

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03257

研究課題名(和文)ミトコンドリア外シグナルによるミトコンドリア品質管理の制御機構

研究課題名(英文)Regulation of mitochondrial quality control by cellular signals

研究代表者

岡 敏彦(Oka, Toshihiko)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：40263321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスにより障害を受けたミトコンドリアは膜電位が低下し、最終的にオートファジー機構により選択的に排斥される(ミトコンドリア品質管理の機構)。しかし、ミトコンドリアの品質管理機構を細胞がどのように調節しているかについては、まだ多くの不明な点が残る。私達は、ミトコンドリアに関連する解糖系や低酸素条件が品質管理に与える影響を検討し、解糖系酵素のミトコンドリア局在機構と品質管理への寄与、そして低酸素でのミトコンドリアのユビキチン化亢進を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞内外の多様な環境変化に起因する異なるシグナル経路に着目して、ミトコンドリア機能の調節機構を明らかにしようとする点が特徴であり、特にミトコンドリアの代謝経路の上流である解糖系および下流の酸素消費との関連性を検証した点がユニークである。本研究で得られる結果は、ミトコンドリアの機能と品質管理の理解に寄与するだけでなく、PINK1やParkinを原因遺伝子とする遺伝性パーキンソン病の発症メカニズムを理解する一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Damaged mitochondria are selectively eliminated by autophagy, which is called mitochondrial quality control. It remains unclear how mitochondrial quality is controlled through cellular signaling pathways. We focused on a glycolytic enzyme and showed its mitochondrial targeting and involvement in mitochondrial quality control. Furthermore, we found that ubiquitination onto mitochondrial outer membrane proteins was stimulated under hypoxic conditions.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア品質管理

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア機能は、ATP 産生に加え、脂質の合成・分解、鉄・硫黄クラスター形成、アポトーシス制御など多岐に渡っており、細胞にとって不可欠である。また、ミトコンドリアは固有の DNA(mtDNA)を有するなど、他のオルガネラと異なり「細胞内共生」オルガネラとして細胞との協調的なバランスを維持している。近年、障害を受け膜電位が消失したミトコンドリアの排斥機構(ミトコンドリア品質管理)についての詳細な分子メカニズムが明らかになった。私達は、ミトコンドリア外膜に存在するユビキチンリン酸化酵素 PINK1 (遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物) が膜電位の消失に伴い、自己リン酸化により活性化し、ユビキチンリガーゼである Parkin (別の遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物) を障害ミトコンドリアに標的化させ、その排斥を促すことを明らかにした。さらに、私達はミトコンドリア品質管理が cAMP/PKA 経路を介したミトコンドリアタンパク質 MIC60 のリン酸化修飾により調節されることを示した (Akabane et al, 2016 *Mol. Cell*)。これまで、ミトコンドリア品質管理は膜電位消失という内的要因のみで自発的に起こると考えられてきたが、私達が明らかにした cAMP/PKA 経路の関与は、様々なミトコンドリア外のシグナル経路が品質管理を調節する可能性を示した。

本研究では、(1) 解糖系酵素による調節、および(2) 低酸素条件での制御について中心に解析を進め、これまで未解明であったミトコンドリア外シグナルによる品質管理の調節機構の総合的な理解を目指す。この調節機構の解明は、共生オルガネラであるミトコンドリアを細胞側がどう制御しているかを理解する重要な知見となる。

2. 研究の目的

(1) 解糖系酵素によるミトコンドリア品質管理の調節

ミトコンドリアの重要な機能の1つである ATP 産生は、解糖系と協調することで細胞内 ATP レベルを維持している。私達は、解糖系阻害剤である 2-deoxyglucose (2DG)を添加することで、障害ミトコンドリアへの Parkin の標的化が強く阻害されることを見出した。さらに、2DG の標的酵素であるヘキソキナーゼのアイソフォーム HK2 の RNAi による発現抑制で、Parkin 標的化の阻害と PINK1 の顕著な減少を確認した。しかし、ヘキソキナーゼより下流で働く4つの酵素 (G6PD, GPI, GAPDH, PKM2) の発現抑制では、Parkin 標的化阻害が見られないことから、解糖系やペントースリン酸経路ではなく、HK2 そのものが品質管理に直接関わる可能性が考えられた。さらに、Native-PAGE を用いて PINK1 複合体に HK2 が含まれるかを検討したところ、抗 HK2 抗体の添加で PINK1 複合体のバンドのシフトが見られ、HK2 がミトコンドリア上で PINK1 を介したミトコンドリア品質管理に直接的に働くことが示唆された。しかし、HK2 が外膜上で PINK1 の蓄積・複合体形成に分子レベルでどう寄与するかはまだ不明であり、その解明が品質管理の調節機構を理解する上で欠かせない。また、解糖系の初発酵素であるヘキソキナーゼのミトコンドリア品質管理における役割を明らかにすることで、細胞内 ATP 産生における解糖系とミトコンドリアのバランス調節機構の解明を目指す。

