

令和 7 年 9 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H02615・23K23878

研究課題名（和文）レセプター依存的マイトファジーの誘導制御と生理機能の解明

研究課題名（英文）Regulation of receptor-mediated mitophagy and its physiological roles

研究代表者

神吉 智丈（Kanki, Tomotake）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：50398088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：BNIP3/NIX_DKO細胞をレセプター依存的マイトファジー不能細胞として解析した結果、レセプター依存的マイトファジーはmtROSを低く維持することで、フェロトーシスから細胞を保護していることを解明した。また、マイトファジーレセプターであるBNIP3とNIXのマイトファジーにおける役割は、隔離膜とミトコンドリアを繋ぎ止め、隔離膜の伸長に寄与すること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

マイトファジーは、異常もしくは不要となったミトコンドリアを選択的に分解することでミトコンドリアの機能維持に貢献しており、ミトコンドリア機能低下を伴う様々な疾患の病態や老化現象に関与していると考えられている。このため、マイトファジーを医療へ活用しようとする研究が進められている。本研究は、レセプター依存的マイトファジーの生理的意義や分子機構の一端の解明に成功しており、今後のマイトファジーの医療応用への基盤となる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed BNIP3/NIX_DKO cells as receptor-mediated mitophagy-deficient cells and found that receptor-mediated mitophagy protects cells from ferroptosis by maintaining low levels of mtROS. Furthermore, we revealed that the role of the mitophagy receptors BNIP3 and NIX in mitophagy is to mediate tight attachment and expansion of the isolation membrane to mitochondria.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア オートファジー マイトファジー マイトファジーレセプター

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、細胞活動に必要な ATP の大半を産生する重要なオルガネラであり、その機能や量は適切に維持される必要がある。オートファジーによるミトコンドリア分解(以下マイトファジー)は、異常もしくは不要となったミトコンドリアを選択的に分解することでミトコンドリアの機能維持に貢献していると考えられている。マイトファジーは真核生物間で広く保存された現象であるにも関わらず、その分子機構や生理的意義は十分に解明されていなかった。

哺乳類では独立した二つのマイトファジー経路が知られている。一つは家族性パーキンソン病の原因因子である PINK1 と Parkin が協調してミトコンドリア外膜タンパク質をユビキチン化することにより誘導される経路(ユビキチン依存的経路) もう一つは、ミトコンドリア外膜のマイトファジーレセプターに依存した経路(レセプター依存的経路)である。これまでに 5 種類のマイトファジーレセプター(BNIP3、NIX、FUNDC1、FKBP8、BCL2L13)が報告されている。しかし、どのレセプターが本質的に重要であるかは不明であり、マイトファジー不能細胞が樹立されていなかった。このことがマイトファジーの生理的意義の研究を難しくしていた。

オートファジーが誘導されると隔離膜と呼ばれる脂質膜が形成され、隔離膜が伸長し細胞質成分を取り込みながら球状のオートファゴソームとなる。マイトファジーの場合は、隔離膜はミトコンドリア上に形成され、ミトコンドリアの一部を包み込むように取り込み、オートファゴソームが形成される時にミトコンドリアは分裂し、オートファゴソームに収まる大きさになると考えられている(Yamashita et al. JCB 2016)。しかし、隔離膜がミトコンドリアを包み込む過程でマイトファジーレセプターがどのような役割を担うかについては不明な点が多かった。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では、レセプター依存的マイトファジーに着目し、レセプター依存的マイトファジーの生理的意義の解明および、マイトファジーレセプターの機能解析を行うことを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) レセプター依存的マイトファジー不能細胞の樹立とその解析

