

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840039

研究課題名(和文) 栄養センサーAMPキナーゼによるミトコンドリア形態制御機構の解析

研究課題名(英文) The molecular mechanisms of mitochondrial morphology by energy sensor AMPK.

研究代表者

満島 勝 (Mitsushima, Masaru)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40621107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究代表者はグルコース飢餓条件化においてミトコンドリアの形態が栄養センサーとして知られるAMPキナーゼに依存してダイナミックに変化することを先の研究で見出した。本研究課題では、その制御メカニズムを明らかにするため、基質分子の網羅的解析を行った。結果、ミトコンドリア分裂促進因子Mffを新規基質として同定し、S155がリン酸化部位であること、そのリン酸化が正常な機能に重要であることを明らかにした。しかしながら、海外のグループにより同様の研究成果が先んじて報告されてしまったため、論文発表には至れなかった。現在同網羅的解析で同定できた別の基質に関しても解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, the shape of mitochondria are dramatically changed under the glucose-deprived condition in an AMPK-dependent manner. The aim of this study is to identify the mechanisms that determine the mitochondrial morphology. We sought for novel substrate of AMPK, which locates on mitochondria, using LC/LC-MS. In the present study, I could identify several novel substrate for AMPK on mitochondria, including Mff. Mff is known to promote the fission of mitochondria. Mutational analysis revealed that S155 on Mff is mainly phosphorylated by AMPK and that this phosphorylation is important for proper function of Mff. Unfortunately, however, foreign investigators have published the similar findings during I was preparing the paper. Now, we are making efforts to characterize the other candidates we have identified.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ダイナミクス リン酸化 AMPK Mff Drp-1

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内のほぼ全てのATPを合成、供給するオルガネラであり、細胞の生存、増殖、分化、運動など様々な細胞運命の決定に加え、アポトーシスの実行に関与することで細胞死の制御にも関わる、細胞の生と死を共に制御するオルガネラである。さらに、ミトコンドリアは小胞体と同様にCa²⁺を貯蔵し、細胞内のCa²⁺濃度を制御することで、Ca²⁺を介した様々なシグナル伝達系の制御に関与する。また、ミトコンドリア内のATP合成に関与するTCA回路や電子伝達系、酸化系の多くの酵素がCa²⁺によって活性化調節されていることが分かっており、Ca²⁺調節は細胞内シグナル伝達とミトコンドリア内酵素活性調節に非常に重要である。これらの生命現象を行うため、ミトコンドリアは細胞の取り巻く環境に適応するように適切な量のエネルギー源を供給しなければならないと考えられるが、これまでにミトコンドリアがいかにかそれらをセンシングし、ATP合成系を調節しているかはほとんど分かっていない。これまでの研究において、グルコース飢餓条件下でミトコンドリアが大きく形態を変化させ、それが栄養センサー分子AMPキナーゼに依存していることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

ミトコンドリアは細胞のATP生産を行う重要なオルガネラであり、その機能異常は癌や神経疾患、糖尿病など様々な病態に関わるとされている。近年、ミトコンドリアは細胞の置かれた状況に応じて非常にダイナミックに形態や局在を変化させることが分かってきた。本研究では、ミトコンドリアの形態や局在を制御する新規なシグナル伝達経路を明らかとするため、AMPキナーゼのミトコンドリア基質を明らかとし、その結果として如何にして細胞が栄養要求に対応するためATP合成系を制御するかを明らかにし、その破綻が様々な疾患に寄与するかを検討することを目的としている。

3. 研究の方法

ミトコンドリアの形態がグルコース飢餓時に大きく変化する分子メカニズムを解明するため、2デオキシグルコース存在下、非存在下の細胞よりミトコンドリアを生成し、ミトコンドリアタンパク質を抽出し、AMPキナーゼの基質認識抗体で免疫沈降し、質量分析装置でタンパク質を同定する。同定されたタンパク質のミトコンドリア形態制御とミトコンドリアのエネルギー生産における機能、さらにはAMPキナーゼによるリン酸化がそれらの機能にどのような影響を及ぼすかを細胞レベルで明らかにする。