(2) 低酸素条件でのミトコンドリア品質管理の制御

2DG による解糖系の阻害はミトコンドリア品質管理に抑制効果をもたらしたため、次はミトコンドリアの呼吸鎖活性を制限するために低酸素条件 (<1.0 % O₂)で細胞を培養し Parkin 標的化を観察した。すると、通常の培養条件 (>20.0 % O₂)では Parkin 標的化が見られない低い濃度の脱分極剤処理 (5 μM CCCP) でも多くの細胞で Parkin 標的化が観察された。さらに、低酸素で 5 μM CCCP の条件では、膜電位依存性蛍光色素 TMRM で染色されるミトコンドリアに Parkin 標的化

が高頻度で観察された。通常の培養条件に 5 μ M CCCP 添加では、TMRM 染色に関わらず殆どのミトコンドリアへの Parkin 標的化は見えないため、低酸素では膜電位が少し減少したミトコンドリアでも Parkin の標的化が起きると考えられた。このような低膜電位ミトコンドリアへの Parkin 標的化は、PINK1 発現抑制により完全に阻害されたが、低酸素で主要な転写因子である HIF1 α や低酸素誘導性 mitophagy に働く BNIP3 および Nix の発現抑制では阻害されなかったため、低酸素に固有な現象ではなく、酸素存在下と同様な PINK1/Parkin を中心とした経路だと想定された。活性化した PINK1 は、ミトコンドリア上で偶然に付加されたユビキチン分子をリン酸化することで Parkin 標的化を始動する。そこで、ミトコンドリア局在ユビキチンリガーゼである MITOL を発現抑制したところ、低酸素での Parkin 標的化は完全に抑制された。通常条件での MITOL 発現抑制は Parkin 標的化に殆ど影響しないため、低酸素ではミトコンドリア上に付加されたユビキチンの数が増加することで、少量の PINK1 の活性化でも直ぐに Parkin の標的化に繋がると推定される。低酸素での品質管理のさらに詳細な分子機構を明らかにすると共に、虚血状態でのミトコンドリア機能の適応変化の理解に繋がりたい。

3. 研究の方法

(1) 解糖系酵素によるミトコンドリア品質管理の調節

ヘキソキナーゼは可溶性タンパク質で主に細胞質に存在するが、脱分極に伴いミトコンドリアへの移行が促進される。そこで、標的化の異なるヘキソキナーゼ・アイソフォームを用いてキメラタンパク質を作成することで、ミトコンドリア標的化に必要な領域を決定する。また、ヘキソキナーゼ相互作用因子を探索するため、HK2-3FLAG 安定発現細胞を樹立し、免疫沈降と LC/MS 解析により脱分極時に相互作用できる因子の同定を目指す。

(2) 低酸素条件でのミトコンドリア品質管理の制御

低酸素での Parkin 標的化促進への MITOL の関与を示したが、他にもミトコンドリア機能に関連する複数のユビキチンリガーゼが知られている。これらのリガーゼについて、低酸素での発現変化をウエスタンブロットにより定量化する。発現量が変動する酵素については、発現抑制や過剰発現により Parkin 標的化への影響を検証する。さらに、低酸素条件でのミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化亢進を、ウエスタンブロットにより定量的に検討する。

