

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06662

研究課題名（和文）オルガネラ量の恒常性を保つシステムの根底原理の解明

研究課題名（英文）Investigation of the basic principle of organelle-mass homeostasis

研究代表者

柳谷 耕太（Yanagitani, Kota）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：70614775

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）：一般的に、恒常性を研究する場合、その恒常性を攪乱する方法が必要となる。そこで、本研究では、狙ったオルガネラの量を人為的に減少できる細胞を樹立し、その対象オルガネラが不足状態になった際に、どのように細胞が対抗するのかを調べた。本研究期間では、主に、ミトコンドリア不足に対する応答をオミックス解析やライブイメージングを駆使して炙り出したところ、統合ストレス応答が活性化することが見出された。統合ストレス応答下では、サイトゾルのタンパク質合成のみが抑制されることから、ミトコンドリア不足下では、ミトコンドリア-サイトゾルタンパク質合成のバランス調節が起きていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア量の異常減少は、ガンや糖尿病、脳卒中などの疾患や老化の過程で起こることが知られている。本研究では、ミトコンドリア不足の状態は、ISRを活性化させ、ミトコンドリア-サイトゾルタンパク質合成のアンバランスを解消させることが明らかになった。ただし、長く続くISRの活性化は、細胞死の誘導や拒食症誘導ホルモンGDF15の放出などを介して、細胞・個体レベルでの悪影響を引き起こすことが知られている。そのため、ミトコンドリア不足の可能性のある上記の疾患群では、ISRの亢進による病態悪化が起きているかもしれない。本研究成果は、上記疾患群のISRを対象とした治療法の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：If one would investigate a homeostasis, having methods to disturb it are important. Therefore, in this study, we established cells that can artificially decrease the amount of a targeted organelle, then, investigated the cellular responses against the deficiency of the organelle. Using transcriptomics, proteomics, and live cell imaging, we uncovered that Integrated Stress Response (ISR) was found to be activated under the mitochondrial deficiency. Under ISR, protein synthesis in the mitochondria is intact, whereas that in the cytosol is attenuated. Given that respiratory chain complexes are chimera between mitochondrially synthesized proteins and cytosolic synthesized proteins, balanced synthesis of the two group proteins is important. Under ISR, only cytosolic protein synthesis is suppressed, indicating that a balance regulation of mitochondria-cytosol protein synthesis occurs under mitochondrial deficiency.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ ミトコンドリア 翻訳制御

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物において、好気呼吸による ATP の合成や細胞外へのタンパク質分泌、脂質の代謝などの細胞の生命機能に必須な反応は、ミトコンドリアや小胞体、ペルオキシソームなどの細胞内小器官(オルガネラ)で分担して遂行される。それぞれのオルガネラの量は細胞分裂のたびに半減するが、その後、新規に合成され、元の細胞と同程度の量にまで増幅されることでその量的恒常性が保たれる。哺乳類を含む高等動物においては、機能が異なる種類の細胞間では、それぞれのオルガネラ量の多寡は異なるが、同じ種類の細胞間では、各オルガネラの量は驚くほど類似している。例えば、小胞体で大量の抗体を合成する形質細胞では、どの細胞も著しく発達した小胞体を備えている。一方、ATP の消費が著しい心筋細胞や、ミトコンドリアで熱の産生を行う褐色脂肪細胞では、ミトコンドリアが大量に増殖している。これらの事実は、①それぞれの種類の細胞には、それぞれ独自のオルガネラ量の正常範囲が存在すること、②オルガネラ量をその正常範囲に保つ恒常性維持機構が存在することを示唆している。これまでの歴史の中で、オルガネラの生合成を司る因子は精力的に研究されてきたが、オルガネラ量の恒常性を維持する機構については、その存在が明らかであるにもかかわらず、十分に理解されていない。つまり、細胞のオルガネラ量が正常範囲を逸脱した際に、細胞はどのように応答し、その状態に対処するのかは、包括的に理解されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、哺乳動物細胞を用いて、オルガネラ量の恒常性を維持するシステムの根底原理の解明を目指した。一般的に、生命の恒常性維持機構を研究する場合、その恒常性が保たれた状態を攪乱する方法の開発が必須となる。例えば、ヒトの体温の恒常性を保つ仕組みを知りたいのであれば、著しい低温や高温に人体を曝すことで、人体がどのように応答し、体温を一定に保とうとするのかを調べることができる。本研究課題と標的である、「オルガネラ量の恒常性を司るシステム」について、明らかにしたいのであれば、オルガネラ量の恒常性が保たれた状態を攪乱する方法が必要となる。そこで、私は、狙ったオルガネラを特異的に減少させる方法（オルガネラ減少法）を組込んだ細胞を樹立して、この問題にアプローチすることにした。オルガネラ減少法を用いれば、特定のオルガネラ量が足りない状態を、人為的に引き起こすことができるので、オルガネラ量恒常性維持機構を研究することができるようになるはずである。

