

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291044

研究課題名(和文) 哺乳動物細胞のミトコンドリア融合・分裂の制御と個体における生理的意義

研究課題名(英文) Regulation and physiological role of mitochondrial fusion and fission in mammals

研究代表者

石原 直忠 (Naotada, Ishihara)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号：10325516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは細胞内で融合と分裂を繰り返しながらそのバランスの基に形態を動的に維持している。我々は哺乳動物ミトコンドリアの融合と分裂を制御するGTPase及びその関連因子を同定・解析することで分子理解を進めている。一方、分裂因子Drp1の遺伝子欠損マウスを構築し解析することにより、個体の発生・分化における生理的意義の解明を目指して研究を行っている。その結果、心筋の形成・機能維持におけるミトコンドリアダイナミクスの機能や、卵形成・成熟におけるミトコンドリア分裂の機能を明らかにした。さらに、ミトコンドリアの融合と分裂のバランスの制御の分子機構の解明や、新規関連因子の同定を進めることができた。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dynamics by frequent fusion and fission have important roles in various cellular signaling processes and pathophysiology in vivo. However, the molecular mechanism that regulates mitochondrial fusion and fission in mammalian cells are not well understood. We analyzed molecular mechanism to regulate mitochondrial morphology in mammalian cells, by balanced mitochondrial fusion and fission. We also found important roles of mitochondrial fission in formation of cardiomyocytes during neonatal heart development, and maintenance of oocyte quality.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア オルガネラ 膜融合 膜分裂 GTPase

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細菌の共生を起源とするオルガネラであり、酸素呼吸によるエネルギー生産、アポトーシス等の細胞シグナリング、様々な代謝反応等の多くの生命現象に関わる、多彩な重要機能を担っている。生細胞内のミトコンドリアをライブ観察を行うと、細胞内で融合と分裂を頻繁に繰り返しながら細胞内で活発に動いている様子を観察することができる。これまでの研究で、ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスの基に動的に制御・維持されていることがわかってきている。またミトコンドリアの形態は発生・分化・細胞応答・病態等に伴い大きく変化することも良く知られている。ミトコンドリアのダイナミックな形態変化が、様々な生命現象の制御にどのように関与しているか、その分子詳細の理解が期待されている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、哺乳動物のミトコンドリア融合・分裂を制御する GTPase 及びその関連因子を同定・解析することで分子理解を進めてきた。一方、分裂因子 Drp1 の遺伝子欠損マウスを構築・解析することにより、発生・分化における生理的意義を明らかにすることを目指して研究を行ってきた。これらの研究により、本研究分野は大きく拡大し細胞・個体レベルでの多くの研究成果が報告されるようになってきている。しかし哺乳類の細胞内での制御機構と、個体における生理機能の理解に関しては、多くは不十分のまま残されていた。そこで本研究計画ではミトコンドリアダイナミクスの分子機構と生理機能の両側面から、ミトコンドリアの膜と mtDNA の関連に注目して、総括的な研究を行うことにより、ミトコンドリアダイナミクスの基盤理解を飛躍的に発展させることを目指して行ってきた。

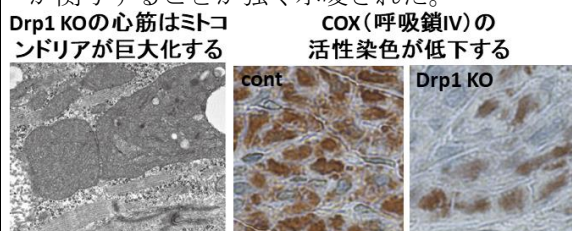
3. 研究の方法

(1) これまでにミトコンドリア分裂因子 Drp1 の flanking-lox マウスを構築していた。このマウスと組織特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配し、様々なマウス系列を構築した。これらのマウスの組織の、mtDNA 量・遺伝子発現・タンパク質発現・組織形成・細胞内構造等を、PCR、リアルタイム PCR、免疫ブロットティング、間接蛍光抗体染色、電子顕微鏡観察、等により解析を行った。(2) 培養細胞を siRNA を用いて RNAi 処理し、その細胞の遺伝子発現・タンパク質発現・組織形成・細胞内構造等を、リアルタイム PCR、免疫ブロットティング、間接蛍光抗体染色、電子顕微鏡観察、等により解析を行った。

