

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23822

研究課題名(和文)ミトコンドリアオートファジーは老化を制御するのか？

研究課題名(英文)Mitochondrial Autophagy in Aging

研究代表者

井上 敬一(Inoue, Keiichi)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：30396981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトファジー(ミトコンドリアのオートファジー分解)は、傷害を受けたミトコンドリアを分解することにより老化に関与すると考えられている。しかしながらミトファジーと老化の関連やそのメカニズムは不明であった。申請者は、ミトファジー活性の加齢にともなう変化が老化を制御していると考え、ミトファジーモニターマウスとそこから単離した培養細胞を用いてそれを検証した。具体的には、(1)老化過程におけるミトファジー活性の変化や相関、(2)老化に対するミトファジー活性の影響を解析した。本研究では、老化過程におけるミトファジーの関わりを解明し、老年性疾患を抑制するターゲットの提示をした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトファジー(ミトコンドリアのオートファジー分解)は、傷害を受けたミトコンドリアを分解する。老化にともない傷害されたミトコンドリアが増加することから、老化の過程においてミトファジー活性は低下していると考えられてきた。しかしながらミトファジーと老化の関連やそのメカニズムは不明である。本研究は、老化過程におけるミトファジーの関わりを明らかにし、そのメカニズムをの一端を解明した。また現在の超高齢社会において、健康寿命を延伸するための治療法開発の標的として、ミトファジーの活性調節がその候補となりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitophagy (autophagic degradation of mitochondria) is thought to be involved in aging process by degrading injured mitochondria. However, the relationship between mitophagy and aging and its mechanism remain unknown. The applicant believed that age-related changes in mitophagy activity regulate aging process, and verified it using mitophagy reporter mice and cells isolated from them. Specifically, (1) changes and correlations of mitophagy activity during the aging process, and (2) effects of mitophagy activity on aging will be analyzed. In this study, we elucidated the involvement of mitophagy in the aging process and aimed to present a target for suppressing senile diseases.

研究分野：病態生化学

キーワード：ミトファジー 老化 線維芽細胞 遺伝子改変マウス

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エネルギー分子 ATP を産生するが、その機能が低下すると活性酸素 ROS を量産し細胞に傷害を与える。こうしたミトコンドリアの機能低下は、個体の老化の原因のひとつと考えられている。ミトコンドリアオートファジー (以下、マイトファジー) は、機能低下したミトコンドリアをオートファジー・リソソーム分解経路により除去するシステムであり、老化の進行を抑制すると考えられているが、その実証には至っていない。

老年性の神経変性疾患のひとつであるパーキンソン病は、中脳黒質のドーパミン作動性神経細胞の変性脱落とレヴィー小体の沈着を病理学的特徴とする運動障害である。その原因遺伝子として同定された Parkin は、培養細胞を用いた研究では、マイトファジーを誘導することが報告されている。通常の細胞培養条件ではマイトファジーはほとんど観察されないが、ミトコンドリアの機能阻害などの負荷をかけると、Parkin に依存的にマイトファジーが誘導される。しかしながら Parkin 依存的なマイトファジーが生体内で実際に機能しているのか、そしてその異常は老化に関与しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが独自に開発したマイトファジーモニターマウスと、そこから単離した培養細胞を解析することで、老化の過程におけるマイトファジー活性の動態を明らかにする。さらに、マイトファジーが関わる老化の分子機構の解明と、老化遅延や老化関連疾患治療の標的の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 個体レベルでマイトファジー活性を観察・定量するために、ミトコンドリアに EGFP と mCherry の連結タンパク質を発現するマイトファジーモニターマウスを作製する (以下、モニターマウス)。このマウスでは、正常なミトコンドリアでは EGFP と mCherry の蛍光シグナルが見られるが、マイトファジーが起こるとリソソームで EGFP が優先的に分解されて mCherry のみのドット状の蛍光シグナルが見られる。

(2) 加齢したモニターマウスの各臓器のマイトファジー活性レベルを定量することで、加齢にともなうマイトファジー活性の変化を計測する。生後3カ月齢から 30 カ月齢までを解析対象とする。

(3) Parkin 遺伝子欠損マウス、ならびに独自に同定したマイトファジー制御遺伝子 X

の欠損マウス (CRISPR/Cas9 法により作製) し、それらの全身各臓器におけるマイトファジー活性レベルを定量比較する。

(4) 上記の Parkin 欠損マウスと X 欠損マウスの胎仔より胚性線維芽細胞を樹立し、7 代以上経代を重ねることで老化細胞を作成する。Parkin 欠損マウスと X 欠損マウス由来老化線維芽細胞におけるマイトファジー活性レベルを比較する。

