

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06069

研究課題名（和文）ミトコンドリアストレスに応答した細胞骨格制御の分子機構解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of cytoskeletal regulation in response to mitochondrial stress

研究代表者

谷村 進（Tanimura, Susumu）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授

研究者番号：90343342

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ミトコンドリアストレスに応答した細胞骨格制御の分子機構解明を目指した。その成果として、ミトコンドリアストレスに反応してマイトファジーが誘導される際に、ミトコンドリアから放出された脱リン酸化酵素PGAM5が、微小管の安定化を誘導すること、アクチン結合タンパク質であるcortactinの脱リン酸化と分解を誘導することを見出した。これらは、PGAM5が損傷を受けたミトコンドリアの状態を感知し、それを細胞骨格に伝達することで細胞応答を調節する可能性を示しており、ミトコンドリアストレスを起点とした細胞骨格制御の新たな分子機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、細胞の生死をコントロールするミトコンドリアが、その損傷の程度に応じて細胞骨格を制御する可能性、またそれが脱リン酸化によって制御される可能性を示した点にある。リン酸化・脱リン酸化は可逆的な反応であることから、ミトコンドリアの損傷の程度に対して柔軟に対応することができる。よって、本研究はストレスシグナルに対して適切な細胞応答を誘導する上での細胞骨格制御の重要性を示しており、今後その調節機構のさらなる解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of cytoskeletal regulation in response to mitochondrial stress. We revealed that PGAM5, a protein phosphatase cleaved and released from mitochondria during mitophagy in response to mitochondrial stress, induces microtubule stabilization and the dephosphorylation and degradation of cortactin, an actin-binding protein. These findings indicate that PGAM5 may regulate cellular responses by sensing the state of damaged mitochondria and transmitting the signal to the cytoskeleton, revealing a novel molecular mechanism of cytoskeletal regulation initiated by mitochondrial stress.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリアストレス マイトファジー リン酸化 細胞骨格 微小管 アクチン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞障害性ストレスを受けたミトコンドリアでは、内膜を隔てた膜電位の低下や、活性酸素種の過剰産生、ミトコンドリア DNA の損傷などが起きる。このような障害は、単にエネルギー産生の中核としての機能を失うだけでなく、積極的に細胞死を誘導することになるため、機能を維持できなくなったミトコンドリアはオルガネラ選択的なオートファジーの一つであるマイトファジーによって積極的に分解除去される。

これはミトコンドリアにとっては受動的な現象に見えるが、ミトコンドリアには自身の障害の程度を感知してマイトファジーを制御する機構が備わっており、状況に応じてそれを発動させることでストレス応答を適切にコントロールしていると考えられる。

ミトコンドリアの膜電位低下に伴って誘導される典型的なマイトファジーでは、ユビキチンリガーゼである Parkin によるミトコンドリア外膜の破壊の後、ミトコンドリアはオートファゴソームに取り込まれ、やがてリソソームと融合して分解される。我々はこの過程で細胞骨格である微小管が高度に安定化されること、すなわちミトコンドリアストレスが細胞骨格の変化を誘導することを見出していた。細胞骨格はオルガネラの細胞内輸送や配置を調節すると同時に細胞内シグナル伝達の足場としても働くことから、ミトコンドリアストレスが細胞骨格の制御を介してマイトファジーを調節していると予想し、それがどのような機構によるものなのか、そしてその生物学的意義が何かを明らかにすることとした。

## 2. 研究の目的

我々は、自身の N 末端の膜貫通ドメインを介してミトコンドリア内膜に局在しているプロテインホスファターゼ PGAM5 が、ミトコンドリアストレスによって膜貫通ドメイン内で切断されて内膜への局在化を失い、さらにはミトコンドリア外膜の破壊に伴って細胞質へと放出されることを明らかにしていた。さらに、切断型 PGAM5 はホスファターゼ活性に依存して微小管に局在し、微小管を安定化させる可能性を見出していた。よって、ミトコンドリアストレスに応答した微小管の制御の少なくとも一部はミトコンドリアから放出された PGAM5 によるものと考えられた。

