

平成 31 年 4 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07274

研究課題名(和文)アポトーシスにおけるミトコンドリア分裂と共役したクリステ構造変化の分子機構

研究課題名(英文)Cristae remodeling in apoptosis

研究代表者

大寺 秀典(OTERA, HIDENORI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40380612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアにのみ限定して存在するカルジオリピンはミトコンドリア形態といよりもむしろカスパーゼ8活性化の足場として機能すること、チトクロムCの内膜への係留に重要であることが示唆された。またアポトーシス誘導時に見られるミトコンドリア分裂にはミトコンドリア内のタンパク質因子が関与することが示唆された。分裂には当然、Drp1およびその受容体群が必要ではあるが、おそらくミトコンドリア内因子と協調してアポトーシス誘導時にミトコンドリア分裂を促進するのであろう。現在、このミトコンドリア内因子の同定作業を進めており、アポトーシスにおけるミトコンドリア分裂の生理的意義が解明できるものと期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アポトーシスは抗がん剤によるがん細胞死に必須な反応でありその執行にはミトコンドリア構造変化が大きく関与している。今回アポトーシスにおいてミトコンドリアクリステ構造が分裂と共益することが必須な反応であることを明らかにした。

この反応の素過程を詳細に解析するための試験管内ミトコンドリア分裂系を確立した。これにより各反応に関わる分子同定がなされれば新規抗がん剤開発に大いに貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial fission facilitates release of cytochrome c from intra-cristae space into the cytoplasm during intrinsic apoptosis, although how mitochondrial fission factors Drp1 and its mitochondrial receptors Mff, MiD49 and MiD51 are involved in this reaction remains elusive. In spite of this antiapoptotic phenotype, OPA1 oligomers that are generally thought to resist cytochrome c release by stabilizing tight cristae structures were disassembled with similar kinetics as wild-type cells upon apoptosis induction. Disruption of pre-existing cristae by OPA1 depletion restored cytochrome c release in MiD49/51-KO cells. Re-expression of MiD51 mutant revealed that Drp1 recruitment is required for MiD51-regulating cytochrome c release. Thus, Drp1-dependent mitochondrial fission through MiD49 and MiD51 is epistatic to cristae remodeling and function as essential gatekeepers 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 クリステ ミトコンドリア形態

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 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。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働く多くの Bcl-2ファミリータンパク質が存在する場となるなど、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ながらチューブ状の形態を維持していますが、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ほとんど知られていません。

ミトコンドリアは内部にクリステと呼ばれる内側に陥入した特有の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ことが明らかになってきました (図1参照)。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、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。健全な細胞では、チトクロムCの大部分はクリステ内に隔離されています。そのため、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の再編 (Cristae remodeling) が必須と考えられています。ところが、クリステ再編の仕組みとその制御機構はほとんど明らかにされていません。

分裂実行因子DRP1 (GTPase) は、自己会合によってリング状に膜に巻き付いてミトコンドリアを切断します。DRP1の切断面へのリクルートに必要な膜レセプターとしては、申請者がその機能を同定したMffのほか、MiD49、MiD51 (構造・機能的にほぼ同じ) が知られていますが、「DRP1膜レセプターが3種存在する生理的意義」は理解されていません

### 2. 研究の目的

DNA損傷や抗癌剤の刺激に応じて、ミトコンドリアは分裂し、クリステ内に貯留されるチトクロムCを放出してアポトーシスが開始します。DRP1が細胞質から分裂面へ移行してミトコンドリアは分裂します。哺乳動物細胞には3種のDRP1外膜レセプター (Mff、MiD49、MiD51) が知られていますが、分裂反応のメカニズムと細胞機能における役割分担は不明でした。

最近、申請者はアポトーシス誘導時、Mffとは異なり、MiD49/51がDRP1と協調してクリステ再編を引き起こし、チトクロムC放出に働く確証を得ました。本研究ではこの研究をさらに進め、アポトーシスにおけるミトコンドリア形態変化の生理的意義とその分子基盤の解明を目指します。

### 3. 研究の方法

Bax-KO、Bak-KO、Bax/Bak-DKO細胞の作成

HeLa細胞にBax、BakそれぞれをノックアウトさせるためのgRNAとCAS9を含むプラスミドをトランスフェクトした後、限界希釈法にて細胞をクローニングしてBax、Bak抗体にて免疫染色することによってスクリーニングした。免疫染色にて選別した細胞はウエスタンブロットにて発現を再度確認してBax-KO、Bak-KO細胞を得た。Bax/Bak-DKO細胞についてはHeLa細胞にBax、BakのgRNAを有するCAS9ベクターを同時に導入して、上記と同様の方法にてスクリーニングを行い作成した。

セミインタクト細胞を用いたミトコンドリア分裂再構成系

カバーガラス上で培養したHeLa細胞を25 mg/mlジギトニンを含むアッセイバッファ (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 0.25 M sucrose, 2.5 mM magnesium acetate, 25 mM KCl, 2.5 mM EGTA, 1 mM taxol) により室温で5分処理することによりセミインタクト細胞を調整した。