4. 研究成果

(1) 作製したモニターマウスを詳細に解析したところ、マイトファジーが多く見られるとされている臓器では、多くの mCherry のみのドット状蛍光シグナルが見られた。これらの蛍光シグナルは、リソソームマーカーである LAMP1 と共局在することから、リソソームに取り込まれたミトコンドリアであることが確認された。また EGFP と mCherry 両方の蛍光シグナルが見られるものは、ミトコンドリアマーカーである TOM20 と共局在したことから、正常なミトコンドリアと確認された。さらに作製したモニターマウスの臓器ごとのマイトファジー活性を調べたところ、心臓、骨格筋、膵臓において高いマイトファジー活性を認めた。一方で脳や肝臓、脾臓では活性が低かった。モニターマウスに 24 時間絶食させると、心臓においてマイトファジー活性は著しく増加した。またその後通常飼育に戻すと、マイトファジー活性はもとに戻った。このことから作成したモニターマウスは、生体内のマイトファジー活性の動態の解析に利用できるものと考えられた。

(2) 生後3カ月から12カ月、21カ月、30カ月までのマイトファジーモニターマウスを用いて、各臓器におけるマイトファジー活性の経時的変化を調べたところ、心臓や膵臓において著しいマイトファジー活性の変動が見られた。一方、脳ではあまり大きな影響は見られなかった。

(3) Parkin 遺伝子欠損マウス、ならびに独自に同定したマイトファジー制御遺伝子 X の欠損マウスそれぞれと、モニターマウスを交配することで、各組織における Parkin と遺伝子 X のマイトファジー活性への影響を調べた。その結果、X 遺伝子欠損マウスの心臓や骨格筋では、マイトファジー活性が激減していた。一方、Parkin 遺伝子欠損マウスの心臓や骨格筋では、マイトファジー活性の変化は見られなかった。

(4) Parkin 遺伝子欠損マウス、ならびに X 遺伝子欠損マウスそれぞれと、モニターマウスを交配したマウスの胎仔から、線維芽細胞を単離し、継代により老化線維芽細胞を作製した。これらの細胞を用いて、マイトファジー活性の計測と遺伝子発現の変化を調べた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Igarashi Ryoko, Yamashita Shun-ichi, Yamashita Tomohiro, Inoue Keiichi, Fukuda Tomoyuki, Fukuchi Takeo, Kanki Tomotake	4. 巻 10
2. 論文標題 Gencitabine induces Parkin-independent mitophagy through mitochondrial-resident E3 ligase MUL1-mediated stabilization of PINK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1465 ~ 1465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58315-w	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 Chernyshova Kseniia, Inoue Keiichi, Yamashita Shun-ichi, Fukuchi Takeo, Kanki Tomotake	4. 巻 60
2. 論文標題 Glaucoma-Associated Mutations in the Optineurin Gene Have Limited Impact on Parkin-Dependent Mitophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3625 ~ 3625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27184	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 井上敬一、山下俊一、神吉智丈	4. 巻 37
2. 論文標題 哺乳類におけるミトコンドリアオートファジーの分子機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 58 ~ 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 神吉智丈、井上敬一	4. 巻 47
2. 論文標題 ミトコンドリアオートファジーと老化との関連	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FRAGRANCE JOURNAL	6. 最初と最後の頁 36 ~ 39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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, Ebi Yuki, Saigusa Tetsu, Furukawa Kentaro, Yamashita Shun-ichi, Inoue Keiichi, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Kanki Tomotake	4. 巻 9
2. 論文標題 Atg43 tethers isolation membranes to mitochondria to promote starvation-induced mitophagy in fission yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61245	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 Innokentev Aleksei, Furukawa Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Saigusa Tetsu, Inoue Keiichi, Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake	4. 巻 9
2. 論文標題 Association and dissociation between the mitochondrial Far complex and Atg32 regulate mitophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e63694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.63694	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 Yamashita Shun Ichi, Kyuuma Masanao, Inoue Keiichi, Hata Yuki, Kawada Ryu, Yamabi Masaki, Fujii Yasuyuki, Sakagami Junko, Fukuda Tomoyuki, Furukawa Kentaro, Tsukamoto Satoshi, Kanki Tomotake	4. 巻 in press
2. 論文標題 Mitophagy reporter mouse analysis reveals increased mitophagy activity in disuse induced muscle atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30404	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 Inoue Keiichi	4. 巻 in press
2. 論文標題 CRISPR-activated patient fibroblasts for modeling of familial Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.03.008	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------