

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440088

研究課題名(和文)ミトコンドリア膜切断反応における分裂サイト形成・解離の制御機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of mitochondrial fission

研究代表者

大寺 秀典(Otera, Hidenori)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40380612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの分裂はDrp1により実行され、その膜レセプターとしてMffとMiD49/51の2種が報告されています。Mff-KO細胞において、アポトーシスに伴いチトクロムCは放出されますが、MiD49/51-KO細胞では阻害されていました。Mff-KO細胞ではアポトーシスに伴うクリステ構造変化が見られるものの、MiD49/51-KO細胞では確認されませんでした。MiD49/51-KO細胞においても、クリステ構造変化の律速となるOPA1複合体の解離が見られました。アポトーシスにおけるクリステ構造変化には、MiD49/51を介したDrp1依存的ミトコンドリア分裂が律速となることを解明しました。

研究成果の概要(英文)：Here, we analyzed the functional division of mitochondrial fission receptors with their knockout (KO) cell lines. In marked contrast to Mff-KO cells, MiD49/MiD51-KO and Drp1-KO cells completely resisted cristae-remodeling and cytochrome c release during apoptosis. This phenotype in MiD49/51-KO cells, but not Drp1-KO cells, was completely abolished by treatments that disrupt cristae morphology, such as OPA1-depletion. Unexpectedly, OPA1 oligomers generally thought to resist cytochrome c release by stabilizing the cristae structure were similarly disassembled in both types of cells, revealing that the Drp1-MiD49/51 system limits cristae remodeling. Together, these results indicate that Drp1-dependent mitochondrial fission through MiD49 and MiD51 is epistatic to cristae-remodeling through disassembly of OPA1 oligomers and functions as an essential gatekeeper for intrinsic apoptosis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア アポトーシス オルガネラ形態

## 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスの異常は、癌・自己免疫疾患・神経変性疾患など多くの疾患発症の要因となります。これまでアポトーシス制御の分子機構は、ミトコンドリア外膜に存在する Bcl-2 ファミリータンパク質の機能解析を中心に進められてきました。ミトコンドリアはエネルギー産生器官としての役割のほか、アポトーシス制御に中心的な役割を果たす細胞の生と死の両面を制御するオルガネラです。ミトコンドリアは分裂・融合によりその形態をダイナミックに変化させていますが、アポトーシスが誘導されると分裂が亢進して断片化します。分裂を阻害するとアポトーシス耐性となることが知られていますが、アポトーシスに際して、ミトコンドリアの分裂がどのような役割を持つのかは不明のままです。

ミトコンドリアはクリステと呼ばれる特有の内膜構造を持っています。近年、MICOS 複合体 (mitochondrial contact site and cristae organizing system) が、外膜と内膜の接触部位 (contact site) を形成するほか、クリステ膜のくびれ形成にも関わるということが明らかになってきました。内膜の陥入部位は OPA1 複合体により形成されるクリステジャンクション (CJ: Crista Junction) によって閉じられ、その他の膜間スペース領域とは隔離されています。

DNA 損傷や抗癌剤などの刺激に応じて、クリステ内部に貯留されるチトクロム C が Bax/Bak により形成される外膜孔を介して細胞質へ放出され、カスパーゼ経路が活性化されることによりアポトーシスが始まります。チトクロム C の放出には外膜孔の形成だけでは不十分であり、CJ 開放を伴うクリステ構造変化 (Cristae remodeling) が必須と考えられています。ところが、クリステ構造再編の仕組みとその制御機構は不明のままです。

## 2. 研究の目的

分裂反応に関しては、分裂実行因子 Drp1 (GTPase) がミトコンドリア膜に巻き付いて切断する。申請者は、外膜タンパク質 Mff が DRP1 リクルートに必須な膜レセプターであることを明らかにした。翌年、類似の機能を持つ MiD51 が新たに同定されたが、「DRP1 膜レセプターが 2 つ存在する生理的意義と作用機構」は不明である。

申請者は、Mff が Drp1 の GTP 加水分解を促進すること、それとは反対に、MiD51 は GTP 結合型 Drp1 に作用し、その加水分解を抑制して自己会合 (self-assembly) を安定化させることを見いだしている。以上のことから申請者は、( 1 ): Mff による Drp1 のリクルート、( 2 ): MiD51 による Drp1 自己会合 (self-assembly) 促進による分裂サイトの形成、( 3 ): GTP 加水分解に伴う Drp1 高次構造変化と膜切断、という分子機構モデルを考えている。ところが、MiD51 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されてきたが、その分裂における役割は依然として不明のままである。

そこで本研究では、Mff、MiD49/51 による分裂サイトの形成・制御における役割を解明し、哺乳動物細胞におけるミトコンドリア膜分裂機構の分子基盤解明を目指す。