### 4. 研究成果

Bax/Bak二重欠損細胞 (Bax/Bak-DKO) のアポトーシス応答とミトコンドリア形態変化  
アポトーシスによるミトコンドリアの断片化とアポトーシスに抑制的に働くBaxおよびBakと

の関係を調べた。まず CRISPR/CAS9 システムにより Bax、Bak および Bax/Bak-DKO 細胞を作成してアポトーシスに応答したチトクロム C の放出を調べた。アクチノマイシン D により 8 時間処理すると野生型細胞では 80% 程度チトクロム C が放出する。一方、Bax-KO 細胞では若干、放出が見られるものの Bak-KO 細胞ではほとんど放出は認められなかった。Bax/Bak-DKO 細胞では全く放出しなかった (図 1 A)。このことから通常、チトクロム C はミトコンドリア外膜に恒常的に存在する Bak により形成されるポアを介して細胞質に放出されることが示唆された。Bak-KO 細胞では Bax のミトコンドリア移行がほとんど見られなかったことから Bak により形成される外膜ポアを介してミトコンドリアから放出された因子が Bax のミトコンドリア移行に必要であることも合わせて示唆された (図 1 B)。野生型細胞ではアポトーシス刺激に応じてミトコンドリアは断片化するのに対して、Bax/Bak-DKO 細胞ではミトコンドリア分裂は全く誘導されなかった。さらに電子顕微鏡によりクリステ微細構造を観察したところ、DKO 細胞では野生型に見られるアポトーシス誘導に応じたクリステの膨潤が全く認められなかった (図 1 C)。Bax/Bak-DKO 細胞におけるミトコンドリア分裂因子 Drp1 の細胞内局在を調べたところ野生型細胞との差異は認めなかった。さらに CCCP 処理により Bax/Bak-DKO 細胞でも野生型同様ミトコンドリア断片化が誘導されたことから本細胞にもミトコンドリア分裂機能は備わっている。このことより、アポトーシス刺激に応じて Bax あるいは Bak により形成される外膜ポアを介して放出されるミトコンドリア内成分がアポトーシスにおけるミトコンドリア分裂およびクリステ構造再編に参与していることが示唆された。

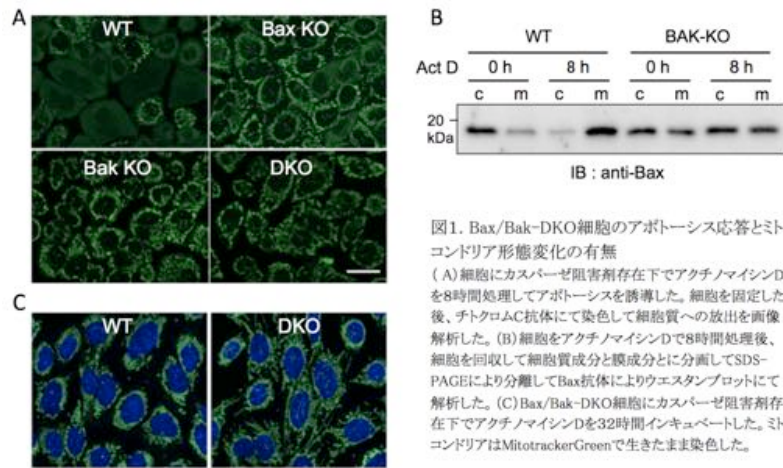


図1. Bax/Bak-DKO細胞のアポトーシス応答とミトコンドリア形態変化の有無  
 (A) 細胞にカスパーゼ阻害剤存在下でアクチノマイシンDを8時間処理してアポトーシスを誘導した。細胞を固定した後、チトクロムC抗体にて染色して細胞質への放出を画像解析した。(B) 細胞をアクチノマイシンDで8時間処理後、細胞を回収して細胞質成分と膜成分とに分画してSDS-PAGEにより分離してBax抗体によりウエスタンブロットにて解析した。(C) Bax/Bak-DKO細胞にカスパーゼ阻害剤存在下でアクチノマイシンDを32時間インキュベートした。ミトコンドリアはMitotrackerGreenで生きたまま染色した。

るアポトーシス誘導に応じたクリステの膨潤が全く認められなかった (図 1 C)。Bax/Bak-DKO 細胞におけるミトコンドリア分裂因子 Drp1 の細胞内局在を調べたところ野生型細胞との差異は認めなかった。さらに CCCP 処理により Bax/Bak-DKO 細胞でも野生型同様ミトコンドリア断片化が誘導されたことから本細胞にもミトコンドリア分裂機能は備わっている。このことより、アポトーシス刺激に応じて Bax あるいは Bak により形成される外膜ポアを介して放出されるミトコンドリア内成分がアポトーシスにおけるミトコンドリア分裂およびクリステ構造再編に参与していることが示唆された。

