

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370071

研究課題名（和文）ミトコンドリアダイナミクスの制御機構

研究課題名（英文）Regulation of mitochondrial dynamics in mammals

研究代表者

三原 勝芳（MIHARA KATSUYOSHI）

九州大学・医学研究院・名誉教授

研究者番号：40029963

研究成果の概要（和文）：

(1) ミトコンドリア (Mt) の分裂に関わる細胞質の因子 Drp1 のノックアウト (KO) マウスの作成に始めて成功し、全身 Drp1-KO ならびに神経 Drp1-KO マウスの個体ならびに細胞での表現系の解析を行った。さらに肝臓、膵臓 beta-細胞、心筋、卵巣での Drp1-KO マウスを作製し解析を行っている。(2) Mt 外膜上の Drp1 受容体は不明であったが我々は従来考えられていた Fis1 ではなく新規な外膜蛋白質 Mff が受容体として働くことを始めて明らかにした。(3) 神経の Mt 軸索輸送に関わる新規な因子 KLP6 の同定に成功した。(4) Rab-GAP タンパク質 TBC1D15 がその受容体であることを明らかにした。(5) rp1 の機能を抑制するとマトリクス内の mtDNA-タンパク質複合体のサイズが増大する現象を見だし、これがクリステ構造を安定化することでアポトーシスを抑制することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Following results were obtained under this project:

(1) Generation and phenotype analysis of whole body and neuron-specific Drp1-KO mice. Tissue-specific Drp1-KO mice including liver, oocyte, heart muscle, and pancreatic beta-cell have been generated and their phenotypes are now under investigation. (2) Identification of Mff of mitochondrial outer membrane (MOM) as the major Drp1 receptor. (3) Identification of a new KIF family protein KLP6 functioning as an axonal mitochondria transport motor. (4) Identified a Rab-GAP protein TBC1D15 as the ligand of MOM hFis1 protein involved in mitochondrial morphology regulation. (5) Demonstration that Drp1 depletion or inhibition of its function increases mitochondrial nucleoid size concomitant with the mitochondrial network extension and formation of tightly packed cristae structure as a response to prevent cells from apoptotic death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能、ミトコンドリアダイナミクス

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア(Mt)は外膜、内膜2つの膜に囲まれ好氣的ATP産生のほか、カルシウムシグナル伝達やアポトーシスに中心的な役割を果たす。網目状・チューブ状構造をとって細胞内に張り巡らされたMtは細胞の分化や病変に応じて分裂と融合を介してダイナミックに構造を変化させ機能変換をはかる。たとえばアポトーシス時には断片化して膜間スペースのアポトーシス因子(シトクロムCが主役)を放出し死のカスケードを作動させる。Mtの分裂・融合に関わる主要な因子として哺乳類では4つの高分子量GTPaseが知られている。細胞質からリクルートされてMt分裂に関わるダイナミン様蛋白質Drp1、外膜の融合因子Mfn1とMfn2、内膜の融合と構造維持に関わる膜間スペース(内膜結合)のOPA1である。Mtの分裂・融合の生理的意義は次第に明らかになっているが、反応機構については関与する因子も含めて不明な点が多い。

Mtの融合・分裂の調節に関しては酵母の遺伝学的解析が先行し、一部ショウジョウバエの研究も加わって3種類の高分子量GTPaseが同定され解析が進められていた。酵母を用いた研究ではM. Yaffe(米)、J. Shaw(米)、J. Nunnari(米)、H. Sesaki(米)らが遺伝学的な解析で成果をあげている。哺乳類では融合に関わる2つの因子(Mfn2、OPA1)が神経変性疾患の原因遺伝子であることからMt分裂の生理的重要性が認識され、さらにMfn1、Mfn2、OPA1のKOマウスが作成されて融合の機能解析が進められていたが分裂に関しては格別の進展がなかった。しかしMtがアポトーシスの中心的役割を果たす(膜間スペースにシトクロムc、Smac/Diabro、HtrA2/Omi、AIFなどを貯留し、分裂を伴いつつそれらを放出して死のカスケードを作動させることが明らかとなり、Mtの分裂がにわかに注目されることとなった。この中でR. Youle(米)