4. 研究成果

予備実験結果より、AMPKの活性化条件下、ミトコンドリアの局在と形態が変化すること、低速遠心による粗ミトコンドリア画分にAMPキナーゼの基質分子と考えられるリン酸化タンパク質を確認していた。そこで、ミトコンドリアの純度を上げるため、粗ミトコンドリア画分をシヨ糖密度勾配を用いた超遠心により精製し、AMPキナーゼの基質のリン酸化を検出する抗体で確認したところ、AMPキナーゼの活性依存的なタンパク質のリン酸化を確認した。そのサンプルを免疫沈降法により濃縮し、LC/LC-MS解析を行ったところ、複数のタンパク質を同定することに成功した(図1)。さらに、同定タンパク質の中には複数のリン酸化ペプチドも含まれていた。また、今回の質量分析解析では既知のミトコンドリアタンパク質が同定されていたため、ミトコンドリアの精製がうまくいっていることが確認できた。本研究では、ミトコンドリア形態制御に関与

する分子の同定が一つの目標であるので、質量分析解析より同定されたタンパク質のうち、リン酸化ペプチドが含まれていたMffという分子に着目した。Mffはミトコンドリア分裂促進因子であるDrp-1の

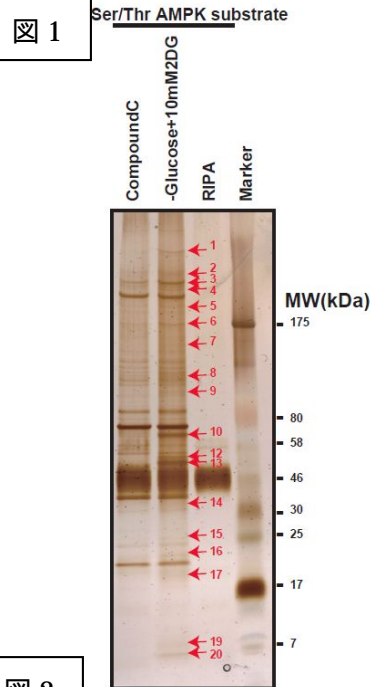
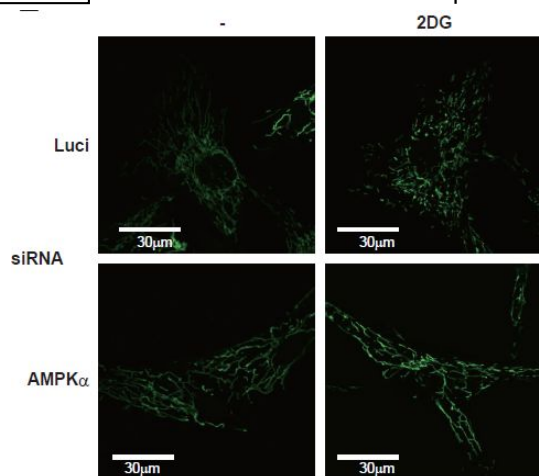
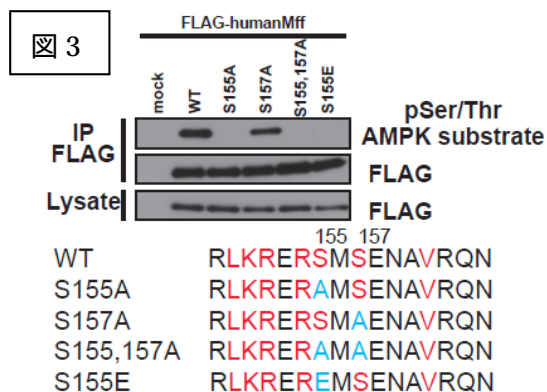