#### アポトーシスに応じた MiD51-Bak の相互作用

チトクロム C はクリステの袋状の空間に濃縮して貯留されている。アポトーシス誘導時に Bax/Bak のポアが形成されても MiD49/51 の非存在下ではクリステの膨潤から袋状膜の解放が生じないためチトクロム C の放出は達成されない。MiD49/51 は顕微鏡下でミトコンドリア外膜に均一に局在するのではなく、ドット状の限局された領域に存在する。これらの事実から MiD タンパク質と Bax および Bak はミトコンドリアで相互作用する可能性が考えられた。そこで MiD51-FLAG を導入した細胞にアポトーシス刺激を与えた細胞での MiD51 と Bak の相互作用をクロスリンカーを用いて検討した。結果、アポトーシス刺激を与えた場合のみ、MiD51 と Bak が相互作用することが判明した。尚、MiD49 と MiD51 は構造および機能的に類似しており、相互に補完的な機能を持つが、MiD49 についても同様に Bak との相互作用が認められた。

#### アポトーシスにより誘導されるミトコンドリア断片化およびクリステ構造変化に必要な因子の探索

Bax/Bak-DKO 細胞ではアポトーシスに応じたミトコンドリア分裂が全く誘導されなかった (前述)。そこでアポトーシス誘導の際に Bax/Bak により形成されるポアを介してミトコンドリア内から放出される因子がアポトーシスにより引き起こされるミトコンドリア分裂を誘発するのではないかと考えその検証を行った。野生型 HeLa 細胞よりセミインタクト細胞を作製してアポトーシス誘導細胞から調整した細胞質画分とインキュベートした結果、ミトコンドリアの分裂が引き起こされることが明らかとなった (図 2)。一方、proteinaseK により処理した細胞質画分では分裂が誘導されなかったことからアポトーシスに応じたミトコンドリア分裂を誘発する因子はタンパク質性因子であることが示唆された。さらにアポトーシス刺激を与えた

Bax/Bak-DKO 細胞から調整した細胞質画分ではミトコンドリア分裂は見られなかった。このことからアポトーシスに応じたミトコンドリア分裂にはBax/Bakにより形成されるポアを介して放出されるミトコンドリア内タンパク質因子が関与することが示唆された。

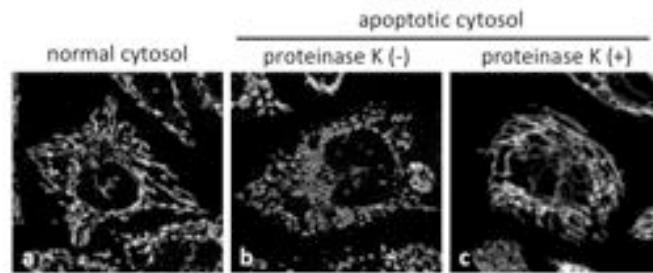


図2. セミインタクト細胞を用いたミトコンドリア分裂再構成  
50-60%を恒定的に発現させるミトコンドリアを標識したHeLa細胞から半透過性(セミインタクト)細胞を調整した。その後、調整した細胞質画分と室温30分インキュベートさせたのち細胞を固定して観察した。  
(a) アポトーシス細胞から調整した細胞質画分  
(b) アポトーシスを誘導させた細胞から調整した細胞質画分をproteinase Kで処理  
(c) アポトーシスを誘導させた細胞から調整した細胞質画分

カルジオリピンによるアポトーシス制御

最近、ミトコンドリアでのみ産生されるカルジオリピン (CL) のミトコンドリアの形態および機能に關与

するとの報告が相次いでいる。そこでCLのアポトーシスに及ぼす影響について検討した。興味深いことにCL合成酵素であるCRLS1特異的なsiRNAを導入すると、MiD49/51-DKO細胞以外ではチトクロムC放出が亢進した。CL減少によりアポトーシスが亢進することはカスパーゼ3を定量することからも示された。アポトーシス誘導経路にはアクチノマイシンDなどによる内因性経路とFASレセプターなどを経由する外因性経路の2つが知られている。カスパーゼ8は細胞膜直下で活性化されるものとミトコンドリア外膜上で活性化される2種が知られているが、CLはミトコンドリア外膜上でカスパーゼ8活性化に影響を及ぼすことが明らかになった。実際、野生型細胞にFASリガンドによって外因性経路によるアポトーシスを誘導させた場合、細胞死の頻度は変化しなかった。MiD49/51-DKO細胞ではCRLS1を抑制してもアポトーシスは亢進しないどころかむしろアポトーシスに抑制的に働く。このことからCL欠損細胞では内因性アポトーシスシグナルによるミトコンドリア外膜でのカスパーゼ8活性化は阻害されるものの、通常ミトコンドリア内膜にCLを介して係留されているチトクロムCが内膜から解離しているため内因性シグナルによるアポトーシスに高感受性を示すものと推察された。一方、MiD49/51-DKO細胞ではクリステ構造変化が起きないためCL減少による影響を受けにくいものと考えられた。実際に、MiD49/51-DKO細胞にOPA1 siRNAを導入してクリステ構造を破壊するとCRLS1 siRNAによる阻害効果が解除された。以上のことから、ミトコンドリア特異的なリン脂質カルジオリピンはミトコンドリア外膜上でカスパーゼ8活性化とチトクロムCの内膜への係留に働くことが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔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:

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8 桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。