予備実験において、HeLa 細胞の 5 つのマイトファジーレセプター(BNIP3、NIX、FUNDC1、FKBP8、BCL2L13)の単独破壊、すべての組み合わせの二重破壊、三重破壊、五重破壊株を作成しマイトファジーを確認したところ、BNIP3 と NIX の二重破壊株において低酸素や鉄キレート剤である DFP によって誘導されるレセプター依存的マイトファジーが完全に抑制されることを見出していた。一方で FUNDC1、FKBP8、BCL2L13 の破壊はマイトファジーにほとんど影響しなかった。本研究では、BNIP3/NIX のダブルノックアウト(DKO)細胞をマイトファジー不能細胞とし、その生化学的解析を行った。

(2) マイトファジーレセプターの機能解析

マイトファジー誘導時に BNIP3 および NIX がどのように機能しているかを解析した。具体的には、野生型および BNIP3/NIX_DKO 細胞を用いて、電子顕微鏡や蛍光顕微鏡を用いて、隔離膜とミトコンドリアの関係や、BNIP3 や NIX のミトコンドリア上での局在などを詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) レセプター依存的マイトファジー不能細胞の樹立とその解析(文献1)

BNIP3/NIX_DKO 細胞をマイトファジー不能細胞とし、この細胞のミトコンドリアを詳細に解析したところ、呼吸活性が低下しミトコンドリア由来の活性酸素(mtROS)が 10 倍以上増加していた(図 1)。さらにメタボローム解析などから、マイトファジー欠損細胞では酸化ストレスに対する防御機構である Nrf2 経路が活性化されており、グルタチオンやカタラーゼ量が増加していることが明らかとなった。

次に、様々な環境での細胞生存率解析から、グルタチオン合成阻害剤とカタラーゼ阻害剤を処理した時、マイトファジー不能細胞のみで過酸化脂質が増加し細胞死が引き起こされることを見出した。この細胞死は、フェロトシスの特異的阻害剤や鉄キレート剤によって抑制されたことからフェロトシスであることが確認された。さらに、このフェロトシスは mtROS 除去剤によっても抑制された。こうした結果から、レセプター依存的マイトファジーは mtROS を低く維持することで、フェロトシスから細胞を保護していると結論づけた(図 2)。

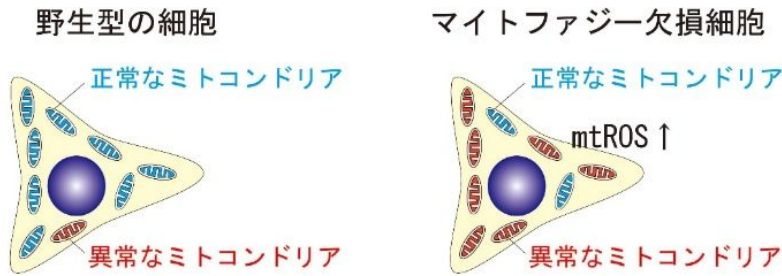


図 1 : マイトファジー欠損細胞ではミトコンドリアの機能低下と mtROS の上昇を認める

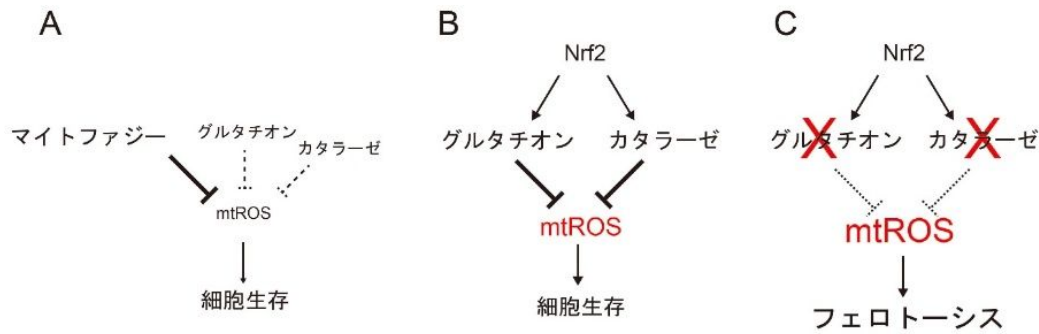


図 2 : マイトファジー欠損細胞では mtROS が上昇しているため、グルタチオンやカタラーゼを阻害するとフェロトーシスが誘導される

(2) マイトファジーレセプターの機能解析 (文献2)

