

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15088

研究課題名(和文)オートファジーによるミトコンドリアDNA分解の分子機構と生理的意義の解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism and physiological role of mitochondrial DNA degradation by mitophagy

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアはATP産生をはじめとする多くの役割を担うオルガネラである。ミトコンドリアは電子伝達系を介してATPを産生するが、その際に漏洩した電子によって自身が酸化傷害を受ける。マイトファジーはそのようなミトコンドリアを分解することで、ミトコンドリア恒常性の維持に寄与していると考えられている。また、ミトコンドリアは独自にmtDNAをもち、mtDNAへの変異はミトコンドリア病の原因としても知られる。本研究で、mtDNAがマイトファジーの基質となるかどうかについて検討した結果、一部のmtDNAがマイトファジーによって分解されることが分かった。また、その際に必要なタンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、ミトコンドリアの一部がちぎりとられて分解されることを証明してきたが、本研究では、ちぎりとられたミトコンドリアの約半数がミトコンドリアDNAを含んでいることを明らかにした。この割合は、分解条件によって変動したことから、条件によって異なるターゲットが認識されて、正常なミトコンドリアから除かれていることが示唆された。この知見は、ミトコンドリア分解の分子機構を解析するうえで重要な知見となった。また、ミトコンドリア分解に必須なタンパク質を2種類同定し、これらが、一般的なオートファジーを阻害しなかったことから、これらの欠損細胞を用いることで、ミトコンドリア分解の生理的意義の解明へと発展できる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria play a role in many metabolic pathways including ATP synthesis in mammalian cells. Usually, mitochondria are insured by reactive oxygen species derived from own electron transport chain, and it is believed that damaged mitochondria are degraded by mitophagy to maintain mitochondrial quality.

Mitochondria have own DNA named mitochondrial DNA (mtDNA) in their matrix. mtDNA codes several respiratory chain component genes and certain mutations of mtDNA causes mitochondrial disease. In this study, I aimed to clarify whether mitophagy contributes to elimination of a mutated mtDNA for maintaining mitochondrial homeostasis. mtDNA was degraded by mitophagy upon hypoxia rather than iron depletion. I identified essential proteins for hypoxia- and iron depletion-induced mitophagy and these were required for mitochondrial division during mitophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マイトファジー ミトコンドリア オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、自身の電子伝達系から漏れた電子から発生する活性酸素種によって酸化傷害を受け、機能不全に陥る。ミトコンドリア選択的オートファジーである、マイトファジーは、このようなミトコンドリアを分解することで、ミトコンドリア恒常性の維持の寄与しており、細胞をさらなる活性酸素種の発生から守っていると考えられている。

申請者のこれまでの研究によって、マイトファジーはチューブ状のミトコンドリアの一部を認識して、その部分だけをちぎりとるようにして分解することが明らかとなった。また、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因子に依存しない新規の分裂機構であった。さらに、どのようにしてチューブ状のつながったミトコンドリアのある一部分のみを認識してちぎり取るのか、この認識機構についても不明である。

申請者の予備実験によって、マイトファジー時には、ミトコンドリア DNA (mtDNA) が基質の一つとして分解されていることが示唆されていた。しかし、どのような mtDNA が分解されるのか、そもそも mtDNA が認識されてマイトファジーが誘導されるのかは不明であった。一方で、mtDNA への変異は、ミトコンドリアの活性の低下につながり、ミトコンドリア病の原因にもなりうる。また、mtDNA はミトコンドリアマトリックスに局在しており、ミトコンドリアから発生する活性酸素種に暴露されやすいと考えられることから、変異 mtDNA は速やかに分解を受けることで、ミトコンドリア恒常性が維持されているという仮説が考えられるが、mtDNA のマイトファジーによる分解についての研究はほとんどされていない。

これまでに、5 種類のマイトファジーレセプタータンパク質が報告されている。マイトファジーレセプターは、すべてミトコンドリア外膜への膜貫通領域を持ち、通常ミトコンドリア外膜タンパク質として存在する。一般にレセプタータンパク質は、基質であるミトコンドリアの一部に集積し、その部分で隔離膜と結合することで、その部分のマイトファジーでの分解を促進すると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに提唱したマイトファジー時に見られるミトコンドリアのちぎり取りの分子機構を、mtDNA に注目して検討することを目的とした。また、mtDNA がマイトファジーの基質となる条件などについて検討することで、その生理的意義について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

マイトファジーの検出には、HeLa 細胞と pH 感受性マイトファジーレポーター mt-Keima を用いた。

マイトファジーは、活性酸素種の発生と関連すると考えられている低酸素条件と、酸化ストレスとは異なる機構と考えられている鉄欠乏条件で行った。

mtDNA の分解検出には、マイトファジー時に形成されるミトコンドリアを包み込んだ小胞である、マイトファゴソームを細胞質に蓄積させ、その内容物の解析を免疫蛍光染色によって解析した。

マイトファジーやミトコンドリアの断片化に関与することが報告されている、マイトファジーレセプターについて、全ての遺伝子を CRISPR/Cas9 法によりノックアウトした細胞を作製し、マイトファジーを解析した。

マイトファジーレセプターの機能ドメインを欠損させた変異体を作製し、マイトファジー遺伝子破壊細胞に発現させることで、マイトファジーレセプターのマイトファジーにおける機能について解析した。