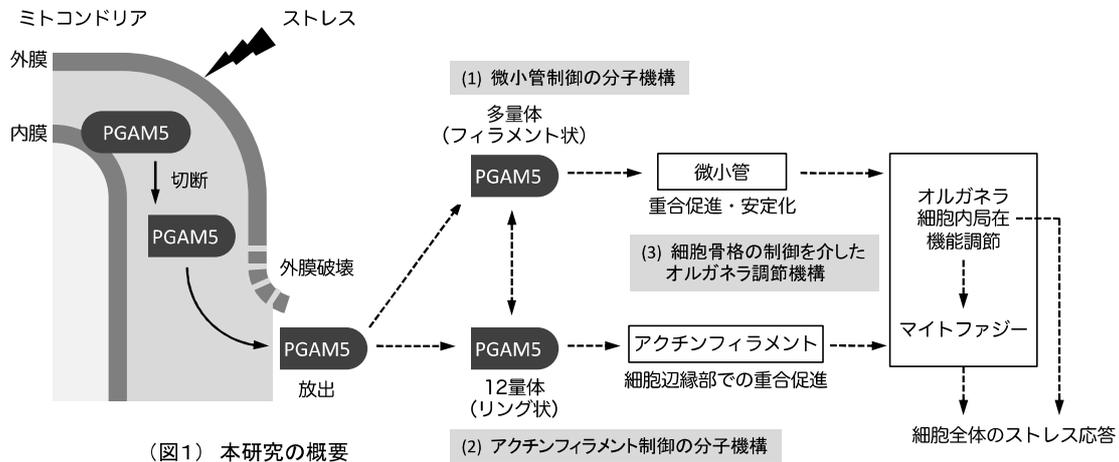
また、切断型 PGAM5 がホモ 2 量体を形成し、これが基になってリング状の 12 量体を形成することを明らかにしており、他の研究グループからも PGAM5 の 12 量体が連なってフィラメント状の多量体を形成することが報告された。このような知見に基づいて多量体形成能をなくした PGAM5 変異体の挙動を解析したところ、細胞の辺縁部に局在し、糸状仮足様の細胞形態の変化を起こすことが分かった。糸状仮足はアクチンフィラメントの重合によって形成される特徴的な構造であることから、PGAM5 が多量体化の程度に応じてアクチンフィラメントの形成を制御すると考えられた。

一方、我々は、微小管結合タンパク質である MAP7 や、アクチンフィラメント制御因子である Cortactin を PGAM5 の結合分子として見出していたことから、PGAM5 の細胞骨格への積極的な関わりが強く示唆されていた。

マイトファジーと細胞骨格の関連については、ミトコンドリアの細胞内輸送を担う微小管モータータンパク質と結合するミトコンドリア外膜分子の動態や、リソソームやオートファゴソームの輸送や互いの融合に微小管やアクチンフィラメントが重要な役割を担っていることなどが注目されていたが、ミトコンドリア局在分子が積極的に細胞骨格を制御するという現象にはまだ関心は集まっていなかった。また、PGAM5 の研究には国内外の多くのグループが参画しているが、PGAM5 のミトコンドリアストレスによる切断と局在変化に着目した報告は少なく、PGAM5 の局在変化に基づいた分子機能の解析を進めることで、ミトコンドリアストレスが起点となる細胞骨格の制御機構を解明し、新たなミトコンドリアストレス応答の分子機構を独自の視点で明らかにできると考えられた。

これらを踏まえて、本研究ではミトコンドリアストレスに応答した細胞骨格の制御が細胞全体のストレス応答にどのように働くかについて、以下の 3 項目に着目した解析を進めることで、その分子機構の解明を目指した (図 1)。

- (1) ミトコンドリアストレスに応答した微小管制御の分子機構
- (2) ミトコンドリアストレスに応答したアクチンフィラメント制御の分子機構
- (3) ミトコンドリアストレスに応答した細胞骨格の制御を介したオルガネラ調節機構



### 3. 研究の方法

マイトファジーの解析には、ミトコンドリア脱分極剤投与でマイトファジーを簡便かつ再現性高く誘導することができる Parkin 安定発現 HeLa 細胞 (Parkin-HeLa) と、それをもとに樹立した PGAM5 ノックアウト細胞 (Parkin-HeLa-PGAM5-KO) を用いた。また、PGAM5 の機能解析には、一過性の過剰発現系や発現抑制系に加え、PGAM5 誘導発現型 HeLa 細胞を利用した。

#### (1) ミトコンドリアストレスに応答した微小管制御の分子機構

PGAM5 多量体形成を介した制御：多量体形成能をなくした PGAM5 変異体の細胞内局在を間接免疫蛍光法によって解析し、安定化微小管の指標である  $\alpha$ -チューブリンのアセチル化によって微小管に与える影響を解析した。

微小管結合タンパク質を介した制御：PGAM5 結合分子として同定した微小管結合タンパク質 MAP7 に対する作用を解析した。共免疫沈降法により PGAM5 と MAP7 の結合を検討するとともに、ミトコンドリアストレスや PGAM5 の過剰発現あるいは発現抑制での MAP7 のリン酸化状態の変化を解析した。また、MAP7 の細胞内局在を間接免疫蛍光法により解析した。さらに、PGAM5 と MAP7 発現抑制が微小管へ及ぼす影響を検討した。