BNIP3 と NIX がマイトファジー誘導時にどのように働いているかを解析するために、福島県立医大の和栗教授と共同研究で、HeLa 細胞 (野生型および DRP1_KO 株) におけるマイトファジー誘導後の電子顕微鏡像 (光-電子相関顕微鏡法) を取得したところ、隔離膜はミトコンドリア外膜に近接したところに形成され、ミトコンドリア外膜に沿って、他の細胞質成分が入り込む余地がない程度に近接して伸長してると考えられる像が取得された (図3)。

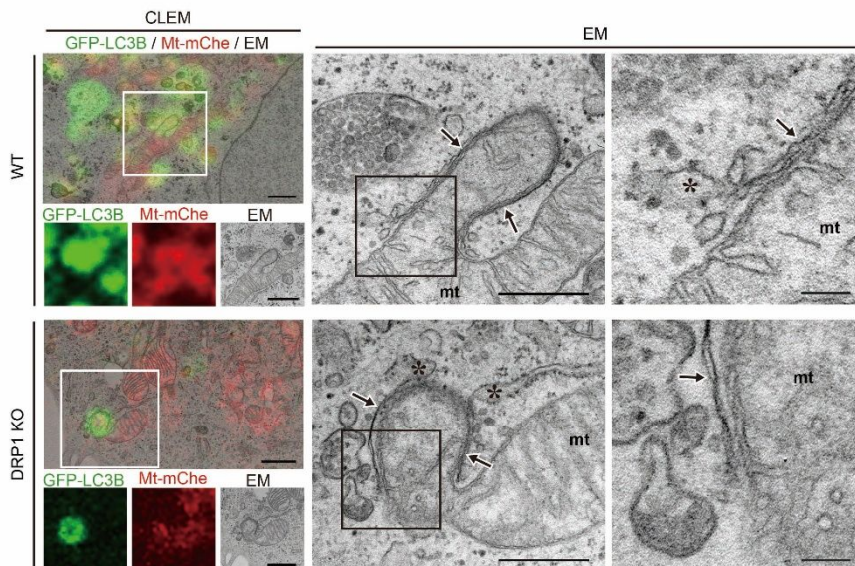


図 3 伸長過程の隔離膜とミトコンドリアとの関係

HeLa 細胞の野生型 (WT) およびミトコンドリア分裂因子 Drp1 破壊株 (DRP1 KO) において、隔離膜を GFP-LC3、ミトコンドリアを Mt-mCherry (ミトコンドリア移行シグナルが付いた mCherry) を発現することで可視化した。光-電子相関顕微鏡法を用いてマイトファジー誘導後に GFP-LC3 と Mt-mCherry が共局在する部位の電子顕微鏡画像を取得した。伸長中の隔離膜がミトコンドリア外膜上の密着しており、その部位のミトコンドリアがミトコンドリア本体から突出している像が得られた。

一方で、BNIP3/NIX_DKO 細胞では、ミトコンドリア上に小さな隔離膜（初期の隔離膜）が形成されるものの、ミトコンドリアに沿って伸長した隔離膜はほとんど認めなかった。蛍光顕微鏡観察では、野生型、BNIP3/NIX_DKO 株の両方においてオートファジー因子である GFP-ULK1 はマイトファジー誘導後にミトコンドリア上に集積した（図 4 A,B）。一方で、隔離膜の指標である GFP-LC3 は、マイトファジー誘導後に野生型ではミトコンドリア上に集積し、その輝点は強くなっていったが、BNIP3/NIX_DKO 株では、ミトコンドリア上に集積するが、その後、多くの場合において消失した（図 4 C,D,E）。これらのことから、BNIP3 と NIX はミトコンドリア上にオートファジー因子を集積する役割は持たないが、その後形成される初期の隔離膜を伸長させるのに必須であると考えられた。

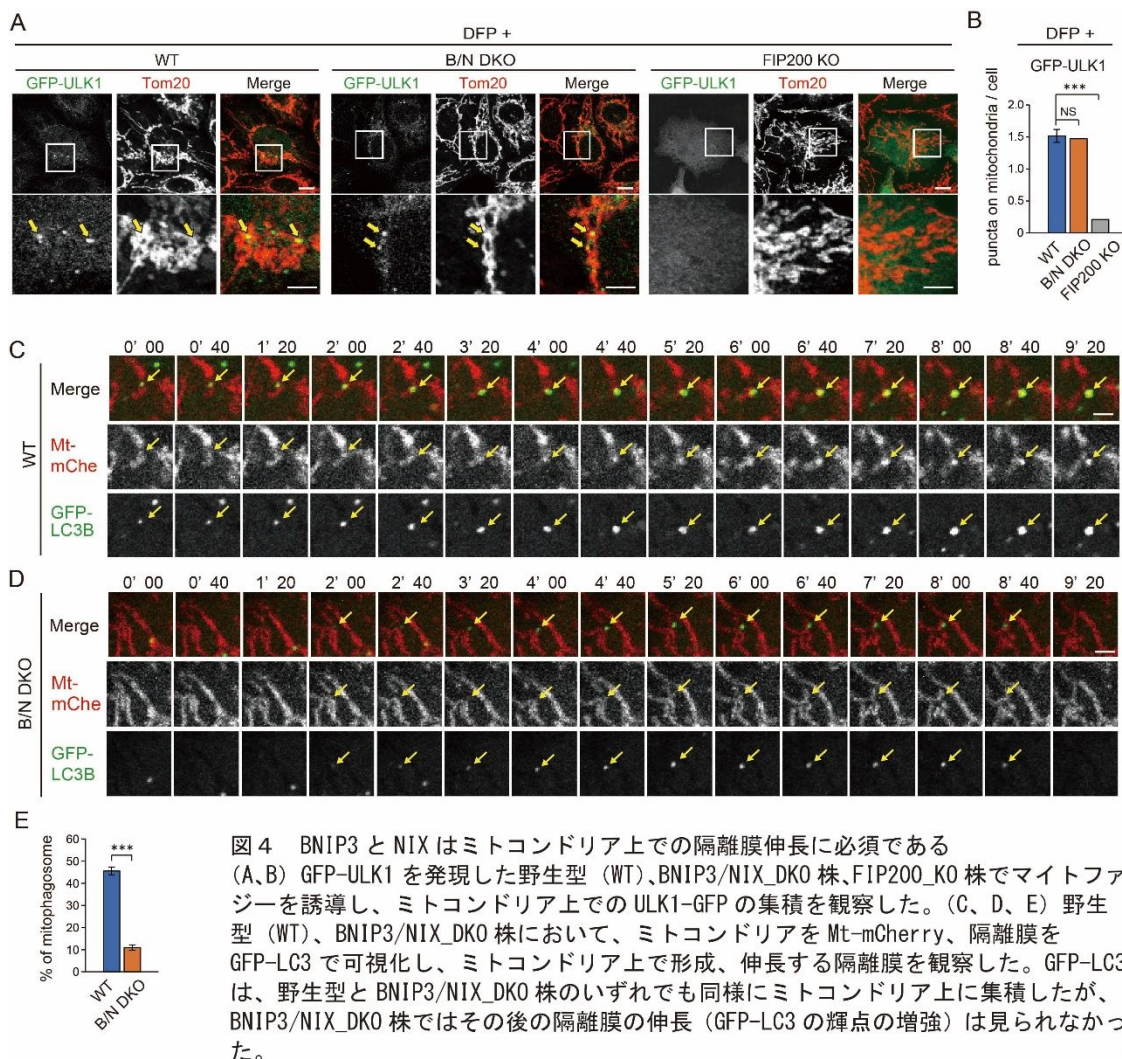


図 4 BNIP3 と NIX はミトコンドリア上での隔離膜伸長に必須である (A,B) GFP-ULK1 を発現した野生型 (WT)、BNIP3/NIX_DKO 株、FIP200_KO 株でマイトファジーを誘導し、ミトコンドリア上での ULK1-GFP の集積を観察した。(C、D、E) 野生型 (WT)、BNIP3/NIX_DKO 株において、ミトコンドリアを Mt-mCherry、隔離膜を GFP-LC3 で可視化し、ミトコンドリア上で形成、伸長する隔離膜を観察した。GFP-LC3 は、野生型と BNIP3/NIX_DKO 株のいずれでも同様にミトコンドリア上に集積したが、BNIP3/NIX_DKO 株ではその後の隔離膜の伸長 (GFP-LC3 の輝点の増強) は見られなかった。

次に、BNIP3/NIX_DKO 株において、人為的にミトコンドリア外膜に発現させた外来性の膜タンパク質と LC3 を結合させるとマイトファジーの回復が確認できた (データ未掲載)。さらに、ミトコンドリア上での隔離膜伸長と同時に、BNIP3 や NIX が隔離膜伸長の場面に集積していることも確認できた (データ未掲載)。こうしたことから、BNIP3 と NIX のマイトファジーにおける役割は、隔離膜とミトコンドリアを繋ぎ止め、隔離膜の伸長に寄与することであると結論付けた (図 5)。