## 3. 研究の方法

Mff と MiD49/51 の生理機能の違いを調べるため、ゲノム編集技術として用いられる CRISPR/CAS9 システムによって、ミトコンドリア分裂に関わる因子の遺伝子欠損 (KO) 細胞 (HeLa) を作製して、ミトコンドリア分裂におけるそれぞれの役割分担について細胞生物学的解析を行うと同時に、アポトーシス応答性を検討した。

## 4. 研究成果

CRISPR 法により DRP1 レセプターノックアウト (KO) 細胞を作製・解析して、Mff と MiD49/51 (MiD システム) は互いに独立した分裂システムを構成することを証明しました。アポトーシス誘導時、MiD49 KO と MiD51 KO 細胞ではチトクロム C の放出が顕著に阻害されていました。MiD49/51 二重欠損 (DKO) 細胞ではほぼ完全にチトクロム C の放出は阻害されました。一方、Mff KO 細胞ではこのような阻害は認められません。MiD49/51 DKO 細胞では、( 1 ) Smac/DIABLO など、その他の膜間スペース因子は正常に放出されること、( 2 ) アポトーシス誘導時に通常見られる膨潤を伴うクリステ再編が起きないこと、( 3 ) DRP1 リクルート活性を失った MiD51 変異体は相補活性を持たないことを明らかにしました。以

上の結果は、MiDシステムによる Drp1 のリクルートがアポトーシスにおける CJ 開放を伴うクリステ構造の再編に重要であることを示しています。

#### 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)

Otera H, Miyata N, Kuge O, Mihara K.  
Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling.  
*J. Cell. Biol.* Feb 29;212(5):531-544 (2016)  
doi: 10.1083/jcb.201508099

Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, Koshihara T.  
Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity.  
*Nat Commun.* Aug 20(5):4713 (2014).  
doi: 10.1038/ncomms5713

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.* Jan 1;126(Pt 1):176-185 (2013).  
doi: 10.1242/jcs.111211

Otera H, Ishihara N, Mihara K.  
New insight into the mechanism and physiologic function of mitochondrial fission.  
*Biochim Biophys Acta.* May;1833(5):1256-1268 (2013).  
doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.002

Ishihara N, Otera H, Oka T, Mihara K.  
Regulation and physiologic function of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals.  
*Antioxid Redox Signal.* Aug 1;19(4):

389-399 (2013).  
doi: 10.1089/ars.2012.4830

〔学会発表〕(計7件)

大寺秀典, 三原勝芳, 宮田暖, 久下理  
MiD49 と MiD51 を介した Drp1 依存的ミトコンドリア分裂によるクリステ構造変化とシトクロム C 放出制御  
BMB2015 ポスター (2015) 神戸

吉住拓馬, 一戸猛志, 大寺秀典, 三原勝芳, 小柴琢巳  
A 型インフルエンザウイルスタンパク質 PB1-F2 とミトコンドリアの相互作用による抗ウイルス自然免疫応答への影響  
BMB2015 神戸

大寺秀典, 三原勝芳, 宮田暖, 久下理  
哺乳動物に備わる2つのミトコンドリア分裂システムとアポトーシスにおける役割の違い  
第15回日本ミトコンドリア学会年会 口頭発表 (2015) 福井

嶋田信吾, 王麗香, 武市幸奈, 大寺秀典, 高柳涼一, 三原勝芳, 野村政壽  
Mitochondrial fission factor (Mff)遺伝子欠損マウスの表現型解析  
日本内分泌学会 (2015) 東京

Otera H, Mihara K  
The mechanism and physiological significance of Drp1-dependent mitochondrial fission in mammals.  
Progress 100: Kyushu University and Stanford University Joint Research and Education Program From Genes to Human Diseases (2015) Fukuoka

大寺秀典, 三原勝芳  
ミトコンドリア分裂における Drp1 のリクルート機構  
日本分子生物学会大会(2014) 横浜

〔図書〕(計3件)

Mihara K, Otera H.  
Mitochondrial dynamics: Molecular mechanism and physiologic functions of mitochondrial fusion and fission.  
*Encyclopedia of Cell Biology.* Vol.2, pp. 279-292 (2016).

大寺秀典

「テイルアンカー型タンパク質のミトコンドリアへの輸送・挿入機構」  
細胞工学 Vol.32 No.8 (2013)

( )

研究者番号：

Ramanujan S. Hegde, (翻訳:板倉英祐、大寺秀典)  
「テイルアンカータンパク質の小胞体膜への挿入経路」  
細胞工学 Vol.32 No.8 (2013)

〔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/app/modules/information/detail.php?i=844&c=10>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大寺 秀典 (OTERA, Hidenori)  
九州大学・大学院医学研究院・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