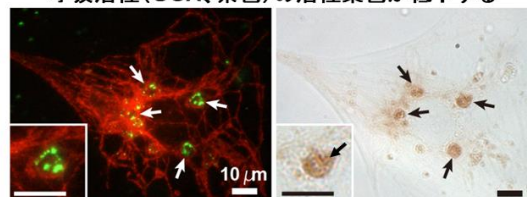
4. 研究成果

(1) 哺乳動物ミトコンドリアの動的構造変化の全容を理解するため、分裂因子 Drp1 の条件欠損マウスを構築し、組織形成・発生に

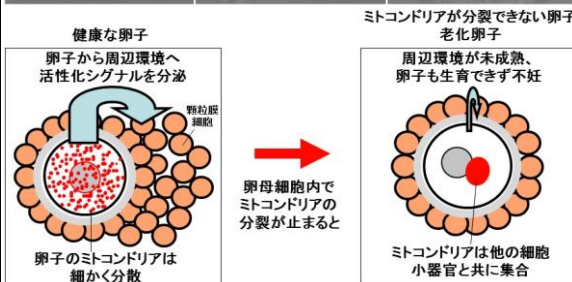
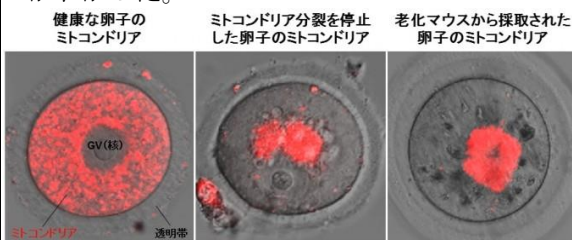
おける生理機能を解析した。(i) 心筋の形成・機能維持におけるミトコンドリアダイナミクスの機能を解析するため、Drp1-flox マウスと筋特異的 Cre 発現マウスと交配したところ、心形成期には Drp1 の発現量が一過的に極めて高くなること、筋特異的 KO マウスを構築すると生後 1 週間で心筋機能不全により致死となることを見出した。KO 心筋では核様体の分布に大きな変化が見られ、その結果、細胞内でのエネルギー供給が不十分となることで心機能不全となることが明らかになった。さらに心筋から初代培養細胞を構築し詳細に解析を行ったところ、mtDNA の配置不全と呼吸鎖形成不全に関連が見られることが明らかになった。これらの結果から、心筋形成にはミトコンドリア分裂が必須の機能を持つこと、その機能発現には mtDNA が関与することが強く示唆された。



ミトコンドリア(赤)が長くなり、mtDNA(緑)が凝集すると、呼吸活性(COX、茶色)の活性染色が低下する



(ii) 卵母細胞特異的 Cre を用いて卵形成・成熟におけるミトコンドリア分裂の機能を解析したところ、雌は不妊となること、卵巣内で卵母細胞が成熟異常となることを見出した。ミトコンドリアのみならず ER も大きな構造変化を起こすことから、Drp1 は卵子のオルガネラ再編成に重要な機能を持つことがわかった。



(iii) それ以外に、神経・肝臓等の様々な組織におけるミトコンドリア分裂の機能解析を進めた。

(2) ミトコンドリアの融合と分裂の反応の詳細解析を行った。(i) これまで理解があまり進められてこなかった、ミトコンドリアの融合と分裂のバランスの制御の分子機構に着目して研究を行った。ミトコンドリアの融合と分裂による動的变化の制御の分子機構を調べる目的で、融合に必須な因子 Drp1 を抑制した細胞の応答を解析した。ミトコンドリア分裂因子 Drp1 を RNAi で抑制し、あるいはゲノム編集により遺伝子欠損させた HeLa 細胞を構築した。これらの細胞のタンパク質をウェスタンブロットで、また mRNA を RT-PCR 等で観察し、変動因子を探した。すると、Mfn1, Mfn2, OPA1 等のミトコンドリア融合に関わるタンパク質群に大きな発現量の減少が見られた。この時、RNA の発現量は変動していなかった。さらに詳細解析を行うと、Mfn タンパク質群はユビキチンプロテアソーム系で分解されること、一方 OPA1 はミトコンドリア内の膜内プロテアーゼにより分解されることが分かった。これらの結果から、ミトコンドリア形態のバランス制御には様々なタンパク質分解系が関与していることが明らかになった。(ii) ミトコンドリア形態制御に関わる新規遺伝子を同定し、その解析を進めた。呼吸鎖の形成に関わるアセンブリー因子 CCDC56 がミトコンドリアの形態制御に関わること、さらに呼吸鎖複合体の中のシトクロームオキシダーゼの機能がミトコンドリア分裂制御に関与することを見出した。(iii) ミトコンドリアの形態制御に関与する遺伝子群の同定をさらに進めるため、siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングや生化学的解析から多くの候補因子を単離した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

- ① M. Ariyoshi, M. Katane, K. Hamase, Y. Miyoshi, M. Nakane, A. Hoshino, Y. Okawa, Y. Mita, S. Kaimoto, M. Uchihashi, K. Fukai, K. Ono, S. Tateishi, D. Hato, R. Yamanaka, S. Honda, Y. Fushimura, E. Iwai-Kanai, N. Ishihara, M. Mita, H. Homma, and S. Matoba. D-Glutamate is metabolized in the heart mitochondria. *Sci. Rep.* 7: 43911 (2017) doi: 10.1038/srep43911.
- ② N. Ishihara and K. Mihara. PARL paves the way to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 19: 263-265 (2017) doi: 10.1038/ncb3504.
- ③ 太田あずさ、伴匡人、石原直忠、ミトコンドリアのダイナミクスとその生理機能、*脳* 21 19(3): 211-216 (2016)
- ④ B. Oettinghaus, J. Schulz, L. Restelli, C. Savoia, A. Schmidt, K. Schmitt, A. Grimm, L. Morè, J. Hench, M. Tolnay, A. Eckert, P. D'Adamo, P. Franken, N. Ishihara, K. Mihara, J. Bischofberger, L. Scorrano, S.

Frank. Synaptic dysfunction, memory deficits and hippocampal atrophy due to ablation of mitochondrial fission in adult forebrain neurons. *Cell Death Differ.* 23: 18-28 (2016) doi: 10.1038/cdd.2015.39

⑤ S. Saita, T. Ishihara, M. Maeda, S. Iemura, T. Natsume, K. Mihara and N. Ishihara. Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission. *Genes to Cells* 21: 408-424 (2016) doi: 10.1111/gtc.12351.

⑥ S. Kiryu-Seo, H. Tamada, Y. Kato, K. Yasuda, N. Ishihara, M. Nomura, K. Mihara, H. Kiyama. Mitochondrial fission is an acute and adaptive response in injured motor neurons. *Sci. Rep.* 6:28331 (2016) doi: 10.1038/srep28331.

⑦ 伴匡人、後藤雅史、石原直忠、ミトコンドリアの融合と分裂：その意義と制御機構、*化学と生物* 53(1): 27-33 (2015)

⑧ 宇田川理、石原直忠、ミトコンドリア分裂因子 Drp1 は細胞小器官のダイナミックな再編成を通して卵子の質を維持する、*細胞工学* 34(1): 82-83 (2015)

⑨ 石原直忠、ミトコンドリアのダイナミクスとその役割、*数研出版 サイエンスネット* 52: 2-5 (2015)

⑩ 石原直忠、ミトコンドリア分裂の生理機能とその破綻、*医学のあゆみ* 254(5): 433-439 (2015)

⑪ T. Ishihara, H. Kohno, and N. Ishihara. Physiological roles of mitochondrial fission in cultured cells and mice development. *Annals. N.Y. Acad. Sci.* 1350: 77-81 (2015) doi: 10.1111/nyas.12848

⑫ T. Ishihara, R. Ban-Ishihara, M. Maeda, Y. Matsunaga, A. Ichimura, S. Kyogoku, H. Aoki, S. Katada, K. Nakada, M. Nomura, N. Mizushima, K. Mihara, N. Ishihara. Dynamics of mtDNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Mol. Cell. Biol.* 35: 211-223 (2015) doi: 10.1128/MCB.01054-14

⑬ K. Arasaki, H. Shimizu, H. Mogari, N. Nishida, N. Hirota, A. Furuno, Y. Kudo, M. Baba, N. Baba, J. Cheng, T. Fujimoto, N. Ishihara, C. Ortiz-Sandoval, L. Barlow, A. Raturi, N. Dohmae, Y. Wakana, H. Inoue, K. Tani, J. Dacks, T. Simmen, and M. Tagaya. A role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. *Dev. Cell.* 32: 304-317 (2015) doi: 10.1016/j.devcel.2014

⑭ A. Jahani-Asl, E. Huang, I. Irrcher, J. Rashidian, N. Ishihara, DC. Lagace, RS. Slack, DS. Park. CDK5 phosphorylates DRP1 and drives mitochondrial defects in

NMDA-induced neuronal death. *Hum. Mol. Genet.* 24: 4573-4583 (2015) i: 10.1093/hmg/ddv188

⑮L. Wang, T. Ishihara, Y. Ibayashi, K. Tatsushima, D. Setoyama, Y. Hanada, Y. Takeichi, S. Sakamoto, S. Yokota, K. Mihara, D. Kang, N. Ishihara, R. Takayanagi, M. Nomura. Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced obesity and metabolic deterioration. *Diabetologia* 58: 2371-2380 (2015) doi: 10.1007/s00125-015-3704-7

⑯R. Ban-Ishihara, S. Tomohiro-Takamiya, M. Tani, J. Baudier, N. Ishihara, and O. Kuge. COX assembly factor *ccdc56* regulates mitochondrial morphology by affecting mitochondrial recruitment of Drp1. *FEBS Lett.* 589: 3126-3132 (2015) doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.039

⑰石原孝也、石原直忠 細胞と組織におけるミトコンドリアの形態制御機構と役割 「生体の科学」 65(4) 299-303 (2014)

⑱O. Udagawa, T. Ishihara, M. Maeda, Y. Matsunaga, S. Tsukamoto, N. Kawano, K. Miyado, H. Shitara, S. Yokota, M. Nomura, K. Mihara, N. Mizushima, and N. Ishihara. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr. Biol.* 24: 2451-2458 (2014) doi: 10.1016/j.cub.2014.08.060.

〔学会発表〕(計 32 件)

①石原直忠、ミトコンドリアの融合と分裂による動的な形態制御とその意義、阪大蛋白研セミナー、2017

②飯星悠、黒田将吾、石原孝也、石原直忠、斉藤寿仁、抗がん剤 *aclarubicin* の細胞毒性は SUMO・ユビキチン修飾と核およびミトコンドリアの制御破綻に由来する、第 39 回日本分子生物学会、2016

③石川香、堅田俊、小笠原絵美、本間耀、石原孝也、三藤崇行、三原勝芳、林純一、石原直忠、中田和人、ミトコンドリア病の多様な病態発症機構の理解に向けたアプローチ、第 39 回日本分子生物学会、2016

④本間耀、堅田俊、小笠原絵美、石原孝也、三藤崇行、三原勝芳、林純一、石原直忠、中田和人、石川香、ミトコンドリア遺伝子疾患の病態発症におけるミトコンドリア分裂の役割、第 39 回日本分子生物学会、2016