4. 研究成果

マイトファジー時にミトコンドリアを包み込む隔離膜を GFP-LC3 を発現させることによってラベルした細胞を用い、この細胞をマイトファジー条件で培養した。この時マイトファゴソームとリソソームの融合阻害剤を同時に処理することで細胞質にマイトファゴソームを蓄積させ、その内容物について解析した。低酸素および鉄欠乏の 2 種類のマイトファジー条件で誘導し、マイトファゴソームの解析をした結果、低酸素条件下では、およそ 50% のマイトファゴソームが mtDNA を含んでいた。一方で、鉄欠乏条件ではその割合が低下した。この結果は、より活性酸素種に関係のある低酸素条件の方が、mtDNA が分解されやすいことを示唆しており、この時何らかの変異が mtDNA に入りやすくなっている可能性が考えられる。マイトファゴソーム内 mtDNA の変異解析については今後の課題である。

同様に、マイトファゴソーム内のミトコンドリアタンパク質を、外膜、内膜、膜間スペース、マトリックスに分類して解析した結果、内膜に局在する呼吸鎖複合体の中で、マイトファゴソーム内に含まれる割合が異なった。これらは、異なるマイトファジーの刺激によって、ミトコンドリア内の成分の間での選択性が異なることを示唆している。

さらに、マイトファジー時に見られるミトコンドリア形態制御の分子機構を詳細に解析するために、マイトファジーレセプターに注目して解析した。5 種類報告されている、マイトファジーレセプターを CRISPR/Cas9 法によって全てノックアウトし、マイトファジーを解析した結果、低酸素や鉄欠乏でのマイトファジーに必須な 2 つのマイトファジーレセプターを同定した。

同定した2種類の因子の二重破壊細胞では、ほぼすべてのマイトファジーが抑制されており、さらにマイトファジーに伴うミトコンドリアの形態変化も見られなかった。このことは、今回同定したマイトファジーレセプターが、ミトコンドリア形態制御にも関わっていることを示唆している。また、これらのマイトファジーレセプターは、マイトファゴソームに蓄積することが分かった。

マイトファジーレセプターは、共通の特徴として、ミトコンドリア外膜への膜貫通領域と、隔離膜タンパク質である LC3 との結合領域を持っている。これらを含めた機能ドメインを、それぞれ欠損させた変異体を作製し、マイトファジーレセプター遺伝子破壊細胞に導入し、マイトファジーの相補活性を解析した。その結果、LC3 との結合領域に変異を導入した場合、マイトファジーを相補しなかった。この変異体は、LC3 との結合のみが不能であるため、隔離膜が局在化する前段階でマイトファジーが停止すると考えられる。よって分解対象となるミトコンドリアの一部へのマイトファジーレセプターの集積が予想されたが、マイトファジーを誘導しても、マイトファジーレセプターの局在変化などは観察されなかった。このことは、マイトファジーレセプターの分解される運命にあるミトコンドリアへの集積は、LC3 との結合に依存していることを意味しており、今回同定したマイトファジーレセプターは隔離膜のミトコンドリアへの局在化以前に機能するのではなく、隔離膜が局在化した後に、隔離膜とミトコンドリアとの結合を安定させるために機能することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Kentaro Fukawa, Tomoyuki Fukuda, Shun-ichi Yamashita, Tetsu Saigusa, Yusuke Kurihara, Yutaka Yoshida, Hiromi Kirisako, Hitoshi Nakatogawa, Tomotake Kanki, The PP2A-like Protein Phosphatase Ppg1 and the Far Complex Cooperatively Counteract CK2-Mediated Phosphorylation of Atg32 to Inhibit Mitophagy, Cell Reports, 査読有り, 2018, 23(12):3579-3590

DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.064

Shun-ichi Yamashita, Tomotake Kanki, Detection of Iron Depletion- and Hypoxia-induced Mitophagy in Mammalian Cells, Methods in Molecular Biology, Mitochondrial Bioenergetics, 2018, 1782:315-324

DOI: 10.1007/978-1-4939-7831-1_18

Shun-ichi Yamashita, Tomotake Kanki, Detection of Hypoxia- and Iron Depletion-induced Mitophagy in Mammalian Cells, Methods in Molecular Biology, Mitophagy, 2018, 1759:141-149

DOI: 10.1007/7651_2017_19

〔学会発表〕(計5件)

Shun-ichi Yamashita, Mitochondrial division is associated with autophagosome formation during mitophagy, Keystone Symposia Mitochondrial Biology, Selective Autophagy, 2018年4月22日、ウェスティン都ホテル京都、京都市・京都府

山下 俊一、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、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日、神戸国際会議場、神戸市・兵庫県

山下 俊一、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、ミトコンドリアサイエンスワークショップ2017、2017年7月10日、蔵王センタープラザ、山形市・山形県

Shun-ichi Yamashita, Temporal analysis of mitochondrial morphology during mitophagy, The 8th International Symposium on Autophagy, 2017年5月28日、奈良春日野国際フォーラム、奈良市・奈良県

Shun-ichi Yamashita, A new model for mitochondrial division during mitophagy, KSBMB International Conference 2017, 2017年5月17日、BEXCO、釜山市(韓国)

〔図書〕(計1件)

山下俊一、神吉智丈、北隆館、ニューサイエンス社、BIO Clinica、2018、11-15

〔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

<https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/>

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：山下 智大

ローマ字氏名：YAMASHITA, Tomohiro

研究協力者氏名：行田 正晃

ローマ字氏名：NAMETA, Masaaki

研究協力者氏名：五十嵐 遼子

ローマ字氏名：IGARASHI, Ryoko

研究協力者氏名：クセニヤ チェルヌシヨワ

ローマ字氏名：CHERNISHOVA, Kseniya

研究協力者氏名：趙 宇シン

ローマ字氏名：ZHAO, Yuchen

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。