

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657138

研究課題名(和文)再構成系を用いたミトコンドリア分裂機構の解析

研究課題名(英文)The mechanism of Drp1-dependent mitochondrial fission

研究代表者

三原 勝芳(Mihara, Katsuyoshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：40029963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア(Mt)は融合と分裂によって頻繁に構造を変化させる。融合には外膜のMfn1, Mfn2と内膜のOPA1が、分裂には細胞質のDrp1が関与している。今回はDrp1がMtに集積して分裂を実行する過程を解析し(1)分裂には外膜Mffに加えMid49, Mid51がDrp1受容体として機能するがMffが最も主要な受容体であることを明らかにした。(2)Mff-KOマウスを作成。Drp1-KOマウスよりも早く初期胚で死亡する。受容体機能に加え重要な機能を持つことが推測された。(3)Drp1がmtDNA分配に関連する、心筋の配列形成に必須である、肝臓での欠失はNASHを発症することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria participate in a variety of physiologic processes such as the ATP production and apoptosis. Mitochondria dynamically change morphology through fusion and fission and high MW GTPases Mfn1 and Mfn2 of outer membrane and OPA1 of inner membrane are involved in fusion, whereas cytoplasmic Drp1 regulates fission. Here, (1) Since outer membrane proteins Mff, Mid49 and Mid51 function as the Drp1 receptor, we analyzed relative importance of these receptors and found that Mff as the major Drp1 receptor. (2) We have generated Mff-KO mice; they were embryonic lethal (E6.5). Considering that Drp1-KO mice are lethal at E12.5, Mff seems to have important developmental function in addition to the Drp1-receptor function. Furthermore, we have demonstrated that (3) Drp1 is involved in segregation of mitochondrial nucleoids, Drp1 is essential for making correctly arranged heart muscle fibers, and knockout of liver Drp1 induced NASH phenotype in high fat diet-fed rats by the ER stress.

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：ミトコンドリア ミトコンドリア分裂 ミトコンドリア融合 Drp1 Mff Mid49 Mid51

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは外膜・内膜2枚の膜に囲まれ細胞に置ける好氣的 ATP 産生、アポトーシス、カルシウムシグナル伝達などに関わる真核細胞必須のオルガネラであり、状況に応じて分裂と融合を介して極めてダイナミックに形態を変化させて機能変換を図る。哺乳類ではこの反応に4種類の高分子量GTPaseが関与している。融合に関わる外膜のMfn1、Mfn2と内膜のOPA1、分裂に関わる細胞質局在のDrp1である。本計画申請当初は細胞質のDrp1がミトコンドリア上に集積して膜を分裂させる機構と各組織に於けるミトコンドリア分裂反応の生理的意義は不明であった。

2. 研究の目的

細胞にアポトーシスを誘発すると細胞質に局在したDrp1がミトコンドリアに集積し、ミトコンドリアの分裂を伴ってアポトーシス実施の鍵となるcytochrome cのミトコンドリア膜間部からの遊離が起る。これを指標にしてDrp1によるミトコンドリア分裂の調節機構の詳細を明らかにする。また呼吸系の脱共役剤CCCP処理ではアポトーシスを伴わずにDrp1によるミトコンドリア分裂が起るがこの過程も比較解析する。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞ならびにその細胞から調製したミトコンドリアを用いてアクチノマイシン処理を重ねた後に継時的Drp1の集積とcytochrome cの遊離を観測。これに我々が明らかにした外膜因子Mffならびにその後国外から報告されたMid49、Mid51の発現を抑制したミトコンドリアを使ってDrp1の集積過程を解析し受容体の機能分担を明らかにする。また、組織特異的Drp1KOマウスを作成して組織に於けるミトコンドリア分裂の生理的意義を明らかにする。

4. 研究成果

細胞レベルでの解析に時間を要し単離ミトコンドリアを用いたin vitroの解析が進まなかったが、以下の事柄を明らかにしてミトコンドリアダイナミクス研究分野に寄与することができた。

a. MffとMid51はDrp1受容体として独立して機能しかつ他の受容体に比べてMffがミトコンドリア分裂に高い寄与を示すことを明らかにした。

b. 従来Drp1の受容体と考えられていたFis1がミトコンドリア分裂には関与しないことを明らかにした。のみならずFis1に特異的に結合するRab-GAP因子TBC1D15を同定することが出来た。

c. 分裂因子Drp1の発現を抑制するとミトコンドリアの末端が膨潤することを見だし、それがミトコンドリアDNAの凝集に起因することからDrp1によるミトコンドリア分裂が

ミトコンドリアDNAの分配を調節していることを明らかにした。

d. 全身Mff-KOマウス作成に成功した。マウスは胎生6.5日で死亡しDrp1-KOマウス(胎生12.5日にて死亡)よりも強い効果を示すことからMffはDrp1受容体機能のほかに細胞分化の初期過程で重要な機能を持っていることが推定された。現在神経特異的Mff-KOマウスの解析が進行中である。

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6件)

Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. R. Ban-Ishihara, T. Ishihara, N. Sasaki, K. Mihara and N. Ishihara (2013) **Pros. Natl. Acad. Sci. USA**, 110, 11863-11868.

