

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0162

研究課題名（和文）オートファジーによって分解されるミトコンドリアの形態制御機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Morphological analysis of mitochondria during mitophagy(Fostering Joint International Research)

研究代表者

山下 俊一（Yamashita, Shun-ichi）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30529095

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返すことでその形態を変化させ、様々な環境に適応している。申請者はこれまでに、マイトファジーの過程では大きなミトコンドリアから分解対象となる一部のミトコンドリアが小さくちぎり取られるようにして分裂することを明らかにしたが、その分子機構については不明であった。

本研究では、カリフォルニア工科大学の David Chan 教授との国際共同研究を行うことで、新奇ミトコンドリア分裂分子機構の解明を目指した。その結果、低酸素や鉄欠乏で誘導されるマイトファジーに必須な因子を同定した。それらはミトコンドリアが分裂する部位に集積する性質をもち、分裂にも関与していることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアの機能不全は多くの疾患の原因になり、その機能維持は疾患治療や予防に重要である。申請者はミトコンドリアの機能維持機構の一つとして考えられる不良ミトコンドリアの分解除去機構であるマイトファジーにおいて、不良なミトコンドリアのみがどのようにして正常なミトコンドリアから切り取られるのかについて研究を行った。このミトコンドリア分裂機構は、既存のミトコンドリア分裂機構とは異なる分子機構によるもので、それらにかかわると考えられる因子の同定に成功した。このことは未知の分子機構解明に大きく寄与するものであり学術的な意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial morphology is regulated by their fusion and division, that is important for maintaining mitochondrial function. In addition, mitochondrial division is also required for mitophagy. Drp1 which is main player of mitochondrial division have been believed to be required for mitochondrial division during mitophagy, so far. However, I have reported that mitophagy is normally detected in the absence of Drp1. In this context, small mitochondrion destined for degradation is divided simultaneously with closing of the isolation membrane, but independently of Drp1. Aiming to clarify the molecular mechanism of the novel mitochondrial division, I focused on mitophagy receptors and identified two mitophagy receptors as essential factors for hypoxia- and iron depletion-induced mitophagy. During mitophagy, they gradually accumulated in between the isolation membrane and mitochondria.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア マイトファジー オートファジー

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返すことでその形態を変化させ、様々な環境に適応している。ミトコンドリア分裂時には、ダイナミン様 GTPase Drp1 が中心的な役割を担っており、Drp1 欠損細胞ではミトコンドリアが分裂できないため、長くつながったミトコンドリアが観察される。また、Drp1 に依存したミトコンドリア分裂は、ミトコンドリアオートファジー（以下、マイトファジー）によるミトコンドリア分解時にも必須であると考えられてきた（図 1A）。しかし、申請者は、マイトファジー誘導条件下では、Drp1 欠損細胞でもミトコンドリアが分解されることを、哺乳類培養細胞と酵母を用いて証明した。また、この時 Drp1 非依存的にミトコンドリアが分裂するが、その分裂様式は大きなミトコンドリアから分解対象となる一部のミトコンドリアが小さくちぎり取られるようにして分裂することを明らかにした（図 1B）。しかし、マイトファジーの過程で、どのようにして Drp1 非依存的に、小さなミトコンドリアだけが分裂するのかについては全く不明であった。

一方で、マイトファジー時には、隔離膜がミトコンドリア外膜タンパク質と結合することで、分解対象となるミトコンドリアを決定していることが報告されていた。またこのようなミトコンドリア外膜タンパク質は、強制的な発現によってミトコンドリアを断片化する活性を持っているため、マイトファジー時のミトコンドリア分裂にもなんらかの役割を果たしていることが考えられた。しかし、これまでこのようなタンパク質は複数報告されており、それらの関係性や重要性、組織での特異性などについては全く不明であった。