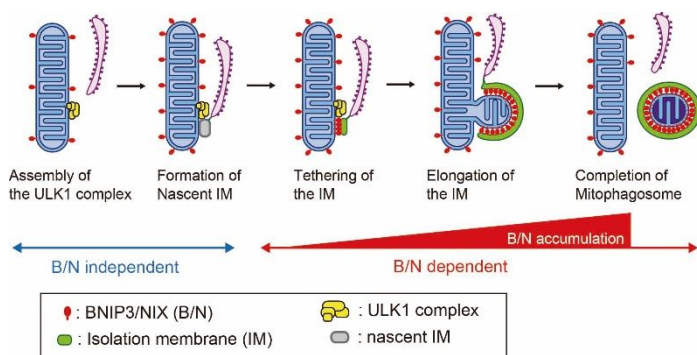


図 5 マイトファジー誘導における BNIP3 と NIX の役割
マイトファジーが誘導されると、ミトコンドリア上にオートファジー因子である ULK1 複合体が集積し、初期の隔離膜が形成される。この過程に BNIP3 や NIX は必ずしも必要ではない。隔離膜が伸長するにに合わせて、BNIP3 と NIX は隔離膜伸長部位に集積し、ミトコンドリアと隔離膜を強く繋ぎ止める。隔離膜伸長が進むと、ミトコンドリアの一部が隔離膜内に収まる形で突出し、最終的にはミトコンドリアの一部が切断されミトコンドリアを包み込んだオートファゴソームが形成される。

<引用文献>

(1) Yamashita et al. Mitophagy mediated by BNIP3 and NIX protects against ferroptosis by downregulating mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Death Differ.* 2024;31(5):651-661.

(2) Yamashita et al. The mitophagy receptors BNIP3 and NIX mediate tight attachment and expansion of the isolation membrane to mitochondria. *J Cell Biol.* 印刷中

