

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07703

研究課題名（和文）Mieapによる鉄依存性細胞死の誘導機序に関する研究

研究課題名（英文）Analyses for iron-dependent cell death induced by Mieap

研究代表者

碓 直樹（Ikari, Naoki）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30649471

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）：Mieap は p53 誘導性蛋白であり、ミトコンドリアの恒常性を維持することでがん抑制に働くことが知られる。これまでに、MieapはDNA損傷に伴いミトコンドリアを分解する液胞様構造物 Mieap-induced vacuole (MIV) を形成することが報告され、その際に鉄増加と鉄依存性の細胞死が観察されたが、これらの現象がどのような機序で起こるのかは不明であった。今回我々は、Mieapが天然変性領域（IDR）をもつ蛋白であり、液-液相分離を誘導すること、MIVと呼ばれる構造物は膜に裏打ちされた液胞ではなく、液-液相分離により形成されカルジオリピン代謝に関わる液滴であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Mieap強制発現下においてMieapが誘導する液-液相分離の詳細は明らかになったが、内在性Mieapによる液滴形成は再現されず、その可能性の示唆にとどまった。そのため、Mieapが持つがん抑制機能を賦活化させるために、Mieapが誘導する液-液相分離を制御するといった、将来のp53経路を標的とした治療応用のためのシーズ導出には至らなかった。しかし、強制発現下におけるMieapの液滴の詳細観察から得られた知見は、細胞内で代謝の連続反応がどのように円滑に進むかの一具体例を示した可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Mieap, a p53-inducible protein, is known to participate in suppression of tumors by promoting mitochondrial quality control. Although Mieap was reported to form Mieap-induced vacuole (MIV) which degrade mitochondria upon DNA damage, which is accompanied by iron elevation and iron-dependent cell death. However, the mechanism involved in these phenomena remains unclear. We uncovered that Mieap is an intrinsically disordered region (IDR)-containing protein that does not drive formation of membrane-bound organelles, but biomolecular condensates (BCs) involved in cardiolipin metabolism.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Mieap 液-液相分離 カルジオリピン

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の網羅的ゲノム解析がなされ、癌の多彩な分子異常が明らかとなった。しかし一方で、多くの癌に共通する p53 の分子異常の重要性が再認識されることとなった¹⁾。p53 の標的分子一つ Mieap は、多くの癌で高頻度に不活性化していることが知られる²⁻¹²⁾。またその Mieap が、酸化ストレスの蓄積した不良なミトコンドリアの修復または除去を担うことが知られ、モデルマウスにおいて Mieap 欠損による発癌・進展が示されている⁹⁻¹²⁾。一方、Mieap がミトコンドリアの除去を行う場合は、リソソームの融合を伴う液胞様構造物 Mieap-induced vacuole (MIV) を形成し、その液胞内でミトコンドリアが分解されることが報告されていた⁹⁾。

2. 研究の目的

申請者は、Mieap 発現に伴い MIV を形成した細胞がトランスフェリンを介し細胞内の鉄含有量を増加させ、鉄依存性の細胞死が起こることを発見したため、この非古典的マイトファジー様の現象における 3 種のオルガネラ(エンドソーム、ミトコンドリア、リソソーム)の融合による分子の会合に着目し、Mieap がどのように鉄の輸送を制御するのか、その Mieap に輸送を制御された鉄がどのように細胞死に利用されるのか、Mieap による鉄を利用した細胞死に MIV がどのように関わっているのか、オルガネラの融合を Mieap がどのように仲介するのかを解析し、Mieap による新しい細胞死の誘導メカニズムを解明することで、将来の p53 経路を標的とした治療応用のためのシーズを導出することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず Mieap と鉄の輸送機構との関連を検討するため、Mieap 発現時に形成される液胞様構造物のプルシアンブルー染色、Mito-FerroGreen 投与後のライブセルイメージングを行い、液胞様構造物と鉄との関連についての評価を行った。また、細胞膜に挿入される鉄感受性の蛍光プローブを用いて鉄の挙動をエンドサイトーシスとの関連とともにライブセルイメージングにて解析した。

(2) (1)の過程にて、Mieap 発現時に形成される液胞様構造物が、膜を伴わない液滴であることが明らかとなったため、Mieap 液滴がこれまで一見膜に裏打ちされた液胞様に観察されていた原因について、蛍光タグ付き Mieap 発現ベクターと免疫染色を組み合わせたイメージングを施行し検討した。

(3) 液-液相分離の見地より、Mieap 蛋白の配列の in silico 解析(天然変性領域、荷電、親水/疎水領域、ortholog との比較)、fluorescence recovery after photobleaching(光褪色後蛍光回復)法による Mieap 液滴の液滴としての性質の特徴づけを行った。

(4) さらに Mieap 液滴がどのような分子を液-液相分離するかを検討した。本検討においては、Mieap がこれまでにミトコンドリアの恒常性維持を行うことが知られていたため、ミトコンドリア内の分子を検出するプローブやミトコンドリア蛋白の蛍光タグ付き発現ベクターを用い、ライブセルイメージングにて Mieap 液滴へ液-液相分離されるかの検討を行った。