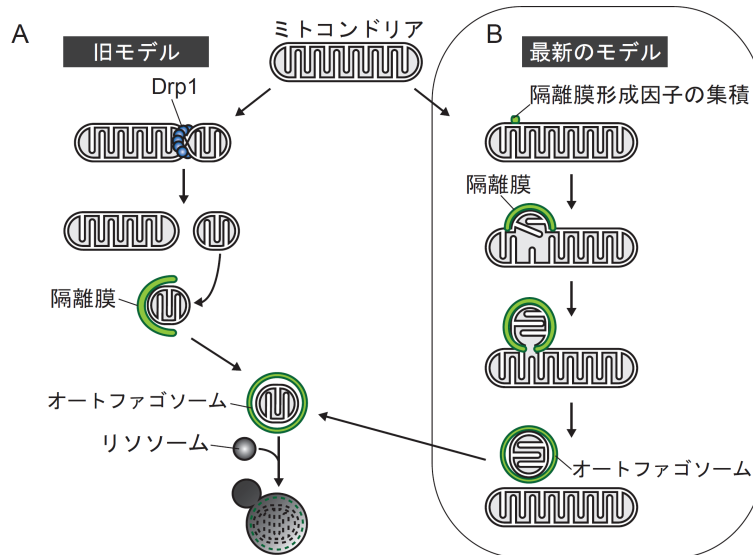


図 1 マイトファジー時におけるミトコンドリア分裂機構
 (A) Drp1 に依存した分裂が重要と考えられてきた旧モデル。
 (B) Drp1 非依存的に、ミトコンドリアの一部がちぎりとられるようにして分裂する最新のモデル。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が見出した、マイトファジー時に見られる新奇のミトコンドリア分裂の分子機構解明を目的とした。特に、ミトコンドリア外膜レセプタータンパク質の機能に注目し、ミトコンドリア分裂への寄与について検討した。目的を達成するために、ミトコンドリア形態研究において世界的な第一人者であるカリフォルニア工科大学の David Chan 教授との国際共同研究を行った。

3. 研究の方法

マイトファジー活性の検出には、pH 感受性蛍光タンパク質マーカーである Mt-Keima を発現する HeLa 細胞を用いた。マイトファジー誘導条件は、これまで申請者が樹立してきた低酸素と鉄欠乏条件を用いた。マイトファジー時のミトコンドリア分裂は、蛍光タンパク質や蛍光指示薬によってミトコンドリアを標識した細胞で、ミトコンドリア分裂を共焦点レーザー顕微鏡を用いた、タイムラプス解析によって検討した。マイトファジー時のミトコンドリア分裂に関与する因子は、候補因子である複数のミトコンドリア外膜レセプタータンパク質を網羅的に破壊した HeLa 細胞を CRISPR/Cas9 法により作製し、Mt-Keima を用いたマイトファジーアッセイにより同定した。マイトファジーに必須な因子を欠損した細胞でのミトコンドリアの活性酸素種レベルの解析には MitoSOX をはじめとする蛍光指示薬による染色法を用いた。

4. 研究成果

これまでに複数のミトコンドリア外膜タンパク質がマイトファジーに関与することが報告されている。これらの外膜タンパク質を特にマイトファジーレセプターと呼び、共通の性質として、過剰発現によってミトコンドリアの分裂とマイトファジーを誘導することができるタンパク質である。これまでに報告されている、マイトファジーレセプタータンパク質の中から、低酸素

や鉄欠乏条件下で誘導されるマイトファジーに必須な因子を、HeLa 細胞を用いたノックアウト細胞の作製・解析から明らかにした。申請者が同定したマイトファジーレセプターは、これらのノックアウト細胞の解析から、マイトファジー以外のオートファジーには関与しないことが分かった。また面白いことに、マイトファジーレセプター欠損細胞では、マイトファジー時のミトコンドリア分裂が阻害されていた。このマイトファジーレセプター欠損細胞では、低酸素や鉄欠乏条件以外のマイトファジーも阻害されており、通常培養条件下でのミトコンドリア活性酸素種のレベルが常に高いことが分かった。

マイトファジーレセプタータンパク質のミトコンドリア分裂への寄与を解析するために、蛍光タンパク質を融合し欠損細胞に発現させ、その局在をタイムラプス解析によって解析した。その結果、マイトファジーレセプターは、上述の大きなミトコンドリアから一部の小さなミトコンドリアがちぎり取られる部分に集積することが分かった。

