

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570185

研究課題名（和文） ミトコンドリア形態制御因子の網羅的検索とその機能解析

研究課題名（英文） Analysis of mitochondrial proteins required for regulation of mitochondrial morphology

研究代表者

岡 敏彦 (OKA TOSHIHIKO)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：40263321

研究成果の概要 和文 ミトコンドリアの形態形成・維持に働く因子を網羅的に検索するため、線虫を用いて RNA 干渉法により、ほぼ全てのミトコンドリアタンパク質遺伝子と分子モーター遺伝子をスクリーニングした。その結果、新規遺伝子 MICS1 と KLP6 を見出しそれぞれがミトコンドリアの内膜構造維持と細胞内移動に働くことを明らかにした。

研究成果の概要 英文 To identify genes for regulation of mitochondrial morphology, we applied a feeding RNA interference in nematode *C. elegans*, and searched genes for mitochondrial proteins and molecular motors. We showed that MICS1 and KLP6 are required for mitochondrial morphology and transport, respectively.

交付決定

金 単位 円

	直接経費	間接経費	合計
年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野 細胞生物学

科研費の分科・細目 細胞生物学

キーワード ミトコンドリア、形態形成、MICS1、KLP6

研究開始当初の背景

細胞内小器官 オルガネラ の形態は、その機能と密接に結びついている。特に、本研究で着目するミトコンドリアは、細胞周期や細胞のエネルギー状態の応じてダイナミックにその形態を変化 ネットワーク状《断片状》することが知られている。これまで、ミトコンドリア形態に関連する因子は幾つか同定されてきているが、ミトコンドリア機能 呼吸・beta 酸化など に直接関与する因子の研究に比べると、その数は少ないと言わざるを得ない。また、これまでの研究は、無細胞系を用いた生化学的なものや、単細胞真核生物である酵母を用いた遺伝学的なアプローチが主であり、様々な分化した多細胞真核

生物でのオルガネラの役割を理解する上で十分な手法ではなかった。

研究の目的

本研究では多細胞生物でのミトコンドリア形態を制御する因子の機能を明らかにすることにより、ミトコンドリア形態の制御が細胞機能に果たす役割を総合的に理解することを目指している。これにより、ヒトのミトコンドリア病などのオルガネラ機能欠損に由来する疾患を理解する基盤を得たいと考えた。

具体的には、線虫 *C. elegans* を多細胞真核生物のモデルとして使い、RNA 干渉法に

より個々の遺伝子発現を抑圧することでミトコンドリア形態に関連する因子を全ゲノムレベルでスクリーニングを行う。

ミトコンドリアタンパク質のスクリーニングから見つかった新規ミトコンドリア形態関連因子の中で、ネットワーク上に多くのドットを形成するという特有のミトコンドリア形態を示す K11H12.8 (MICS1) 遺伝子の解析を進める。

これまでの研究から、酵母などの単細胞生物ではアクチンフィラメントが、多細胞真核生物では微小管がミトコンドリアの移動やネットワーク形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。特に、ほ乳類では KIF1B や KIF5B がミトコンドリアと結合し、微小管に沿った移動に関与することが報告されている。線虫の全分子モーター遺伝子の検索から、複数のキネシンがミトコンドリアの形態に影響を与えることが明らかにした。その中で、KLP-6 遺伝子はほ乳類に相同遺伝子が見つかっておらず、新規のミトコンドリア関連のキネシンであることが期待された。

私たちは、ラット肝臓より線虫 KLP-6 の相同遺伝子をクローニングした。本研究では、新しくクローニングしたキネシン分子がどのような様にミトコンドリアの移動に関わるのかを明らかにする。

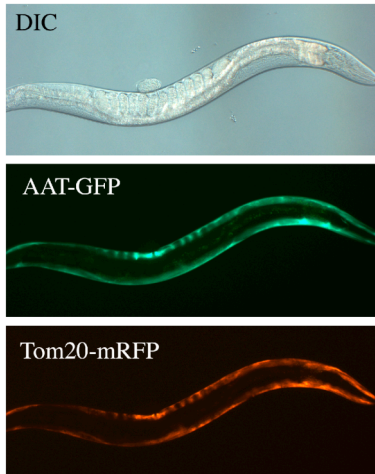


図1 体壁筋のミトコンドリアを可視化した線虫

研究の方法

本研究で用いられる線虫 *C. elegans* は、GFP 又は mRFP との融合した Tom20 ミトコンドリア外膜

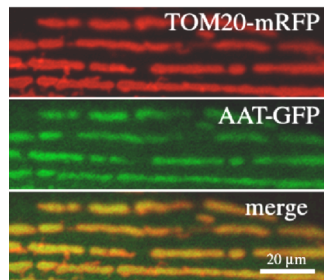


図2 体壁筋のミトコンドリアの拡大図

や AAT マトリックス が

筋肉 体壁筋 または腸に特異的に発現している形質転換体で、 顕微鏡で可視化ミトコンドリアが観察できるように我々が作成した 図 図 。

RNA 干渉法により個別に遺伝子発現を抑圧できるライブラリー 線虫の全遺伝子の を網羅する を用いて、GFP で可視化されたミトコンドリアの形態に影響を与える遺伝子を網羅的に検索・同定した後、幾つかの機能グループに分 することで個々のグループごとに機能解析を進める。

