

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770231

研究課題名（和文）ミトコンドリアの分裂機構：分裂サイトの初期形成から膜分裂までの解明

研究課題名（英文）Mechanism of mitochondrial fission: from the initial formation of fission sites to the membrane scission

研究代表者

大寺 秀典（OTERA HIDENORI）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40380612

研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリアの分裂は細胞機能の維持に極めて重要であり、その破綻は老化、神経変性疾患などにおける神経細胞死などの原因となる。細胞質に存在するダイナミンファミリー型GTPaseであるDrp1がミトコンドリア分裂の実行因子として働く。内在性Drp1は、ミトコンドリア上にドット状構造物として観察される。MffをRNAi抑制するとミトコンドリアが伸長して、それに伴いDrp1は細胞質に散在してしまう。それとは対照的にMffの過剰発現によりDrp1のリクルートが促進されミトコンドリア分裂が亢進する。従って、Mffはミトコンドリア分裂に必用なDrp1リクルートの際の受容体であることを示唆している。Drp1はおそらくMffと共にミトコンドリア膜面上に自己会合により巻き付き膜を切断する。MIEF1はDrp1と結合してDrp1の自己会合を促進してGTP加水分解活性を阻害する。一方、MffはMIEF1によるDrp1加水分解活性の阻害をキャンセルする。これらの結果から、MIEF1はGTP結合型Drp1と結合して加水分解を停止させ、この間ミトコンドリア上でDrp1の自己会合を安定化させるのではないかと予想される。

研究成果の概要（英文）：

Mitochondrial fission is important for maintaining cellular function, and its dysfunction causes aging, neuronal synaptic loss, and cell death in several human neurologic diseases. The major player of mitochondrial fission is a largely cytosolic member of the dynamin family of GTPases Drp1 in mammals. Endogenous Drp1, observed as dotted structures on mitochondria, was clearly decreased and was dispersed in the cytoplasm in Mff RNAi cells concomitant with mitochondrial network extension. In contrast, Mff overexpression induced mitochondrial fragmentation, concomitant with increased Drp1 recruitment to the mitochondria. These observations indicate that Mff functions as a Drp1 receptor to mediate mitochondrial fission. Drp1 might self-assemble via its ability to homo-oligomerize at Mff-containing foci on the mitochondrial surface, forming spiral structures around the mitochondrial tubules. MiD51/MIEF1 interacts with recombinant Drp1 to inhibit its GTPase activity accompanied by Drp1 oligomerization. In contrast, Mff competes with MiD51/MIEF1 to stimulate Drp1 GTPase activity. Taken together, MiD51/MIEF1 seems to bind oligomerized Drp1 and stabilize them at the surface of the mitochondrial membrane in the GTP-locked state to inhibit mitochondrial fission.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,800,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜

1. 研究開始当初の背景

分裂反応に関しては、Drp1 (GTPase) が自己会合 (**self-assembly**) によりミトコンドリアに巻き付いて、GTP 加水分解による構造変換により膜を切断すると考えられている (モデル図参照)。酵母では、Drp1 はアダプタータンパク質 Mdv1 を介してミトコンドリア膜タンパク質 Fis1 と結合して切断面に集積する。しかし、哺乳動物細胞では、(1) Fis1 の発現を抑制しても、Drp1 集積化には影響ないこと、(2) Mdv1 相同遺伝子が見当たらないことから、酵母とは異なる Drp1 集積化機構の存在が示唆されていた。このような背景の下、申請者は Drp1 の集積化に必須な“分裂促進因子”としてミトコンドリア膜タンパク質 Mff の機能を見いだした。それと併せて、Fis1 ノックアウト細胞を作成し、Fis1 が哺乳動物細胞のミトコンドリア分裂に必要なことを示してきた。

翌 2011 年、2つのグループにより Drp1 の集積化に作用する新規ミトコンドリア膜タンパク質 MIEF1 が発見された。ところが、MIEF1 の過剰発現は Drp1 の集積化を促進するが、Mff とは対照的に分裂を誘発せずむしろ阻害する。このように、Drp1 の機能制御に関わる役者が次第に明らかになってきたが、その作動機構は解明されていない。

2. 研究の目的

ミトコンドリアは融合・分裂によりダイナミックにその形態を変換し、細胞骨格に沿って適切に配置されエネルギー産生の他、アポトーシス等を通して真核細胞の生と死を調節するオルガネラである (英文総説 1-5)。近年、ミトコンドリア分裂制御の異常が神経変性疾患・肺動脈高血圧症・筋萎縮症などの一因となることが報告され、ミトコンドリア分裂と疾患との関連が注目されてきた。しかし、疾患発症機構および治療法解明の基盤とな