## 3. 研究の方法

### (1) オルガネラ減少法組み込み細胞の樹立

狙ったオルガネラの減少は、そのオルガネラをオートファジーで消化させることで実現させた。具体的には、オートファジー受容体を人為的に、標的オルガネラに局在化させることで、行った。ミトコンドリア、ペルオキシソーム、小胞体を対象オルガネラとし、その減少を引き起こすことができる方法を検証した。その後、doxycycline でオルガネラ減少法を発現誘導できるヒト培養細胞株を樹立した。

## (2) オルガネラ不足に対する細胞応答の炙り出し

オルガネラ減少は、上述のように、ミトコンドリア、小胞体、ペルオキシソームの3種のオルガネラで樹立できていたが、最初のテストケースとして、ミトコンドリアを選び、ミトコンドリア不足で活性化する細胞応答を探索した。細胞応答は、transcriptomics と proteomics を組み合わせて炙り出した。また、異なる角度からのアプローチとして、ライブイメージングによって、ミトコンドリア不足で活性化する細胞応答を探索した。

## (3) オルガネラ不足を伝達する分子の同定と解析

(2) で見出したミトコンドリア不足で活性化する細胞応答を引き起こす分子の同定を行い、オルガネラ不足でその細胞応答が活性化する意義の解明を目指した。

# 4. 研究成果

## (1) オルガネラ減少法組み込み細胞の樹立

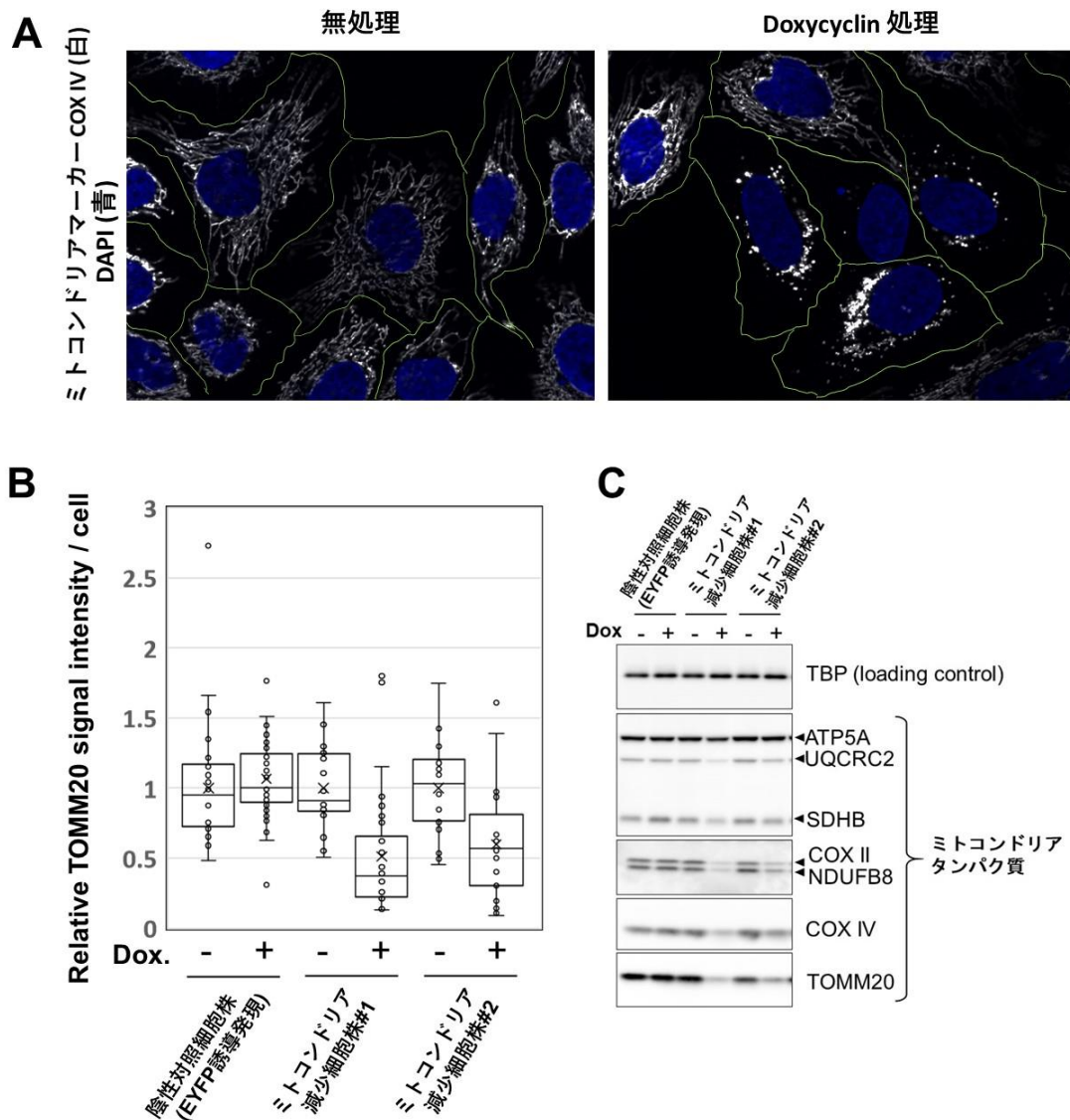
狙ったオルガネラをオートファジーで消化させるために、オートファジー受容体を標的オルガネラに局在化させる戦略を取った。オートファジー受容体としては、NDP52、OPTN と p62 を候補として検証したが、p62 はオルガネラを集積させ、巨大な凝集体を作り、消化はほとんど誘導しなかった。一方、NDP52 と OPTN は、ミトコンドリアで試したところ、どちらもオルガネラ減少能は有していたが、NDP52 の方が活性化高かった。NDP52 はペルオキシソームの減少も効率的に引き起こすことができたので、オルガネラ減少法に用いるオートファジー受容体としては万能であると思われたが、小胞体に局在させた場合には、小胞体消化能はほとんど有していなかった（これは、小胞体は、他のオルガネラとは異なる仕組みでオートファジー消化されていることを示唆する興味深い結果である）。そこで、小胞体の場合には、既知の ER ファジー受容体である FAM134B をもとに、小胞体減少法を樹立した。一過的発現で、活性が確認できたオルガネラ減少法（ミトコンドリア、ペルオキシソーム、小胞体）については、doxycycline で発現誘導できる安定発現細胞株を樹立した (図 1)。

