

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15421

研究課題名（和文）ミトコンドリアがオートファジーを制御する新機構と老化随伴疾患代謝物の探索

研究課題名（英文）Search for new mechanisms by which mitochondria control autophagy and metabolites of aging-related diseases

研究代表者

八木 美佳子（Yagi, Mikako）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70536135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々が作成したミトコンドリア機能不全マウスの解析から心筋特異的p32ノックアウトマウスでは拡張型心筋症を早期に発症し約500日で死亡した。寿命が短くなった主原因は、リソソーム機能低下であると考えている。そのメカニズムとしては、ミトコンドリア機能低下によってNAD合成経路の1つであるサルベージ経路の酵素Nmnat3の発現が減少、その結果NAD合成量も減少、リソソーム膜近傍に局在する解糖系酵素GAPDHとPGKによるATP産生能が低下したため、ATPを必要とするリソソーム活性低下を引き起こしていた。さらにNmnat3は転写因子HIF1^αによって発現を制御されていることも証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化に伴う多くの疾患はミトコンドリア機能、オートファジー機能、血中NAD量低下が関与すると考えられているがその詳細な分子機構は明らかではない。今回我々はミトコンドリア機能障害マウスを用いて、心臓においてミトコンドリアを介したリソソーム機能制御の新機構を発見した。リソソーム活性にはNAD⁺を基質として解糖系酵素(GAPDH・PGK)によって産生されるATPが関与していると世界で初めて報告した。老化と共に減少するNAD⁺を補うことで老化と共に発症する疾患の予防・治療に繋がることがわかってきている。したがって新機構の解明によって治療戦略の可能性が広がることになるだろう。

研究成果の概要（英文）：Heart specific p32 knockout mice developed dilated cardiomyopathy at an early stage and died in about 500 days. We considered that the main cause of shortened lifespan is decreased lysosomal function. The mechanism is that the expression of the salvage pathway enzyme Nmnat3, one of the NAD synthesis pathways, is reduced due to the decrease in mitochondrial function, and as a result, the amount of NAD synthesis is also reduced, due to the glycolytic enzymes GAPDH and PGK localized lysosomal outer membrane. ATP dependent lysosomal proton pump, so decreased ATP caused a decrease in lysosomal activity. We also demonstrated that Nmnat3 is regulated by the transcription factor HIF1^α.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア p32 NAD 老化

1. 研究開始当初の背景

老化に伴いミトコンドリア機能が低下することでメタボリックシンドローム、神経変性疾患、心筋症、癌を発症すると考えられている。多くの老化に伴う疾患には基本病態としてミトコンドリア機能低下、ATP 産生能低下、あるいは活性酸素の増加による細胞障害が原因と推測されてきた。

近年、飢餓時の蛋白のリサイクリング、損傷蛋白質の除去を司る重要な生体内維持機構としてオートファジーが重要であるとの認識が高まっている。さらに、老化に伴う疾患もオートファジー機能低下が関与することが示唆されている。

一方、糖尿病をはじめとするメタボリック症候群もミトコンドリア DNA 変異などのミトコンドリア機能低下が関連すると古くから考えられている。さらに老化に伴い血中 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 量の低下が観察されている。

これらのことから我々は老化に伴う多くの疾患はミトコンドリア機能低下が起こり、オートファジー機能低下を惹起する。これが老化による疾患のメカニズムではないかと考えた。しかし、如何にミトコンドリア機能がオートファジー機能と関連しているかについては明らかでない。

2. 研究の目的

我々が作成した、ミトコンドリア機能不全マウスの解析から心筋特異的ノックアウトマウスでは拡張型心筋症を呈することを見出した。さらに、このマウス心筋では NAD 合成酵素(Nmнат)の発現低下、組織 NAD 量の低下、リソソーム機能低下によるオートファゴソームの増加などを見出した。つまりミトコンドリア機能は NAD⁺合成酵素を介したリソソームの機能維持に重要であり、ATG5 依存的、非依存的、どちらのオートファジー機構にも重要であるとの仮説をたて検証する。NAD 量、その前駆体の NAM、NMN 量が老化に伴うオートファジー疾患のマーカーになりうるのか、その意義、妥当性を検証し病態検査、治療効果判定など実臨床に応用する。