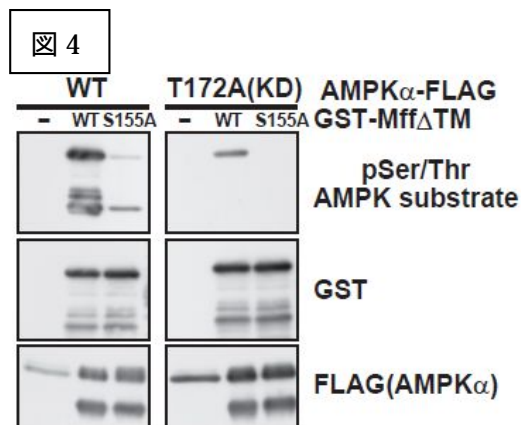
図 2



受容体として機能することが分かっている。グルコース飢餓条件においてMffはリン酸化されたが、AMPK阻害剤CompoundCやAMPキナーゼをsiRNAでノックダウンするとMffのリン酸化が減少し、ミトコンドリアのグルコース飢餓に対する応答も抑制された(図2、3)ことから、グルコース飢餓条件下においてAMPキナーゼ依存的にMffがリン酸化されることが明らかになった。

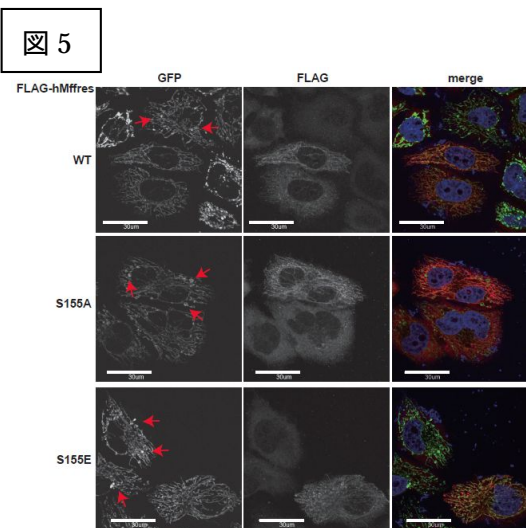


更に、精製タンパク質を用いたin vitro キナーゼアッセイによりMffが直接AMPキナーゼによってリン酸化される事、点変異体を用いた解析からMffの155番目のセリン残基がAMPKによってリン酸化されることを明らかにした(図4)。



予想とは反してMffの非リン酸化型変異体、偽リン酸化変異体を作製してDrp-1との相互作用を確認したところ、どの変異体も野生型と同程度に相互作用が確認でき、また、細胞染色によってDrp-1のミトコンドリアへの局在に変化は確認できなかった。一方、siRNAによって内在性のMffをノックダウンすると、大きな塊の点在するミトコンドリアが観察され、野生型のMffを入れ戻すと、部分的に解消されたが、リン酸化できない変異体を入れ戻してもそれが確認できなかった(図5)。また、それぞれの変異体のタンパク質としての安定性を検討したところ、非リン酸化型の安定性が低いことが分かった。つまり、AMPKはグルコース飢餓条件になると、Mffをリン酸化し安定化し、Drp-1依存的なミトコンドリア分裂を促進

していることが示唆された。本研究を遂行途中で海外のグループによってAMPKの新規基質とMffが報告(Ducommun et al., Cell Signal, 2015)され、論文作成時に別の海外のグループによってエネルギーストレス時にAMPKによってMffのS155(ヒトの129に相当)がリン酸化されることがミトコンドリアの分裂に重要であることを報告(Toyama et al., Science 2016)してしまったため、論文としての報告ができなかった。現在はMff以外に同定したRalGAP1、FCHO2に関して実験を詰めている。



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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

満島 勝 (MITSUSHIMA MASARU)
国立国際医療研究センター研究所・糖尿病
研究センター・上級研究員
研究者番号：40621107

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()