## (2) ミトコンドリア不足に対する細胞応答の炙り出し

(1)で樹立したオルガネラ不足を誘導できる細胞株を用いて、オルガネラ不足に対する細胞応答を調べた。ミトコンドリアを最初のテストケースとして、ミトコンドリア減少法を発現させた細胞の proteomics を行ったところ、ミトコンドリア局在タンパク質が主に減少しており、オルガネラ特異性が確認できた (図 2A-B)。そこで、ミトコンドリア減少で引き起こされる細胞応答を transcriptomics で解析したところ、統合ストレス応答が活性化されることを見出した (図 2C; 本研究助成対象者は、ミトコンドリア減少によって、PGC-1 $\alpha$ などを起点とするミトコンドリア生合成関連因子の発現上昇が起こるのではないかと考えていたが、興味深いことに、そのような特徴は、transcriptome データからは浮かび上がってこなかった)。

Transcriptomics とは異なる角度で、ミトコンドリア不足に対する細胞応答をあぶり出すために、トコンドリアを極端に減少させる現場を、ライブイメージングによって解析し

た。その結果、ミトコンドリアが極端に減少した細胞の増殖が停止することを見出した。Transcriptomics のデータを解析すると、G1/S 期で細胞周期を停止させる機能を有する GADD45A が、ミトコンドリア不足で発現誘導されることが明らかになった。(図 2D)。



### 図1 ミトコンドリア減少法組込み細胞の樹立

ミトコンドリア減少法を doxycycline (Dox) 依存的に発現できるヒト細胞株を樹立した。この細胞は、Dox 添加によって、オートファジー依存的にミトコンドリアを減少させられる。(A) ミトコンドリア減少法組込み細胞の免疫染色像ミトコンドリアマーカー-COX IV を白色で、DAPI を青色で示した。(B) ミトコンドリア減少法組込み細胞(2 株)と陰性対照株(1 株)を doxycycline 処理の有無で、ミトコンドリアマーカー-Tomm20 で免疫染色し、細胞あたりの、その蛍光強度を定量しグラフ化した。(C) (B)と同様の条件の細胞の抽出液を Western 解析した。

### (3) ミトコンドリア不足で統合ストレス応答を活性化させる分子の同定

統合ストレス応答は、4 種類の eIF2 $\alpha$  リン酸化酵素のどれかが起点となって活性化される。ミトコンドリア不足で活性化する統合ストレス応答では、どの eIF2 $\alpha$  リン酸化酵

素が活性化するのかを調べたところ、HRI が責任因子であることが明らかになった。HRI は、ミトコンドリアストレスで活性化することが知られており、今回の結果とも一致する。