3. 研究の方法

(1) ノックアウト心筋組織内 NAD⁺、NADH、NADP、NADPH の量を研究室内の質量分析器 LC/MS/MS、GC/MS/MS において定量する。

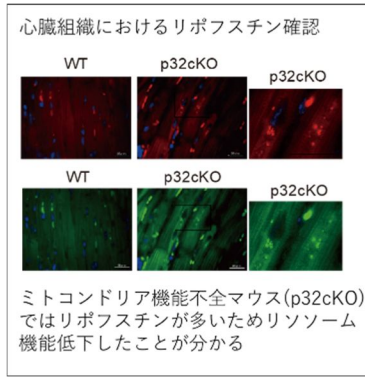
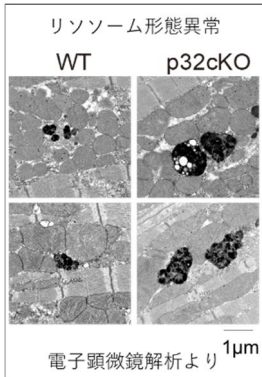
(2) NAD 合成系 (de novo 合成系、サルベージ系) に関与する酵素 (Nampt、Nmнат-1、-2、-3、Qaprt、Naprt、NADsyn1) 8 種類の遺伝子発現プロファイル各種ノックアウトマウスを用いて、q-PCR 法で確認する。

(3) NAD 合成酵素阻害剤(FK866)による NAD 量低下時のリソソーム内 pH、オートファゴソーム形成を免疫染色で確認する。FK866 と NMN を添加すると機能低下が回復するのか検証する。

(4) NAD 合成とリソソーム活性はどのようなメカニズムで関与しているのか証明する。

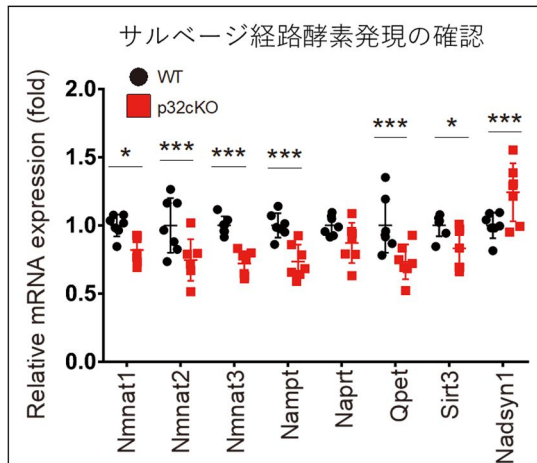
4. 研究成果

ミトコンドリア機能不全マウスの解析から心筋特異的ノックアウトマウスでは拡張型心筋症を早期に呈することを見出し、寿命は約 500 日に減少することを突き止めた。このマウスの心臓を用いて様々な解析を行った。このミトコンドリア機能不全マウスではオートファジー機能の中でも特にリソソームにおいて、電子顕微鏡解析より形態異常、リポフスチンの集積より機能障害を確認した。



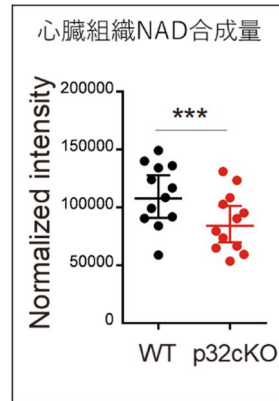
その原因がミトコンドリア機能障害より発生した NAD 合成阻害であることが分かった。心臓組織内 NAD 合成量を MS 解析より定量すると、ミトコンドリア機能不全マウスの心臓組織では NAD 合成量が減少していた。細胞内 NAD 合成量が低下した原因は、NAD 合成経路の 1 つであるサル

ルベージ経路の酵素発現が減少していたためだと分かった。さらに、NAD 合成酵素 Nmnat3 が細胞質でオートファジーの特にリソソーム機能を亢進することを発見した。この Nmnat3 は転写因子 HIF1 によって発現を制御



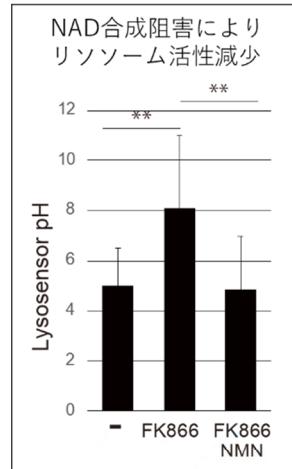
されていることも証明された。

細胞内 NAD 量とリソソーム機能には関連性があることを NAD 合成阻害剤である FK866 を用いて MEF 細胞で証明した。FK866 を MEF 細胞に添加するとリソソーム活性は減少した。さら