#### (2) ミトコンドリアストレスに応答したアクチンフィラメント制御の分子機構

アクチンフィラメント制御因子を介した制御：PGAM5の結合分子として同定したCortactinはアクチンフィラメントと結合するとともにアクチン重合の核となるArp2/3複合体と相互作用することでアクチンフィラメントの形成を促進する。微小管結合タンパク質MAP7と同様に、共免疫沈降法による結合解析と合わせて、ミトコンドリアストレス、PGAM5の過剰発現あるいは発現抑制でのCortactinのリン酸化状態と細胞内局在の変化を解析した。また、CortactinについてはPGAM5によって調節されるリン酸化部位の特定を行なった。

#### (3) ミトコンドリアストレスに応答した細胞骨格の制御を介したオルガネラ調節機構

オルガネラの細胞内局在と活性に及ぼす影響：細胞骨格はオルガネラの輸送、配置、形成に影響を及ぼすことから、オルガネラ特異的マーカーを利用して、ミトコンドリアストレスおよびPGAM5、MAP7、Cortactinの過剰発現や発現抑制が、ミトコンドリアやリソソーム等のオルガネラの局在と活性に及ぼす影響、またマイトファジーと細胞死の誘導に及ぼす影響を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ミトコンドリアストレスに応答した微小管制御の分子機構

マイトファジーの過程で切断されてミトコンドリアから放出された PGAM5 の一部が微小管に局在すること、また PGAM5 は微小管の安定化の指標となる  $\alpha$ -チューブリンのアセチル化を促進することを明らかにした。さらに、PGAM5 の多量体形成能変異体を用いた解析により、PGAM5 の微小管局在と  $\alpha$ -チューブリンアセチル化の促進には PGAM5 のフィラメント形成能が必要であることが分かった。また、マイトファジーの過程における  $\alpha$ -チューブリンアセチル化の上昇は、単なるミトコンドリアストレス (膜電位の低下) によって起きるのではなく、マイトファジーの誘導に起因することを見出した。

切断型 PGAM5 は微小管結合タンパク質 MAP7 と結合すること、またその結合部位は MAP7 の微小管結合領域を含む N 末端側にあることを明らかにした。一方、切断型 PGAM5 を発現させても定常状態における MAP7 のリン酸化状態には大きな変化は認められなかった。また、マ

イトファジーの誘導過程において、Parkin-HeLa細胞とParkin-HeLa-PGAM5-KO細胞の間でMAP7のリン酸化状態に大きな違いは認められなかった。一方、 $\alpha$ -チューブリンのアセチル化は、PGAM5とMAP7の発現抑制によって低下した。よって、PGAM5はMAP7の脱リン酸化を介してではなく、MAP7との相互作用を介して $\alpha$ -チューブリンのアセチル化状態に作用する可能性が示された。

## (2) ミトコンドリアストレスに応答したアクチンフィラメント制御の分子機構

アクチンフィラメント制御因子 Cortactin の欠失変異体を用いた解析により、PGAM5はCortactinのアクチンフィラメント結合部位を含む領域に結合することが分かった。また、細胞分画・共免疫沈降法によってマイトファジーの過程で細胞質に放出された切断型PGAM5がCortactinと結合することを明らかにした。さらに、PGAM5によって誘導されるCortactinの脱リン酸化部位を同定した。

Parkin-HeLa細胞においてマイトファジーを誘導するとCortactinの脱リン酸化が誘導されることが分かった。また、Parkin-HeLa-PGAM5-KO細胞ではCortactinの脱リン酸化が低下することを見出した。すなわち、マイトファジーの過程においてPGAM5はCortactinの脱リン酸化を誘導する可能性が示された。

さらに、Cortactinはマイトファジーの誘導過程で分解されることが明らかとなった。Parkin-HeLa-PGAM5-KO細胞ではCortactinの分解が抑制されることから、PGAM5によるCortactinの脱リン酸化制御がCortactinの安定性に影響を及ぼすと考えられた。

## (3) ミトコンドリアストレスに応答した細胞骨格の制御を介したオルガネラ調節機構

マイトファジーの誘導過程で、細胞質にPGAM5が放出された細胞では、リソソームの活性化が低下することが分かった。そのような細胞ではカスパーゼの活性化が認められたことから、細胞死が促進されることが示唆された。また、Parkin-HeLa-PGAM5-KO細胞ではマイトファジーの進行が促進され、その一方で細胞死は抑制された。

Cortactinの発現を抑制するとマイトファジーの過程で細胞死の誘導が促進されたことから、PGAM5はCortactinの制御を介してミトコンドリアストレスに対する細胞応答を調節する可能性が示された。