⑤石原孝也、石原直忠、ミトコンドリアの膜と mtDNA のダイナミクスを制御する因子の探索、第 39 回日本分子生物学会、2016

⑥一村紋佳、石原孝也、石原直忠、成長期の骨格筋における Drp1 の機能、第 39 回日本分子生物学会、2016

⑦伴匡人、石原孝也、太田あずさ、石原直忠、ミトコンドリアの膜とゲノムの協調的な形

態制御、第 39 回日本分子生物学会シンポジウム、2016

⑧石原直忠、障害ミトコンドリアの選別・浄化の分子機構の解析、オートファジー学会、2016

⑨伴匡人、石原直忠、OPA1 プロテオリポソームによるミトコンドリア内膜融合機構の解明、第 89 回日本生化学会大会、2016

⑩石原直忠、河野裕翔、太田あずさ、伴匡人、石原孝也、ミトコンドリアの GTPase タンパク質による融合と分裂の制御、第 89 回日本生化学会大会、2016

⑪石原直忠、伴匡人、河野裕翔、石原孝也、ミトコンドリアの融合と分裂のバランス制御とその分子機構、第 68 回日本細胞生物学会大会ワークショップ、2016

⑫石原直忠、個体内でのミトコンドリアの融合と分裂の意義、第 16 回日本抗加齢医学会総会、シンポジウム、2016

⑬石原直忠、ミトコンドリアの動的な形態制御とその意義、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、シンポジウム、2016

⑭石原孝也、石原直忠、ミトコンドリアの膜と DNA の協調的かつ動的な制御機構、BMB2015 ワークショップ、2015

⑮石原直忠、ミトコンドリアは生きている、日本ミトコンドリア学会市民公開講座、2015

⑯石原直忠、基礎科学オーバービュー、第 15 回日本ミトコンドリア学会年会 シンポジウム、2015

⑰石原直忠、ミトコンドリアの融合と分裂を介した障害ミトコンドリアの選別機構、第 9 回オートファジー研究会、2015

⑱N. Ishihara、Roles of mitochondrial dynamics in mammalian development/differentiation、Molecular Mitochondria Joint Seminar of Young Finnis - Japanese Mitoscientists 2015

⑲石原直忠、ミトコンドリアの動的な形態制御、第 45 回新潟神経学夏期セミナー、2015

⑳石原(伴)玲子、石原直忠、ミトコンドリア核様体ダイナミクスの分子機構の解明、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015

㉑石原直忠、哺乳動物細胞におけるミトコンドリアの融合と分裂の制御、第 67 回日本細胞生物学会大会、2015

㉒河野裕翔、伴匡人、石原孝也、石原直忠、OPA1 によるミトコンドリア内膜融合の制御機構、H27 日本生化学会九州支部例会、2015

㉓石原直忠、ミトコンドリアの融合と分裂の生理的意義、第 120 回日本解剖学会、第 92 回日本生理学会合同大会シンポジウム、2015

㉔石原孝也、石原玲子、一村紋佳、三原勝芳、石原直忠、mtDNA 分布制御を介した心筋細胞成熟におけるミトコンドリア分裂の役割、第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014

㉕石原玲子、石原直忠、ミトコンドリア核様体ダイナミクスの分子機構の解析、第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014

- ②⑥伴匡人、石原直忠、リコンビナント OPA1L によるミトコンドリア内膜融合機構の解明、第 14 回日本ミトコンドリア学会年会、2014
- ②⑦N. Ishihara, R. Ban-Ishihara, T. Ishihara, T. Ban、Physiological roles of mitochondrial fission in cultured cells and in mice development、11th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM)、2014
- ②⑧石原直忠、ミトコンドリア品質管理における融合と分裂の役割、第 8 回オートファジー研究会、2014
- ②⑨伴匡人、石原直忠、OPA1 プロテオリポソームによるミトコンドリア内膜融合機構の解明、第 87 回日本生化学会大会、2014
- ③⑩石原直忠、伴匡人、石原孝也、石原（伴）玲子、前田 真希、ミトコンドリアのダイナミクスによる細胞機能制御、第 87 回日本生化学会大会シンポジウム、2014
- ③⑪ T. Ishihara, R. Ban-Ishihara and N. Ishihara、Dynamics of mtDNA nucleoid regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation, release of cytochrome c, and heart development、EuroMit(International meeting of mitochondrial pathology)、2014
- ③⑫細田将太郎、石原孝也、石原（伴）玲子、伴匡人、石原直忠、哺乳動物細胞におけるミトコンドリアの融合と分裂の制御、第 66 回日本細胞生物学会、2014

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://mitochondria.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原直忠 (Naotada Ishihara)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号：10325516