

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32686

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06072・19K21195

研究課題名(和文)リン酸化を介したミトコンドリア品質管理の調節機構

研究課題名(英文)Regulation of mitochondrial quality control through phosphorylation

研究代表者

川波 しおり(赤羽しおり)(KAWANAMI(AKABANE), Shiori)

立教大学・理学部・助教

研究者番号：70793355

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文):ミトコンドリアは細胞のエネルギー産出に重要なオルガネラである。PINK1とParkinを介したミトコンドリア品質管理機構により、機能のあるミトコンドリアが維持されている。ミトコンドリア品質管理が、cAMP/PKAシグナル伝達経路を介してMIC60とMIC19のリン酸化により調節されていることから、MIC60とMIC19のリン酸化の生理的意義および分子機構の解明を行った。変異体を用いた解析により、細胞内の局在に応じて、MIC60のリン酸化の挙動に違いが生じることが示された。またリン酸化MIC60を特異的に認識する抗体を用いて、細胞内におけるリン酸化MIC60の顕微鏡解析による検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による生理機能に応じたミトコンドリア品質管理の調節機構の解明は、これまであまり着目されてこなかった分野であり、今後のミトコンドリア品質管理の理解において必須であると考えられる。ミトコンドリア品質管理が細胞内情報伝達物質を介して調節されていることが明らかになることで、細胞環境がミトコンドリア分解不全の原因となる可能性が推測され、神経変性疾患における新たな発症機構の発見と新規治療薬の開発が期待される。また、本研究による細胞内情報伝達物質を介した調節機構の発見は、ミトコンドリア品質管理が多様な細胞機能の調節にも関与するという新たな可能性につながる。

研究成果の概要(英文):Mitochondria are important for cellular energy production. PINK1 and Parkin mediated-mitochondrial quality control keeps mitochondrial function. Mitochondrial quality control is regulated by the phosphorylation of MIC60 and MIC19 through cAMP/PKA signaling pathway, so we investigated physiological significance and molecular mechanism of MIC60 and MIC19-phosphorylation. We indicated that the degree of MIC60-phosphorylation is different, depending on its intracellular localization and detected MIC60-phosphorylation in mammalian cells by microscopic analysis using phosphorylated MIC60-specific antibodies.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリア品質管理 リン酸化修飾 MICOS PINK1 Parkin

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは生命活動のためのエネルギーを産生するが、同時に活性酸素種 (ROS) を発生する。このため、常に自身が酸化ストレスにさらされ障害が蓄積する。このような障害が蓄積したミトコンドリアは、積極的に細胞から排除されることで、ミトコンドリア全体の品質が保たれている。このミトコンドリア品質管理が正常に働かなくなると、様々な機能障害や疾患につながる。

近年、ミトコンドリア品質管理の詳細な分子メカニズムが明らかになってきた。障害を受けたミトコンドリアにおいてユビキチンリン酸化酵素 PINK1 とユビキチンリガーゼ Parkin が協同的に働くことで、ミトコンドリアのオートファジーによる分解が引き起こされる。一方で、ミトコンドリア品質管理は生理的条件下に於いて細胞側からも様々な調節を受けていると考えられるが、その調節機構については明らかではなかった。

2. 研究の目的

これまでに研究代表者は、ミトコンドリア品質管理が Protein Kinase A (PKA) によるリン酸化を介して調節されていることを明らかにした (Akabane *et al.*, *Mol Cell*. 2016)。PKA は、ミトコンドリア内膜タンパク質である MIC60 と MIC19 をリン酸化し、このリン酸化はミトコンドリアの品質管理機構を抑制することを見出した (図 1)。そこで本研究では、以下の 3 点に着目して、リン酸化を介したミトコンドリア品質管理の調節機構の解析を行い、ミトコンドリア品質管理が細胞環境に応じて分子レベルでどのように調節されているのか明らかにすることを目指した。

(1) ミトコンドリアタンパク質のリン酸化修飾はどこで起こるのか

リン酸化修飾は、細胞内シグナル伝達に関与し、タンパク質の機能調節に重要な役割を果たす。これまでに、細胞質で働く様々なリン酸化酵素やリン酸化タンパク質が同定されており、リン酸化修飾の分子機構や生理的意義が明らかになっている。しかしながら、これまで報告されてきたリン酸化修飾は全て細胞質におけるものであり、オルガネラ内におけるリン酸化は着目されてこなかった。オルガネラタンパク質のリン酸化による機能調節は多数報告されているにも関わらず、オルガネラ特有のリン酸化酵素はこれまで同定されておらず、オルガネラタンパク質が、翻訳後、どのようにリン酸化とオルガネラへの輸送を完了させているのかは明らかではなかった。