これらの研究成果は、ミトコンドリアに局在するプロテインホスファターゼPGAM5が損傷を受けたミトコンドリアの状態を感知し、それを細胞骨格に伝達することで細胞応答を調節する可能性を示しており、ミトコンドリアストレスを起点とした細胞骨格制御の新たな分子機構の一端が明らかになったと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kinoshita Akira, Ohyama Kaname, Tanimura Susumu, Matsuda Katsuya, Kishino Tatsuya, Negishi Yutaka, Asahina Naoko, Shiraishi Hideaki, Hosoki Kana, Tomiwa Kiyotaka, Ishihara Naoko, Mishima Hiroyuki, Mori Ryoichi, Nakashima Masahiro, Saitoh Shinji, Yoshiura Koh-ichiro	4. 巻 148
2. 論文標題 Itp1 regulates the formation of anterior eye segment tissues derived from neural crest cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.188755	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 Takouda Jun, Nakamura Moeka, Murasaki Akane, Shimosako Waka, Hidaka Aoi, Honda Shino, Tanimura Susumu, Ishibashi Fumito, Kawasaki Norihiko, Ishihara Jun, Fukuda Tsutomu, Takeda Kohsuke	4. 巻 47
2. 論文標題 Identification of Azalamellarin N as a Pyroptosis Inhibitor	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 28 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b23-00569	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 昂海、谷村 進、馬場 大暉、大山 要、武田 弘資
2. 発表標題 切断型PGAM5は微小管結合タンパク質MAP7と結合する
3. 学会等名 第39回 日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 優稀、谷村 進、有田 瑞基、武田 弘資
2. 発表標題 切断型PGAM5はアクチン結合タンパク質Cortactinを脱リン酸化する
3. 学会等名 第39回 日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場 大暉、谷村 進、武田 弘資
2. 発表標題 ディープラーニングを活用したミトコンドリア形態解析手法の構築
3. 学会等名 第21回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 甲斐 公人、竹生田 淳、中村 萌香、是枝 杏佳、杉山 拓朗、陣内 昌太、黒岩 めぐみ、村崎 茜、谷村 進、田中 義正、武田 弘資
2. 発表標題 海洋微生物抽出物ライブラリーを用いたプロテインホスファターゼPGAM5阻害剤の探索
3. 学会等名 2022年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場 大暉、谷村 進、山口 文音、八谷 早紀、武田 弘資
2. 発表標題 マイトファジーの過程で切断型PGAM5は核に移行しプロテインホスファターゼとして機能する
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場 大暉、谷村 進、山口 文音、八谷 早紀、武田 弘資
2. 発表標題 マイトファジーの過程で切断型PGAM5は核に移行しプロテインホスファターゼとして機能する
3. 学会等名 第20回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 昂海、馬場 大暉、有田 瑞基、竹生田 淳、武田 弘資、谷村 進
2. 発表標題 ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼPGAM5によるマイトファジー過程での微小管の制御
3. 学会等名 ミトコンドリア・サイエンス・ワークショップ(MSW2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馬場 大暉、谷村 進、武田 弘資
2. 発表標題 Wet研究者による、Wet研究者のためのオルガネラ画像解析パイプラインOrgaMeasの開発と応用
3. 学会等名 ミトコンドリア・サイエンス・ワークショップ(MSW2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上 昂海、馬場 大暉、有田 瑞基、竹生田 淳、武田 弘資、谷村 進
2. 発表標題 ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼPGAM5によるマイトファジー過程での微小管の制御
3. 学会等名 第22回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷村 進、有田 瑞基、井上 昂海、馬場 大暉、竹生田 淳、武田 弘資
2. 発表標題 マイトファジー過程における切断型PGAM5によるアクチン結合タンパク質Cortactinのリン酸化制御
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹生田 淳、是枝 杏佳、杉山 拓朗、甲斐 公人、陣内 晶太、永野 彰大、永野 颯人、下窄 和茅、谷村 進、 田中 義正、武田 弘資
2. 発表標題 海洋微生物抽出物ライブラリーを活用した創薬
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馬場 大暉、谷村 進、武田 弘資
2. 発表標題 ミトコンドリアのストレス応答における新奇の細胞質mRNA顆粒の形成
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上 昂海、馬場 大暉、有田 瑞基、竹生田 淳、武田 弘資、谷村 進
2. 発表標題 ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼPGAM5によるマイトファジー過程での微小管の制御
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akimi Inoue, Taiki Baba, Jun Takouda, Kohsuke Takeda, Susumu Tanimura
2. 発表標題 Regulation of microtubules by mitochondrial protein phosphatase PGAM5 during mitophagy
3. 学会等名 The 5th Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase, The 11th Japanese Conference on Protein Phosphatase
4. 発表年 2024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
研究 分担 者	武田 弘資  (Takeda Kohsuke)  (10313230)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授   (17301)	

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