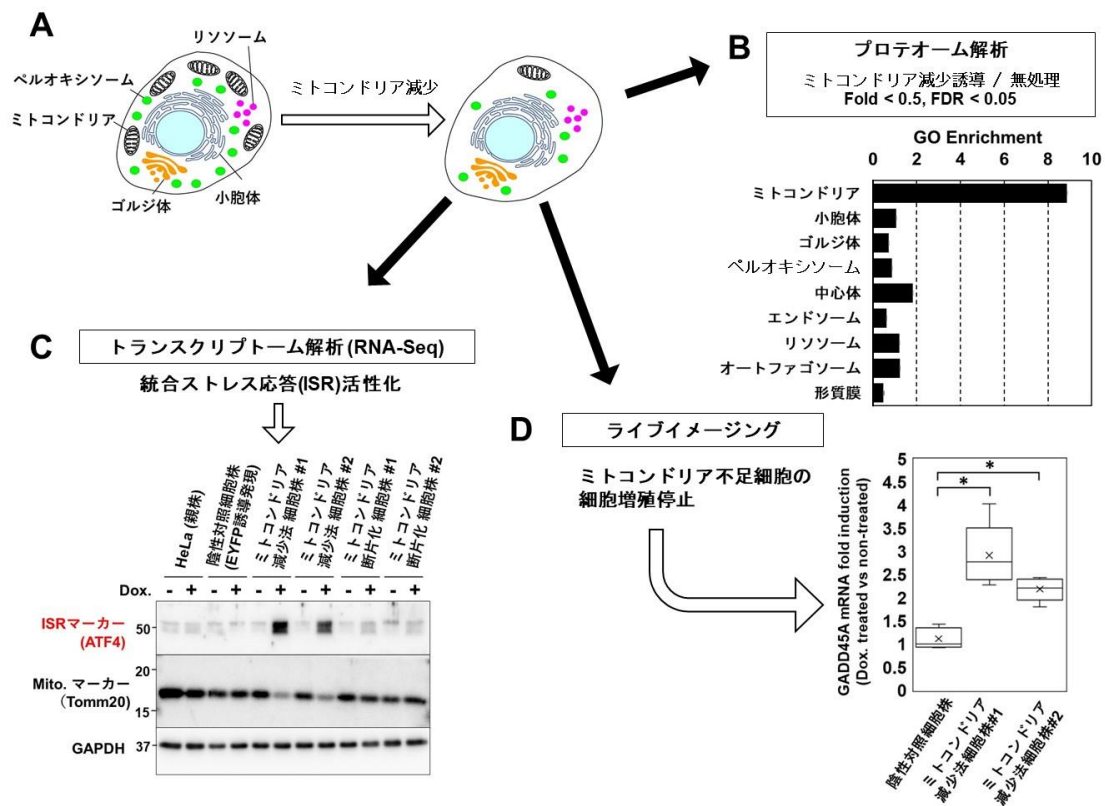


図 2 ミトコンドリア不足で活性化される細胞応答

(A) ミトコンドリア減少法組込み細胞を Doxycyclin で処理し、ミトコンドリア不足に陥らせた。(B) ミトコンドリア不足細胞と無処理の細胞を proteomics で解析し、50%未満に減少したタンパク質を Gene Ontology 解析すると、ミトコンドリアタンパク質の特異的減少が確認できた。(C) ミトコンドリア不足状態の細胞の transcriptomics で統合ストレス応答が活性化することが明らかになった。この現象は、下段パネルの Western 解析によっても確認されている。(D) ミトコンドリア不足細胞をライブイメージングで観察すると、細胞増殖が停止することが見出された。そこで、(C)の transcriptomics を解析すると、G1/S 期で細胞周期を停止させる機能を有する GADD45A が、ミトコンドリア不足で発現誘導されることが明らかになった。

本研究の助成期間では、ミトコンドリアを中心にオルガネラ不足時に活性化される細胞応答の解明を行った。本研究助成期間では、上記の通り、ミトコンドリア不足下では、HRI を介して統合ストレス応答が活性化することが明らかになっている。現在は、ミトコンドリア不足で統合ストレス応答が活性化する意義の解明を目指しており、その結果がまとまり次第、論文として公表する予定となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 柳谷 耕太	4. 巻 93
2. 論文標題 みなしごタンパク質の品質管理機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 239 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930239	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fennell Lilian M, Gomez Diaz Carlos, Deszcz Luiza, Kavirayani Anoop, Hoffmann David, Yanagitani Kota, Schleiffer Alexander, Mechtler Karl, HageIkruys Astrid, Penninger Josef, Ikeda Fumiyo	4. 巻 39
2. 論文標題 Site specific ubiquitination of the E3 ligase H0IP regulates apoptosis and immune signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e103303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019103303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳谷耕太
2. 発表標題 An Artificial approach to investigate homeostatic systems for organelle abundance
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------