マイトファジーレセプターの様々なアミノ酸変異体の解析から、マイトファジーにはマイトファジーレセプターと隔離膜タンパク質である LC3 との結合領域が必須であることが分かった。この結合の重要性についてはすでに報告されているが、本研究では新たにこの結合がマイトファジーレセプターのミトコンドリア分裂部への集積に必須であることを明らかにした。このミトコンドリア分裂部には、ミトコンドリア分裂前に隔離膜が形成されるが、マイトファジーレセプターはこの隔離膜形成後にこの場所に集まることが分かった。このことは、マイトファジーレセプターはミトコンドリア上での隔離膜形成に依存してこの場に集まることを示唆している。

これまでの報告では、マイトファジーレセプターの主な役割は、ミトコンドリア外膜上で、隔離膜の形成される場を決定することと考えられてきたが、実際は隔離膜形成後に重要な機能があることが示唆された。このことをサポートするデータとして、マイトファジーレセプターノックアウト細胞においても、隔離膜形成にかかわる上流因子がミトコンドリア上に局在化すること、初期隔離膜が形成されること、この初期隔離膜はミトコンドリア上にとどまれないため伸長化できず離れていくことなども明らかにした。

以上の結果から、本研究においてマイトファジーレセプターが、分解対象となるミトコンドリアの一部の認識機構に関わるのではなく、その場に隔離膜を稽留することでその後のステップ（隔離膜の伸長 ミトコンドリアの出芽 隔離膜の閉口および小さなミトコンドリアの分裂）を進行させることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furukawa Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Yamashita Shun-ichi, Saigusa Tetsu, Kurihara Yusuke, Yoshida Yutaka, Kirisako Hiromi, Nakatogawa Hitoshi, Kanki Tomotake	4. 巻 23
2. 論文標題 The PP2A-like Protein Phosphatase Ppg1 and the Far Complex Cooperatively Counteract CK2-Mediated Phosphorylation of Atg32 to Inhibit Mitophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3579 ~ 3590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.05.064	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 Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake	4. 巻 1782
2. 論文標題 Detection of Iron Depletion- and Hypoxia-Induced Mitophagy in Mammalian Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology, Mitochondrial Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 315 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7831-1_18	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 Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake	4. 巻 1759
2. 論文標題 Detection of Hypoxia-Induced and Iron Depletion-Induced Mitophagy in Mammalian Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology, Mitophagy	6. 最初と最後の頁 141 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2017_19	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 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 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 1~11
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 Yoo Seung Min, Yamashita Shun-ichi, Kim Hyunjoo, Na DoHyeong, Lee Haneul, Kim Seo Jin, Cho Dong Hyung, Kanki Tomotake, Jung Yong Keun	4. 巻 34
2. 論文標題 FKBP8 LIRL dependent mitochondrial fragmentation facilitates mitophagy under stress conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2944 ~ 2957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901735R	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shun-ichi Yamashita
2. 発表標題 Mitochondrial division is associated with autophagosome formation during mitophagy
3. 学会等名 Keystone Symposia, Mitochondrial Biology, Selective Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun-ichi Yamashita
2. 発表標題 Temporal analysis of mitochondrial morphology during mitophagy
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shun-ichi Yamashita
2. 発表標題 A new model for mitochondrial division during mitophagy
3. 学会等名 KSBMB International Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下俊一
2. 発表標題 オートファゴソーム形成に伴うミトコンドリア分裂機構の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下俊一
2. 発表標題 ミトコンドリアはオートファゴソーム形成と同時に分裂する
3. 学会等名 ミトコンドリアサイエンスワークショップ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下俊一、David Chan、神吉智丈
2. 発表標題 ミトコンドリア分解におけるマイトファジーレセプタータンパク質の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 山下俊一、神吉智丈	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館、ニューサイエンス社	5. 総ページ数 104
3. 書名 BIO Clinica	

1. 著者名 Shun-ichi Yamashita, Tomotake Kanki	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 19
3. 書名 Mitophagy in Starvation : Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation.	

1. 著者名 井上敬一、山下俊一、神吉智丈	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 221
3. 書名 ミトコンドリアと疾患・老化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

機能制御学分野
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	チャン デイビッド (Chan David)	カリフォルニア工科大学・Biology and Biological Engineering・Professor	