そこで本研究では、ミトコンドリア内膜タンパク質の MIC60 と MIC19 の PKA によるリン酸化の分子機構を明らかにすることで、ミトコンドリアタンパク質におけるリン酸化修飾の分子メカニズムの理解を目指した。MIC60 と MIC19 が、細胞質でリン酸化された後にミトコンドリアに輸送されるのか、ミトコンドリアに輸送された後にリン酸化されるのかは明らかではない (図 2)。細胞質でリン酸化される場合、その負電荷はどのように疎水性膜を通過して目的の局在までたどり着けるのか。ミトコンドリア内でリン酸化される場合には、ミトコンドリア固有のリン酸化酵素やシグナル伝達経路が存在することになる。MIC60 と MIC19 のリン酸化の分子機構の解明は、オルガネラタンパク質の翻訳後修飾における新たな知見を与えると考えられる。

(2) 細胞・個体レベルでのミトコンドリア品質管理の調節機構の可視化と生理的意義の解明

研究代表者はすでに、ミトコンドリア品質管理が MIC60 と MIC19 のリン酸化を介して調節されていることを明らかにしている。これは、MIC60 や MIC19 のリン酸化が検出される場所では、ミトコンドリア品質管理の調節が起きていることを示している。これまでは、ミトコンドリア品質管理が調節されていることが推測されても、実際に起きているのか、どういった生理的条件下に起きているのかは明らかになっていなかった。MIC60 と MIC19 のリン酸化を検出することで、これまで全くつかめなかったミトコンドリア品質管理の調節を細胞や個体レベルで可視化することができ、リン酸化の生理的意義を明らかにできると考えられる。

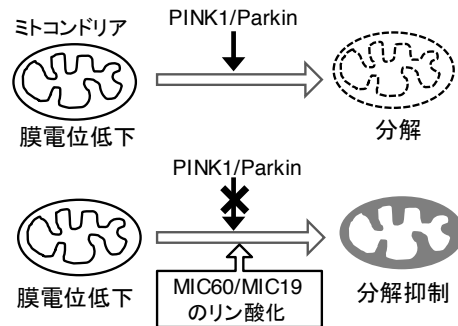


図1.リン酸化によるミトコンドリア品質管理の調節

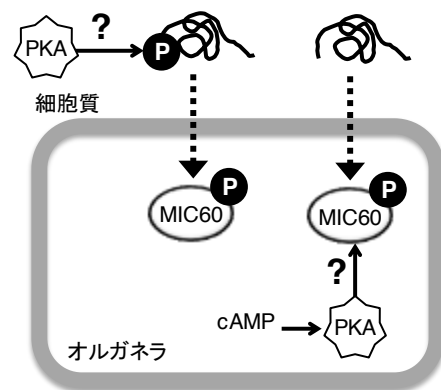


図2.オルガネラタンパク質のリン酸化

神経や筋肉では急激なエネルギー産生に伴ってミトコンドリア膜電位が大きく変化することが知られており、これらの組織におけるミトコンドリア品質管理の調節が推測される。このような組織において、MIC60 や MIC19 のリン酸化を指標としたミトコンドリア品質管理の調節を可視化することで、どのような生理機能においてミトコンドリア品質管理の調節が必要となるのか明らかにできる (図 3)。

(3) ミトコンドリア品質管理の調節の分子機構の解明

MIC60 と MIC19 は、PINK1 のミトコンドリア外膜上における安定化を促進することで、ミトコンドリア品質管理に関与する。MIC60 と MIC19 はミトコンドリア内膜に局在する MICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system) 複合体の主要因子である。ミトコンドリア品質管理において、ミトコンドリア内膜側からの関与はこれまでに報告がなく、ミトコンドリア形態の維持に重要な役割を果たす MIC60 と MIC19 が PINK1 の機能にどのように影響を及ぼすのかは明らかではない。ミトコンドリア品質管理は、細胞内情報伝達物質 cAMP とミトコンドリア内膜タンパク質を介して、細胞側とミトコンドリア側の両面から制御されていると考えられる。MIC60 と MIC19 を介したミトコンドリア品質管理の分子機構の解明により、オルガネラが細胞とどのように連携してその機能の調節を行っているか明らかにできると期待する。