(5) ここまで、Mieap 液滴(MIV とされていた構造物)は、放射線照射による DNA ダメージに伴う内在性 Mieap の発現増加を介して形成されるという過去知見のもと、便宜上、過剰発現により液滴形成を促し解析を行っており、内在性 Mieap による液滴でも同様の現象が起こるかの検討が必要と考えられたため、過去報告に準じ、内在性 Mieap による液滴形成の再現を試みた。

(6) しかし、4 研究成果に詳細を示すように各種条件にて再現されなかったため、液滴で可視化された Mieap の分子特性は、Mieap の生理的機能にもあられることを、Mieap ノックダウン細胞・ノックアウトマウスの Lipidomics 解析、Flux analyzer を用いた代謝解析、電子顕微鏡を用いたミトコンドリアのクリステ構造の解析、Mieap ノックアウトマウスの身体計測で検証した。

4. 研究成果

(1) の結果、Mieap 発現時に形成される液胞様構造物には、上記膜の標識プローブで検出される膜が存在しないことを発見し、さらに蛍光タグで可視化した Mieap は液滴を形成し、ミトコンドリアを液-液相分離することをつきとめた。

(2) の結果、Mieap 液滴が抗体不透過性であることが、これまで免疫染色観察にて一見膜に裏打ちされた液胞様に観察されていた原因であることをつきとめた。

(3) の結果、Mieap は液-液相分離を誘導するために必要な天然変性領域を有し、両親媒性、かつ陽性荷電が密集した領域を有することを明らかにした。

(4) の結果、Mieap が液滴内で、ミトコンドリアの脂質カルジオリピンとその代謝酵素群を選択的に相分離することを発見した。さらに、Mieap とカルジオリピンとの結合性については fat blot assay によっても確認できた。

(5) の結果、内在性 Mieap の発現は放射線照射により増加したものの、細胞/放射線照射の線量率を変化させても、液滴形成の再現には至らなかった。

(6) の結果、Mieap 過剰発現細胞ではカルジオリピンの増加、Mieap ノックダウン細胞・ノック

アウトマウスではカルジオリピンの減少がみられ、液滴で可視化された Mieap の性質は Mieap の生理的機能にも反映されるとして矛盾しない結果を得た。また Mieap 過剰発現細胞ではミトコンドリアにおける ATP 産生が増加し、Mieap ノックダウン細胞では ATP 産生が減少し、やはり液滴で可視化された Mieap の性質は Mieap の生理的機能にも反映されるとして矛盾しない結果を得た。さらに、カルジオリピン代謝との関連を示唆する知見として、Mieap ノックアウトマウスではミトコンドリアのクリステ構造が減少し、肥満傾向を認めることを発見した。

以上を取り纏め、Mieap が液-液相分離を誘導しカルジオリピン代謝を促進させることについて、プレプリントにて報告し(<https://doi.org/10.1101/2020.10.26.354365>)、図書にて報告し(細胞 Vol.54 No.8) 論文投稿を行っている。また、Mieap の液滴により相分離される蛋白を探索する際に、リソソーム蛋白として知られるカテプシン D が、過剰発現・生理的発現下ともに、ミトコンドリアにも局在することを副次的に発見したため、別途報告した (Biochem Biophys Res Commun. 2023;655;25-34.)。

《文献》 1) Nat Med 2017; 23;703. 2) Cell 2000;102;849. 3) Mol Cell 2001;8;85.
4) Nat Cell Biol 2003;5;216. 5) Nat Genet 2003;34;440. 6) Nat Rev Cancer 2004;4;978.
7) Cancer Res 2007;67;1451. 8) PloS one 2011;6;e16054. 9) PloS one 2011;6;e16060.
10) Sci Rep 2015;5;12472. 11) Oncogenesis 2016;5;e181. 12) Cancer Sci 2017;108;809.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoki Ikari, Yasuyuki Nakamura, Hirofumi Arakawa
2. 発表標題 Mieap forms membraneless organelles to compartmentalize and facilitate cardiolipin metabolism
3. 学会等名 AACR annual meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 碓 直樹, 中村 康之, 荒川 博文
2. 発表標題 p53 - Mieap経路のがん抑制におけるカルジオリピン代謝の役割について
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 碓 直樹, 中村 康之, 荒川 博文
2. 発表標題 Mieapは液滴を形成しカルジオリピン代謝を促進する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 碓 直樹, 中村 康之, 荒川 博文
2. 発表標題 Mieap forms membraneless organelles to compartmentalize and facilitate cardiolipin metabolism
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 碓 直樹, 中村 康之, 荒川 博文
2. 発表標題 Mieap液滴は損傷ミトコンドリアを液-液相分離することでがん抑制に作用する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 碓 直樹, 中村 康之, 柴田 貴弘, 山本 雅一, 荒川 博文
2. 発表標題 Mieap誘導性細胞死で形成される液胞の発生過程の検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 碓 直樹, 荒川 博文	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス	5. 総ページ数 5
3. 書名 細胞 Vol.54 No.8	

〔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
---------	---------