る“哺乳動物ミトコンドリアの膜分裂およびその制御機構”については理解されていない。

本申請研究課題では、神経変性疾患・糖尿病・癌転移・老化といった病態とも密接に関連している「**ミトコンドリア分裂制御機構の解明**」を目指し、関連疾患の病態解明や新しい薬物治療のターゲットとして臨床研究に応用するための分子基盤を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

Drp1 の GTP 加水分解サイクルに対する、Mff、MIEF1 の影響を明らかにするためそれぞれのリコンビナントタンパク質を作製して解析した。GTP 加水分解活性はマラカイトグリーンによる発色により定量した。

Drp1 の自己会合形成における Mff と MIEF1 の役割を明らかにするため、リコンビナント Drp1 の構造をネガティブ電顕により解析した。その後、Mff および MIEF1 存在下での Drp1 の自己会合形成について電顕観察を行った。またヌクレオチド存在の有無での影響についても検討した。

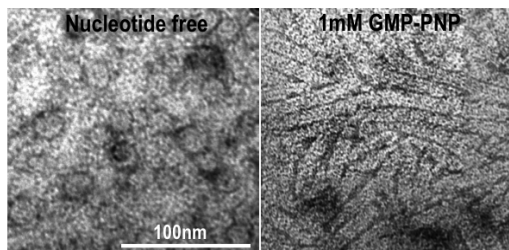
MIEF1 のミトコンドリア形態への作用を細胞レベルで明らかにするため、MIEF1 の過剰発現あるいは発現抑制などの細胞生物学的手法で検討した。具体的には、ミトコンドリア形態のほか Drp1 分裂サイト形成の有無について調べた。

Mff 結合因子を同定するためタグ付きの Mff を発現させた HeLa 細胞ライセートから免疫沈降にて結合因子を取得して質量分析にて因子同定を試みた。また、ミトコンドリア分裂が途中で停止した分裂中間体を取得するため Mff の N 末端を改変させた変異体をいくつか作製し目的の表現型を示す変異体の取得を試みた。

4. 研究成果

ミトコンドリア分裂サイトは形成・解離をダイナミックに繰り返している。研究代表者は、N末端アミノ酸領域の配列を改変した Mff 変異体のうち、Drp1 と foci 形成するが分裂活性を持たないものを見いだした。本変異体は“ミトコンドリア分裂サイト中間体”を形成すると考えられ、これに含まれる因子を同定できれば分裂サイト構成因子を新たに同定できる可能性が高い。検疫沈降により本 Mff 変異体に結合するタンパク質を取得して質量分析によりいくつか同定した。

GTP 結合型 Drp1 (GTPase) は、細胞質からミトコンドリア膜へのリクルート後、自己会合オリゴマーを形成して膜に巻き付き、GTP 加水分解に伴う高次構造変化により膜を切断すると考えられている。Mff は Drp1 の GTPase 活性を促進するが、MIEF1 は GTP 結合型 Drp1 の加水分解を阻害して自己会合 (self-assembly) を安定化させることを見出した。さらに、電顕観察から MIEF1 はヌクレオチド存在下で Drp1 の自己会合形成を促進することを明らかにした (図参照)。すなわち、これら 2 つの因子が協調的に働き Drp1 活性を調節しながらミトコンドリア分裂を制御している姿が予想される。



リコンビナント Drp1 をネガティブ染色にて電顕観察した。左図はヌクレオチド非存在下、右図は GTP 加水分解アナログ GMP-PNP 存在下でインキュベート後、観察した。GMP-PNP 存在下すなわち GTP 結合型で Drp1 はポリマーを形成してチューブ状構造をとる。このチューブ状構造でミトコンドリアに巻き付き、加水分解に伴う構造変化により膜を切断すると考えられている。

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 5 件)

1. Onoue K, Jofuku A, Ban-Ishihara R, Ishihara T, Maeda M, Koshihara T, Itoh T, Fukuda M, Otera H, Oka T, Takano H, Mizushima N, Mihara K, Ishihara N.

Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology.

J. Cell . Sci. (in press)

doi: 10.1242/jcs.111211

2. Otera H, Ishihara N, Mihara K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta.* (in press) doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.002
3. Ishihara N, Otera H, Oka T, Mihara K. Regulation and physiologic function of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxid Redox Signaling.* 2012 Oct 1. [Epub ahead of print] <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.4830>
4. Otera H, Fujiki Y. Pex5p imports folded tetrameric catalase into peroxisomes by interaction with Pex13p. *Traffic.* Oct 13(10), 1364-1377 (2012). doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01391.x
5. Otera H, Mihara K. Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. *International J. Cell Biol.* 2012 Mar 22. [Epub ahead of print] doi: 10.1155/2012/821676

[学会発表] (計 1 件)

大寺秀典、三原勝芳

ミトコンドリアの分裂を司る分子とその機能 日本生化学会大会 シンポジウム (2011) 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.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutupeople/otera.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大寺 秀典 (OTERA HIDENORI)

九州大学医学研究院 助教

研究者番号：40380612

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：