はMt形態とアポトーシスの関連を最も着実に研究しており、D. Chan(米)はMt融合の障害と神経変性疾患の関連を詳細に解析している。この間我々は哺乳類のMt外膜の融合因子Mfn1,2の同定、外膜の分裂因子Fis1のドメイン解析、内膜のGTPaseOPA1のプロセッシングを介したMt融合調節機構の発見、アポトーシスシグナルを受けた内膜AIFのプロセッシングとMt外への放出、Mfnの活性を調節する必須因子MIBの同定、Drp1のリン酸化によるM期のMt分裂の調節の発見など、短時間に着実に成果をあげてきた。さらにDRP1のKOマウス(全身、脳)の作成に成功し、Drp1が胚発生とシナプス形成に必須である事を見いだしてMt分裂反応の高次機能調節への関与を初めて明らかにすることが出来た。これらの因子を含む融合装置と分裂装置(いずれも複合体)の構成成分の解析、膜を分裂・融合させる分子機構、融合・分裂における外膜と内膜の共役機構、これらのシステムによるアポトーシス因子放出の調節機構などが今後の問題として残っている。

## 2. 研究の目的

本申請では[1] Drp1が駆動するMt分裂機構の解析と、[2] 内膜の融合因子OPA1複合体の解析に基づいた外膜融合系と内膜融合系の共役の解析、を行う。具体的には我々が作成したDrp1-KO細胞を活用しつつ下記の手法によってDrp1がMtに集積する機構と集積したDrp1を含む分裂装置複合体の解析、OPA1を主役とする内膜の形態調節装置複合体の解析に基づいた外膜融合装置との共役の解析を行う。

## 4. 研究成果

(1)ミトコンドリア(Mt)の分裂に関わる細胞質の因子Drp1のノックアウト(KO)マウスの作成に始めて成功し、全身Drp1-KOならびに神経Drp1-KOマウスの個体ならびに細胞での表現

系の解析を行った。(2)Mt外膜上のDrp1受容体が従来考えられていたFis1ではなく新規な外膜蛋白質 Mffであることを明らかにした。(3)神経のMt軸索輸送に関わる新規な因子KLP6の同定に成功した。(4) Rab-GAPタンパク質 TBC1D15がhFis1のリガンドであることを明らかにした。(5) Drp1機能を抑制するとマトリクス内のmtDNA-タンパク質複合体のサイズが増大する現象を見だし、これがクリステ構造を安定化することでアポトーシスを抑制することを見出した。

## 5. 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 9 件)

(1) New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. H. Otera, N. Ishihara and K. Mihara (2012) Invited Review Article in *BBA Mol. Cell. Res.*, 1833, 1256-1268. (査読有)

(2) Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology. K. Onoue, A. Jofuku, R. Ban-Ishihara, T. Ishihara, M. Maeda, T. Koshiba, T. Itoh, M. Fukuda, H. Otera, T. Oka, H. Takano, N. Mizushima, K. Mihara and N. Ishihara (2012) *J. Cell Sci.*, 126, 176-185. (査読有)

(3) PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. K. Okatsu, T. Oka, M. Iguchi, K. Imamura, H. Kosako, N. Tani, M. Kimura, E. Go, F. Koyano, M. Funayama, K. Shiba-Fukushima, S. Sato, H. Shimizu, Y. Fukunaga, H. Taniguchi, M. Kamatsu, N. Hattori, K. Mihara, K. Tanaka, and N. Matsuda (2012) *Nature Communications*, 3:1016 DOI:10.1038, pp. 1-10. (査読有)

(4) Regulation and physiologic function of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. N. Ishihara, H. Otera, T. Oka, and K. Mihara (2012) Invited Forum Review Article in *Antioxidants &*

*Redox Signaling*, 17, 1-11.. (査読有)

(5) Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. H. Otera and K. Mihara (2012) Invited Review Article in *International Journal of Cell Biology*, Vol. 2012, ID821676, 10 pages. (査読有)