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamashita Shun-ichi, Sugiura Yuki, Matsuoka Yuta, Maeda Rae, Inoue Keiichi, Furukawa Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Chan David C., Kanki Tomotake	4. 巻 -
2. 論文標題 Mitophagy mediated by BNIP3 and NIX protects against ferroptosis by downregulating mitochondrial reactive oxygen species	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Death and Differentiation	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) 10.1038/s41418-024-01280-y	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 該当する
1. 著者名 Aoyagi Kyota, Nishiwaki Chiyono, Nakamichi Yoko, Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake, Ohara-Imaizumi Mica	4. 巻 14
2. 論文標題 Imeglimin mitigates the accumulation of dysfunctional mitochondria to restore insulin secretion and suppress apoptosis of pancreatic β -cells from db/db mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific 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) 10.1038/s41598-024-56769-w	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 -
1. 著者名 Fukuda Tomoyuki, Saigusa Tetsu, Furukawa Kentaro, Inoue Keiichi, Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake	4. 巻 19
2. 論文標題 Hva22, a REEP family protein in fission yeast, promotes reticulophagy in collaboration with a receptor protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 2657 ~ 2667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2023.2214029	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 -
1. 著者名 Aoyagi Kyota, Yamashita Shun-ichi, Akimoto Yoshihiro, Nishiwaki Chiyono, Nakamichi Yoko, Udagawa Haruhide, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Kanki Tomotake, Ohara-Imaizumi Mica	4. 巻 66
2. 論文標題 A new beta cell-specific mitophagy reporter mouse shows that metabolic stress leads to accumulation of dysfunctional mitochondria despite increased mitophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 147 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-022-05800-8	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 -

1. 著者名 Ginevskaia Tamara, Innokentev Aleksei, Furukawa Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Hayatsu Manabu, Yamashita Shun-ichi, Inoue Keiichi, Shibata Shinsuke, Kanki Tomotake	4. 巻 176
2. 論文標題 Comprehensive analysis of non-selective and selective autophagy in yeast <i><i>atg</i></i> mutants and characterization of autophagic activity in the absence of the Atg8 conjugation system	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 217 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvae042	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 -

1. 著者名 Furukawa Kentaro, Hayatsu Manabu, Okuyama Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Yamashita Shun-ichi, Inoue Keiichi, Shibata Shinsuke, Kanki Tomotake	4. 巻 20
2. 論文標題 Atg44/Mdi1/mitofissin facilitates Dnm1-mediated mitochondrial fission	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 2314 ~ 2322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2024.2360345	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 Fukuda Tomoyuki et al.	4. 巻 83
2. 論文標題 The mitochondrial intermembrane space protein mitofissin drives mitochondrial fission required for mitophagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 2045 ~ 2058.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2023.04.022	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tomotake Kanki
2. 発表標題 Atg44 drives mitochondrial fission required for mitophagy
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神吉智丈
2. 発表標題 マイトファジーとミトコンドリア形態の関連
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神吉智丈
2. 発表標題 ミトコンドリア形態変化とマイトファジー
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomotake Kanki
2. 発表標題 Mitochondrial fission and mitophagy
3. 学会等名 OIST x SUNTORY Joint Conference (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古川健太郎、神吉智丈
2. 発表標題 Mitofission/Atg44による ミトコンドリア分裂機構
3. 学会等名 第16回 オートファジー研究会, 第1回 国際先導研究リトリート
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 神吉 智丈
2. 発表標題 ミトコンドリアオートファジーと疾患・老化制御
3. 学会等名 第24回 日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tomotake Kanki
2. 発表標題 BNIP3/NIX-mediated mitophagy in HeLa cells
3. 学会等名 5th Sino-Japan Symposium on Autophagy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古川健太郎、早津学、奥田健太郎、芝田晋介、神吉智丈
2. 発表標題 新規ミトコンドリア分裂因子MitofissinはDnm1と協調することでミトコンドリアを分裂する
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学大学院医歯学総合研究科機能制御学分野
<https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>
 新潟大学大学院医歯学総合研究科機能制御学分野
<https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

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
研究分担者	井上 敬一 (Inoue Keiichi) (30396981)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	山下 俊一 (Yamashita Shun-ichi) (30529095)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	福田 智行 (Fukuda Tomoyuki) (90415282)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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			
米国	California Institute of Technology			