研究成果

RNA 干渉法により個別に遺伝子発現を抑圧できるライブラリーと、GFP との融合した Tom20 が筋肉 体壁筋 または腸に特異的に発現している形質転換体の線虫を用い、蛍光 顕微鏡下で可視化ミトコンドリアを観察することで、ミトコンドリアの形態に影響を与える遺伝子を全ミトコンドリアタンパク質をコートする遺伝子群を網羅的に検索・同定していた。その結果、特定の機能グループの遺伝子群に偏ることなく、ミトコンドリアの基本的な活性 呼吸や beta 酸化など の低下は、ミトコンドリアの断片化を引き起こす。この解析結果を論文 (Ichishita et al., 2008) として報告した。

スクリーニングよりこれまで見つかった新規ミトコンドリア形態関連因子の中で、K11H12.8 は、RNA 干渉法によりネットワーク上に多くのドットを形成するという特有の形態を示した。私たちはヒト HeLa 細胞より K11H12.8 の相同遺伝子をクローニングし、MICS1 と名付けた。この遺伝子の発現抑制は、予想通り HeLa 細胞のミトコンドリアのネットワーク上に多くのドットを形成するという特有の表現型を示した。また、過剰発現やノックダウンの実 験から、アポトーシス誘導時のミトコンドリアからのシトクロム C の遊 が MICS1 遺伝子発現量に正比例して減少することから、アポトーシスの進行を負に制御していることも明らかとなった。

それとは独立に、事が、MICS1 をノックダウンした HeLa 細胞でのクリステ構造が 著 しく減少していた事より MICS1 がクリステ構造の維持に働いていることが示された。そこで、MICS1 過剰発現ではクリステ構造の増加が予想されたので、MICS1 を一過的に過剰発現した HeLa 細胞を免疫 子 顕微鏡解析した。予想とは異なり、MICS1 を過剰発現したミトコンドリアのクリステは 著 しく減少していた事から、

MICS1は量的にクリステ膜の数を制御していないことが明らかとなった。これらの一部の結果は論文(Oka et al., 2008)として報告した。

私達はミトコンドリアの形態スクリーニングで線虫KLP-6を新たなミトコンドリア形態制御因子として同定した。KLP-6はキネシン分子属し、哺乳類ではまだ相同分子が同定されていなかったため、ラット脳と肝臓のcDNAよりラットKLP6をクローニングした。モータードメインを欠失したタンパク質をHeLa細胞に発現させるとミトコンドリア形態に異常を示し、線虫と同様の表現形が得られた。さらに、タイムラプス 顕微鏡を用いてミトコンドリアの移動速度を測定したところ、程度も減少していた。この結果より、KLP6が動物細胞でのミトコンドリアの移動に働くことが示された。次に、同じ欠損体を神経芽腫細胞 neuro 2aに発現させると、神経軸索でのミトコンドリア輸送に 著な遅延が観察された。これは、KLP6のノックダウンでも同様だったため、ミトコンドリアの神経軸索移動にも働いていることが明らかとなった。これまでに、神経軸索でのミトコンドリアの移動には、 一つのキネシン(KIF5/KHC, KIF1Ba)が関与していることが知られている。そこで、KLP6を含めた 一つのキネシンの変異体をneuro2a細胞に導入し、その機能的分担を検討した。その結果、KIF5/KHCは細胞体から軸索へのミトコンドリアの移動に、またKLP6とKIF1Baは神経軸索での移動に重要であることが明らかとなった。加えて、KLP6とKIF1Baは共通の結合因子であるKBPを共有しており、これによりお互いの機能的協調が推察された。これらの結果により、KLP6はミトコンドリア移動に関与する新たなキネシンであることが証明された。これ内容は論文(Tanaka et al., 2011)として報告した。

主な発表論文等

研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線

〔雑誌論文〕 計 件

Oka, T., Sayano, T., Tamai, S., Yokota, S., Kato, H., Fujii, G., and Mihara, K. (2008) Identification of a novel protein MICS1 that is involved in maintenance of mitochondrial morphology and apoptotic release of cytochrome c. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2597-2608. 査読有り

Ichishita, R., Tanaka, K., Sugiura, Y., Sayano, T., Mihara, K., and Oka, T. (2008) An RNAi screen for mitochondrial proteins required to maintain the morphology of the organelle in *C. elegans*. *J. Biochem.* **143**, 449-454. 査読有り

Tanaka, K., Sugiura, Y., Ichishita, R., Mihara, K., and Oka, T. (2011) KLP6, a new kinesin regulating morphology and transport of mitochondria in neuronal cells. *J. Cell Sci.* *in press* 査読有り

〔学会発表〕 計 件

日本細胞生物学会 平成 年 月 日
パシフィコ横浜 「新規ミトコンドリアタンパク質 MICS1 の機能解析」

日本生化学会・日本分子生物学会合同大会 平成 年 月 日 神戸ポートアイランド 「Regulation of mitochondrial morphology and cristae organization」

American Society of Cell Biology 平成 年 月 日
米国サンディエゴコンベンションセンター 「MICS1 is involved in maintenance of mitochondrial morphology and apoptotic release of cytochrome c」

日本蛋白質科学会 平成 年 月 日
熊本全日空ホテルニュースカイ 「ミトコンドリア AAA 蛋白質とその生理機能」

日本生化学会・日本分子生物学会合同大会 平成 年 月 日 神戸ポートアイランド「ミトコンドリアの形態形成と軸索移動に関わる新規キネシンの機能解析」

〔図書〕 計 件

大寺秀典、岡 敏彦 (2010) 「ミトコンドリア膜構造変化とアポトーシス制御」細胞工学 29, 438-442.

研究組織

(1) 研究代表者

岡 敏彦 OKA TOSHIHIKO
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号

研究者番号

(3) 連携研究者

研究者番号