(6) Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. H. Otera and K. Mihara (2011) Invited Review Article. *Small GTPases*, 2(3), 167-172. (査読有)

(7) KLP6: a newly identified kinesin that regulates the morphology and transport of mitochondria in neuronal cells. K. Tanaka, Y. Sugiura, R. Ichisita, K. Mihara and T. Oka (2011) *J. Cell Sci.* 124, 2457-2465. | "In this issue" *ibid.* e1402. (査読有)

(8) Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. H. Otera and K. Mihara (2011) Invited Review Article in *J. Biochem*, 149, 241-251 (\*29) (査読有)

(9) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. H. Otera, C. Wang, M.M. Cleland, K. Setoguchi, S. Yokota, R.J. Youle, and K. Mihara (2010) *J. Cell Biol.* 191, 1141-1158. "In Focus" *ibid.* 1045 | Cover Art (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

招待講演のみ

(1) 「ミトコンドリア分裂の制御機構とその障害」三原勝芳 (2012) 特別講演 in The 12<sup>th</sup> Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-Mit). 筑波大学、Dec 20 (2012).

(2) 「細胞の生と死をつかさどる小器官ミトコンドリア-機能、形成、動態とその障害」三原勝芳 独創的発想に富む科学者育成プログラム「出る杭を伸ばすヘリックプロジェクト」採択事業 | 七人の侍による記念講演会、平成24年12月10月24日 秋田ビューホテル

(3) ミトコンドリア融合・分裂の分子機構と生理機能、三原勝芳 (2012) グローバル

COE プログラム理医連携特別講演会 -独創的  
研究の世界発信を続ける「七人の侍」- |  
2012 年 2 月 2 9 日 | 九州大学コラボステー  
ション1 視聴覚ホール

(4) The mechanism and physiological  
significance of Drp1-dependent  
mitochondrial fission in mammals. K.  
Mihara (2012) Invited talk in The 9<sup>th</sup>  
Conference of the Asian Society of  
Mitochondrial Research and Medicine &  
The 5<sup>th</sup> Conference of Chinese Society of  
Mitochondrial Research and Medicine.  
November 2-5, 2012, Beijing, China

(5) Mitochondrial Recruitment of Drp1  
during Mitochondrial Fission in  
Mammalian Cells. K. Mihara (2011)  
Invited talk in “Mitochondrial Dynamics:  
From Mechanism to Disease” Sardinia,  
Italy, September 11-15.

(6) Mitochondrial Recruitment of Drp1  
during Mitochondrial Fission in  
Mammalian Cells. K. Mihara (2011)  
Invited talk in the 5<sup>th</sup> Academic meeting  
of KSMRM at 18<sup>th</sup> June, 2011, Daegu,  
Korea

(7) Mitochondrial Recruitment of Drp1  
during Mitochondrial Fission in  
Mammalian Cells. K. Mihara (2011)  
Invited talk in IRB Meeting  
“Mitochondrial Autophagy” March 21-23,  
at the Institut d’Estudis Catalans (IEC),  
Barcelona.

(8) ミトコンドリア融合・分裂の分子機構と  
生理的意義。三原勝芳 (2011) 京都産業大学  
総合生命科学部開設記念シンポジウム「タン  
パク質の一生と生命システム」

京都産業大学神山ホール | 2011 年 3 月 1 0  
日

(9) The Physiologic Importance of  
Mammalian Mitochondrial Fission  
Factor Drp1, K. Mihara (2010) Invited  
talk in Symposium of “Systems Biology  
and Drug Discovery”, Yonsei University,  
Korea, February 9.

(10) “Enjoyed the little things” K.  
Mihara (2010) Evening Lecture in The

3<sup>rd</sup> International Symposium on Protein  
Community, Sept13, 2010, Nara

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三原 勝芳 (MIHARA KATSUYOSHI)  
九州大学・医学研究院・名誉教授  
研究者番号 : 40029963

### (2) 研究分担者

大寺 秀典 (OOTERA HIDENORI)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号 : 40380612

### (3) 連携研究者

石原 直忠 (ISIHARA NAOTADA)  
久留米大学・分子生命科学研究所・教授  
研究者番号 : 10325516