4. 研究成果

(1) 解糖系酵素によるミトコンドリア品質管理の調節

ヒトには4種類のヘキソキナーゼアイソフォーム (HK1, HK2, HK3, HK4) をコードする遺伝子が存在する。これまでの研究から、ヘキソキナーゼはアイソフォームごとに細胞内局在が異なることが報告されている。そこで、ミトコンドリア外膜上におけるヘキソキナーゼの機能を解析するために、3種類のアイソフォーム (HK1, HK2, HK4) を用いて、その酵素活性と細胞内局在の関連性を蛍光抗体法により解析した。その結果、HeLa 細胞において HK1 はミトコンドリアに、HK4 は細胞質に、HK2 はミトコンドリアと細胞質に局在することが明らかとなった。さらに、HK2 の2つの酵素活性部位に変異を導入した変異体 (酵素失活型) では、ミトコンドリア局在が失われたが、HK1 変異体 (酵素失活型) ではミトコンドリア局在に変化はなかった。そのため、HK2 では酵素活性に依存したミトコンドリアへの標的化機構が示唆された。さらに、HK1 と HK2 は 94% のアミノ酸配列の相同性を示すにもかかわらず細胞内局在が異なるため、ミトコンドリア局在を示す HK1 の標的化に働く配列を同定するため、細胞質だけに存在する HK2 変異体 (酵素失活型) とのキメラタンパク質を作成し、その細胞内局在を蛍光抗体法で検証した。そ

の結果、HK1の1-208番目までのアミノ酸配列が、ミトコンドリア局在に重要であることが明らかとなった。

障害を受けたミトコンドリアの外膜上で、HK2はPINK1と共にタンパク質複合体を形成するだけでなく、HK2自身も異なる大きさのタンパク質複合体を形成できる。HK2のタンパク質複合体の形成に関わる因子を検索するために、脱分極剤依存にヘキソキナーゼに結合するタンパク質の同定を試みたが、特異的な因子を見出すことは出来ていない。これは、多くのHK2は細胞質に存在するため、HK2とミトコンドリア外膜上で特異的に結合するタンパク質は相対的に微量になると考えられた。そこで、ヘキソキナーゼとの関連が示唆されている幾つかのミトコンドリア外膜タンパク質をRNAi法により発現抑制したところ、HK2のミトコンドリア標的化に働く外膜タンパク質の候補を1つ見出した。このタンパク質の過剰発現ではHK2のミトコンドリア局在が増加したため、量的な正の相関があることも確認できた。

(2) 低酸素条件下でのミトコンドリア品質管理の制御

低酸素条件下におけるParkinのミトコンドリア標的化の亢進は、ユビキチンリガーゼの関与を鑑みると、ミトコンドリア外膜上でのユビキチン化タンパク質の増加が原因であると推定された。そこで、ミトコンドリア外膜局在モデルタンパク質にユビキチン1分子を融合したモデル基質を通常条件下で培養する細胞に発現させ、低いCCCP濃度でのParkin標的化を検討したところ、促進的効果が確認できた。さらに、低酸素条件下で培養した細胞よりミトコンドリア画分を調製し、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行ったところ、通常条件下に比べてミトコンドリア画分でのタンパク質のユビキチン化の亢進が認められた。これらの結果は、低酸素条件下でのParkin標的化促進は、ミトコンドリア外膜上に存在するユビキチン分子の量が律速であるという考えを強く支持している。そこで、ミトコンドリア機能に関連する事が報告されている複数のユビキチンリガーゼをRNAiにより発現抑制し、低酸素条件下でのParkin標的化促進への影響を検討したところ、少なくとも2つユビキチンリガーゼの関与が確認できた。つまり、MITOLを含めた複数のユビキチンリガーゼが、低酸素におけるミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化に寄与することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shiori Akabane, Kiyona Watanabe, Hidetaka Kosako, Shun-ichi Yamashita, Kohei Nishino, Masahiro Kato, Shiori Sekine, Tomotake Kanki, Noriyuki Matsuda, Toshiya Endo, Toshihiko Oka	4. 巻 42
2. 論文標題 TIM23 facilitates PINK1 activation by safeguarding against OMA1-mediated degradation in damaged mitochondria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koma Rikuhide, Shibaguchi Tsubasa, Perez Lopez Claudia, Oka Toshihiko, Jue Thomas, Takakura Hisashi, Masuda Kazumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Localization of myoglobin in mitochondria: implication in regulation of mitochondrial respiration in rat skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 赤羽しおり, 渡邊聖菜, 岡敏彦
2. 発表標題 プロテアーゼを介したミトコンドリア品質管理の制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤羽しおり, 岡敏彦
2. 発表標題 The novel role of TIM23 in mitochondrial quality control
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conference, Mitochondria and Metabolism in Health and Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤羽しおり, 渡邊聖菜, 小迫秀尊, 松田憲之, 遠藤斗志也, 岡敏彦
2. 発表標題 ミトコンドリア膜透過装置TIM23はPINK1複合体のメンバーとして, 脱分極で郵送されるPINK1分解を抑制する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------