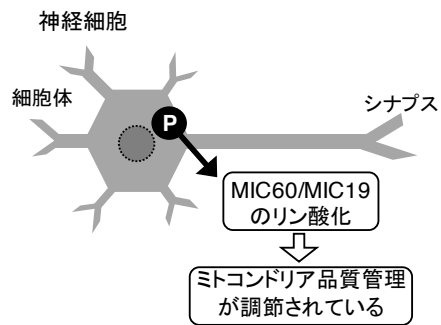


図3. MIC60/MIC19のリン酸化の検出によるミトコンドリア品質管理の調節の可視化

ミトコンドリア品質管理において、ミトコンドリア内膜側からの関与はこれまでに報告がなく、ミトコンドリア形態の維持に重要な役割を果たす MIC60 と MIC19 が PINK1 の機能にどのように影響を及ぼすのかは明らかではない。ミトコンドリア品質管理は、細胞内情報伝達物質 cAMP とミトコンドリア内膜タンパク質を介して、細胞側とミトコンドリア側の両面から制御されていると考えられる。MIC60 と MIC19 を介したミトコンドリア品質管理の分子機構の解明により、オルガネラが細胞とどのように連携してその機能の調節を行っているか明らかにできると期待する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリアタンパク質のリン酸化修飾はどこで起こるのか

リン酸化 MIC60 と MIC19 のミトコンドリアへの輸送能や細胞内局在を解析する。さらに、ヒトに存在する複数の PKA アイソフォームの局在と機能の解析により各 PKA の役割を決定する。これらを総合して、ミトコンドリアタンパク質のリン酸化の分子機構を明らかにする。

(2) 細胞・個体レベルでのミトコンドリア品質管理の調節機構の可視化と生理的意義の解明

神経細胞や筋肉組織において、リン酸化特異的抗体を用いた蛍光抗体法により、リン酸化 MIC60 と MIC19 の細胞内局在を解析する。PINK1 と Parkin の活性やミトコンドリア膜電位との相互関係を解析することで、ミトコンドリア品質管理の調節の生理的意義を明らかにする。

(3) ミトコンドリア品質管理の調節の分子機構の解明

PINK1 の安定化に関与する MIC60 と MIC19 の相互作用因子を探索し、その機能を解析することで、ミトコンドリア品質管理の調節の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアタンパク質のリン酸化修飾はどこで起こるのか

MIC60 の様々な変異体を HeLa 細胞で発現させ、リン酸化の挙動を比較した。結果として MIC60 の局在に応じてリン酸化の差が見られた。また MIC60 と MIC19 のミトコンドリアへの輸送能がリン酸化修飾により影響を受けるか解析を行い、リン酸化体と非リン酸化体のミトコンドリアへの輸送能を比較した。

(2) 細胞・個体レベルでのミトコンドリア品質管理の調節機構の可視化と生理的意義の解明

リン酸化 MIC60 およびリン酸化 MIC19 を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成した。これを用いて、免疫蛍光法により MIC60 と MIC19 のリン酸化の細胞内局在について解析を行った。免疫蛍光法において様々な解析条件を検討し、リン酸化 MIC60 の細胞内での検出に成功した。今後はこの条件を基にして、リン酸化 MIC60 を細胞内で可視化し、MIC60 および MIC19 のリン酸化について生理的意義の解明に迫る。

(3) ミトコンドリア品質管理の調節の分子機構の解明

内膜に局在する MIC60 と MIC19 は、PINK1 の外膜における安定化を促進することで、ミトコンドリア品質管理に関与する。そこでいくつかのミトコンドリアタンパク質についてノックダウンを行い、MIC60 および MIC19 と PINK1 や Parkin の機能に影響が生じるか解析を行った。また相互作用解析により、MIC60/MIC19 と PINK1 を繋ぐ因子について調べ、MIC60 と MIC19 を介したミトコンドリア品質管理の調節の分子機構について解析を進めた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakamura Seiko, Matsui Aiko, Akabane Shiori, Tamura Yasushi, Hatano Azumi, Miyano Yuriko, Omote Hiroshi, Kajikawa Mizuho, Maenaka Katsumi, Moriyama Yoshinori, Endo Toshiya, Oka Toshihiko	4. 巻 3
2. 論文標題 The mitochondrial inner membrane protein LETM1 modulates cristae organization through its LETM domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0832-5	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤羽しおり、岡 敏彦
2. 発表標題 Regulation of mitochondrial quality control in response to cellular environment
3. 学会等名 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

立教大学 理学部生命理学科 岡研究室 https://www2.rikkyo.ac.jp/web/oka_lab/index.html

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
---------------------------	-----------------------	----