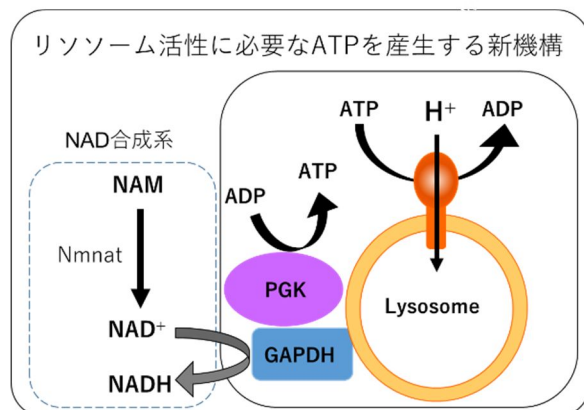


に NMN を添加すると減少したリソソーム活性が回復した。老化に伴い減少することが知られている NAD 合成量の低下は NMN を添加することで回復し、さらに機能低下を引き起こしていたリソソーム活性の回復にも効果があることが分かった。

さらにリソソーム活性には ATP が必須であることから、NAD と ATP の両者を関連づけるメカニズムとして解糖系酵素の GAPDH



と PGK に注目した。この 2 つの酵素がリソソーム膜に局在することを、超遠心による分画法やリソソーム膜の IP 実験など複数の実験方法で確認した。そして単離したリソソームにおいて NAD から ATP が産生されること、その反応には GAPDH と PGK が関与していたことを証明した。新たなメカニズムとして細胞質の NAD は GAPDH と PGK を介して ATP を産生しリソソーム機能を維持することを提唱した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yagi Mikako, Toshima Takahiro, Amamoto Rie, Do Yura, Hirai Haruka, Setoyama Daiki, Kang Dongchon, Uchiyumi Takeshi	4. 巻 e105268
2. 論文標題 Mitochondrial translation deficiency impairs NAD ⁺ mediated lysosomal acidification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020105268	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 Sasaki Katsuhiko, Uchiyumi Takeshi, Toshima Takahiro, Yagi Mikako, Do Yura, Hirai Haruka, Igami Ko, Gotoh Kazuhito, Kang Dongchon	4. 巻 40
2. 論文標題 Mitochondrial translation inhibition triggers ATF4 activation, leading to integrated stress response but not to mitochondrial unfolded protein response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20201289	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 Gotoh Kazuhito, Kunisaki Yuya, Mizuguchi Soichi, Setoyama Daiki, Hosokawa Kentaro, Yao Hisayuki, Nakashima Yuya, Yagi Mikako, Uchiyumi Takeshi, Semba Yuichiro, Nogami Jumpei, Akashi Koichi, Arai Fumio, Kang Dongchon	4. 巻 23
2. 論文標題 Mitochondrial Protein Synthesis Is Essential for Terminal Differentiation of CD45- TER119- Erythroid and Lymphoid Progenitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101654 ~ 101654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101654	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 Gotoh Kazuhito, Morisaki Takafumi, Setoyama Daiki, Sasaki Katsuhiko, Yagi Mikako, Igami Ko, Mizuguchi Soichi, Uchiyumi Takeshi, Fukui Yoshinori, Kang Dongchon	4. 巻 25
2. 論文標題 Mitochondrial p32/C1qbp Is a Critical Regulator of Dendritic Cell Metabolism and Maturation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1800 ~ 1815.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.10.057	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木美佳子
2. 発表標題 ミトコンドリアを介したリソソーム機能制御のメカニズム
3. 学会等名 生化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木 美佳子
2. 発表標題 ミトコンドリアを介したNAD+合成系がリソソームを制御する機構
3. 学会等名 生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木 美佳子
2. 発表標題 ミトコンドリアがオートファジーを制御する新機構
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八木 美佳子
2. 発表標題 ミトコンドリア機能低下がオートファジー障害を司る新規分子機構
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八木 美佳子
2. 発表標題 ミトコンドリア機能障害でみられたオートファジー抑制の分子機序
3. 学会等名 日本ミトコンドリア学会
4. 発表年 2018年

〔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