的分裂であることも明らかとなった

(4) マイトファジー条件下でみられる Drp1 非依存的ミトコンドリア分裂に關与する因子について解析するため、ミトコンドリア形態制御因子およびオートファゴソーム形成因子に対する RNAi を行い、ミトコンドリア分裂を解析した。その結果、Drp1 以外のミトコンドリア形態制御因子についても關与はみられなかったが、オートファゴソーム形成初期因子のノックダウン細胞においてミトコンドリアの断片化が阻害された。このことからマイトファジー時に見られる Drp1 非依存的ミトコンドリア分裂が、隔離膜の伸長に依存して起こることが明らかとなった。

(5) 本研究で得られた知見から、これまで信じられてきたマイトファジー時のミトコンドリア分裂機構について、全く新しいモデルを提唱することができた(図)。さらにこのモデルは、マイトファジーだけでなく、オートファゴソームより大きな物体を分解する際にも同様の現象が起きていることが予想され、オートファジー全般の理解についても重要な知見として認識された。この成果は、国内外で高く評価され、Journal of Cell Biology の Spotlight に取り上げられ、さらには 2017 Keystone Symposium Mitochondria Communications に合わせて出版された Special Collection にも選ばれた。

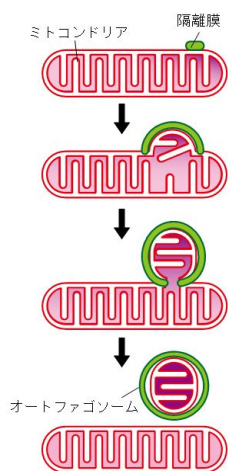


図 新たに提唱したマイトファジーモデル

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 7 件)

Shun-ichi Yamashita, Tomotake Kanki, A novel model for mitochondrial division

during mitophagy, Cell Cycle, 査読有り、2017、印刷中

Shun-ichi Yamashita, Tomotake Kanki, How autophagy eats large mitochondria: Autophagosome formation coupled with mitochondrial fragmentation, Autophagy, 査読有り、2017、13(5):980-981

DOI:10.1080/15548627.2017.1291113

Shun-ichi Yamashita, Tomotake Kanki, Detection of hypoxia-induced and iron depletion-induced mitophagy in mammalian cells, Methods in Molecular Biology, 査読有り、2017、印刷中

DOI:10.1007/7651_2017_19

Shun-ichi Yamashita, Xiulian Jin, Kentaro Furukawa, Maho Hamasaki, Akiko Nezu, Hidenori Otera, Tetsu Saigusa, Tamotsu Yoshimori, Yasuyoshi Sakai, Katusyoshi Mihara, Tomotake Kanki, Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy, Journal of Cell Biology, 査読有り、2016、215(5): 649-665

DOI:10.1083/jcb.201605093

Shiori Akabane, Kohei Matsuzaki, Shun-ichi Yamashita, Kana Arai, Kei Okatsu, Tomotake Kanki, Noriyuki Matsuda, Toshihiko Oka, Journal of Biological Chemistry, 査読有り、2016、291(31): 16162-74

DOI:10.1074/jbc.M116.714923

Yuko Hirota, Shun-ichi Yamashita, Yusuke Kurihara, Xiulian Jin, Masamune Aihara, Tetsu Saigusa, Dongchon Kang, Tomotake Kanki, Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways, Autophagy, 査読有り、2015、11(2):332-43

DOI:10.1080/15548627.2015.1023047

Tomotake Kanki, Kentaro Furukawa, Shun-ichi Yamashita, Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role, Biochimica et Biophysica Acta, 査読有り、2015、1853(10PtB): 2756-65

DOI:10.1016/j.bbamcr.2015.01.005

〔学会発表〕(計 9 件)

山下俊一, Drp1-independent mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation in mitophagy, Joint-Japan-Korea-China Young Investigator Conference (A3), 2017年2月20日、Seoul National University, ソウル市(韓国)

山下俊一, マイトファジー時に見られるミトコンドリア分裂機構の解析、第10回オートファジー研究会、2016年11月14日、NASPA ニューオータニ、南魚沼群・新潟県

山下俊一, マイトファジー時に見られるミトコンドリア分裂機構の解析、第89回

日本生化学会大会、2016年9月25日、
仙台国際センター、仙台市・宮城県
山下俊二、マイトファジー時に見られる
特殊なミトコンドリア分裂機構、第57回
新潟生化学懇話会、2016年6月25日、
新潟医療人育成センター、新潟市・新潟
県

山下俊二、Drp1-independent mitochondrial
division in mitophagy、Young Investigator
Conference on Autophagy (A3)、2016年2
月18日、新潟医療人育成センター、新潟
市・新潟県

山下俊二、マイトファジー時に見られる
ミトコンドリア形態制御機構、第9回オ
ートファジー研究会、2015年11月16日、
淡路夢舞台国際会議場、淡路市・兵庫県

山下俊二、Regulation of mitochondrial
morphology by Drp1-independent division
in mitophagy、2015年10月29日、
Joint-Korea-Japan Symposium on
Autophagy (A3)、Yonsei University、ソウ
ル(韓国)

山下俊二、マイトファジーにおけるミト
コンドリア形態制御因子の重要性、
YoungMito2015、2015年7月9日、一宮
シーサイドオーツカ、長生郡一宮町・千
葉県

山下俊二、マイトファジーにおけるミト
コンドリア形態制御因子の重要性、第67
回日本細胞生物学会大会、2015年7月2
日、タワーホール船堀、江戸川区・東京
都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 俊一 (YAMASHITA, Shun-ichi)
新潟大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：30529095

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

金 秀蓮 (JIN, Xiulian)

三原 勝芳 (MIHARA, Katsuyoshi)

大寺 秀典 (OTERA, Hidenori)

山下 智大 (YAMASHITA, Tomohiro)