New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. H. Otera, N. Ishihara, and K. Mihara. **Biochim. Biophys. Acta**, 1833(5) 1256-1268 (2013)

Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology. K. Onoue, A. Jofuku, R. Ban-Ishihara, T. Ishihara, M. Maeda, T. Koshiba, T. Itoh, M. Fukuda, H. Otera, T. Oka, H. Takano, N. Mizushima, K. Mihara and N. Ishihara. **JCS** 126 (pt 1) 176-185 (2013) doi:10.1242/jcs.111211.

PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. K. Okatsu, T. Oka, M. Iguchi, K. Imamura, H. Kosako, N. Tani, M. Kimura, E. Go, F. Koyano, M. Funayama, K. Shiba-Fukushima, S. Sato, H. Shimizu, Y. Fukunaga, H. Taniguchi, M. Kamatsu, N. Hattori, K. Mihara, K.

Tanaka, and N. Matsuda. **Nature Communications**, **3:1016**. Doi: 10.1038/ncomms2016 (2012) pp. 1-10

Regulation and physiologic function of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. N. Ishihara, H. Otera, T. Oka, and K. Mihara (2012) Invited Forum Review Article. **Antioxid. Redox Signal.** **17**: PMID: 22871170 (2012, Oct 1) pp.1-11

Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. H. Otera and K. Mihara (2012) Invited Review Article. **International Journal of Cell Biology**, 2012: 821676 doi: 10.1155/2012/821676 (2012, May 22) pp.1-10

Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. H. Otera and K. Mihara (2011) Invited Review Article. **Small GTPases**, 2(3), 167-172 (2011).

〔学会発表〕(計 7件)

The Mechanism and physiological Significance of Drp1-dependent Mitochondrial Fission in Mammals (2013) Invited Talk in The 2013 International Symposium on Mitochondrial Dynamics in Translational Medicine & 2013 Annual Meeting of Mitochondrial Research and Medicine (TSMRM), September 7, 2013, Taipei Medical University, Taiwan

Mechanism and Regulation of Mitochondrial Fission in Mammalian Cells. K. Mihara, Invited Talk in The International Symposium on Mitochondria 2013, Nov 6-7, Roppongi, Tokyo, Japan

Mechanism and Physiologic Significance of Drp1-dependent Mitochondrial Fission in Mammals. K. Mihara. Plenary Lecture in The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria: from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Diseases. Okinawa, October 28–November 1 (2013).

「ミトコンドリア分裂の制御機構とその障害」三原勝芳 (2012) 特別講演 in The 12th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-Mit). 筑波大学、Dec 20 (2012).

The mechanism and physiological significance of Drp1-dependent mitochondrial fission in mammals. K. Mihara (2012) Invited talk in The 9th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine & The 5th Conference of Chinese Society of Mitochondrial Research and Medicine. November 2-5 (2012)

細胞の生と死をつかさどる小器官ミトコンドリア-機能、形成、動態とその障害」三原勝芳 独創的発想に富む科学者育成プログラム「出る杭を伸ばすヘリックスプロジェクト」採択事業 | 七人の侍による記念講演会、平成 2012 年 10 月 24 日 秋田ビューホテル

ミトコンドリア融合・分裂の分子機構と生理機能、三原勝芳 (2012) グローバル COE プログラム理医連携特別講演会-独創的研究の世界発信を続ける「七人の侍」- | 2012 年 2 月 29 日 | 九州大学コラボステーション 1 視聴覚ホール

〔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 1件)

名称: Drp1 欠損非ヒトほ乳動物

発明者: 三原勝芳、石原直忠

権利者: 株式会社 ジェンテック

種類:

番号: 特願 2007-298224

取得年月日: 平成 25年7月5日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原勝芳(九州大学名誉教授)

研究者番号: 40029963

(2) 研究分担者

岡 敏彦(九州大学医学研究院准教授)

研究者番号: 40263321

(2) 研究分担者

大寺秀典(九州大学医学研究院助教)

研究者番号: 40380612

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号: