

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659178

研究課題名（和文） ミトコンドリア内リソソームの発見とその意義

研究課題名（英文） Discovery of intramitochondrial lysosome

研究代表者

荒川 博文 (Hirofumi Arakawa)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：70313088

研究成果の概要（和文）：

本研究によって、ミトコンドリア内リソソームの誘導メカニズムに関するいくつかの重要な知見を得た。第一に、ミトコンドリア内へのリソソームの誘導には、ミトコンドリア外膜タンパク質である BNIP3 と NIX が極めて重要な役割を果たすことを明らかとした。ミトコンドリア外膜上での Mieap, BNIP3 及び NIX の会合は、ミトコンドリア二重膜に未知の孔を開口した。この孔は、細胞死の誘導には全く関与していなかった。第二に、アダプタータンパク質である 14-3-3gamma は、Mieap と結合して、ミトコンドリア内へ移動し、ミトコンドリア内における酸化蛋白質の分解に極めて重要な役割を果たしていた。以上の結果から、この現象を可能とするメカニズムは、少なくともミトコンドリア二重膜における孔の開口と、アダプター蛋白質の介在による酸化蛋白質のリソソーム内への取り込みが、重要である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we obtained several important findings on the mechanism for induction of the intramitochondrial lysosome. First, BNIP3 and NIX, two mitochondrial outer membrane proteins, play a pivotal role in induction of the intramitochondrial lysosome. The interaction of Mieap, BNIP3 and NIX at mitochondrial outer membrane induces the opening of a pore in the mitochondrial double membrane. Surprisingly, this is completely unrelated to cell death. Second, 14-3-3gamma interacts with Mieap and is translocated into mitochondria. Intramitochondrial 14-3-3gamma plays a critical role in the elimination of oxidized mitochondrial proteins. These results suggest that the opening of a pore in the mitochondrial double membrane and an adaptor protein are very substantial in the mechanism for the intramitochondrial lysosome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ミトコンドリア、品質管理、酸化ストレス、活性酸素種、リソソーム、発がん、p53、がん抑制

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の荒川は 1999 年より、文部科学省科学研究助成金がん特定領域などからの支援を受け、「p53 標的遺伝子の同定とその機

能解析に関する研究」を行ってきた。これまでに、その成果として、がん抑制遺伝子 p53 が、細胞死や DNA 修復にきわめて重要な役割を果たす事実を明らかとしてきた (Cell 2000,

Nature 2000, *Mol Cell* 2001, *Nat Cell Biol* 2003, *Nat Genet* 2003, *Nat Rev Cancer* 2004)。今回、この一連の研究の進展の過程から、新規 p53 標的遺伝子として *Mieap* 遺伝子を同定し、その機能解析から *Mieap* 蛋白質による、ミトコンドリア品質管理に関する全く新しいメカニズムを発見するに至った (Miyamoto et al. PLoS ONE 6: e16054, 2011.; Kitamura et al. PLoS ONE 6: e16060, 2011.)。

我々はこれまでの解析から、ミトコンドリアより生成される活性酸素 (ROS) に反応して、(1) *Mieap* が、ミトコンドリアの構造破壊を伴わずに、ミトコンドリア内へリソゾームを集積させ (MALM: *Mieap*-mediated Accumulation of Lysosomes within Mitochondria)、ミトコンドリアの酸化蛋白質を特異的に分解し、不良なミトコンドリアを修復するか (Miyamoto et al. PLoS ONE 6: e16054, 2011.)、あるいは (2) *Mieap* が液胞形成を誘導し (MIV: *Mieap*-Induced Vacuole)、不良なミトコンドリアを液胞内へ丸ごと飲み込み分解し排除するという二つの機能を制御することでミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たす事実を確認した (Kitamura et al. PLoS ONE 6: e16060, 2011.)。

2. 研究の目的

MALM は従来のオートファジーとは全く異なる現象と考えられ、ミトコンドリア内へのリソゾームの移動による、細胞内小器官内の異常蛋白質に対するリソゾームによる特異的な分解機構が存在する可能性を示唆するものであり、現在の細胞生物学の常識を書き換える成果が予想される。我々の研究によって、細胞生物学研究に革命的な進歩をもたらすとともに、不良なミトコンドリア蓄積を原因とする個体における老化・がん・神経変性疾患・循環器疾患の発生メカニズムの解明とその治療・予防に多大なる貢献が期待される。この研究の目的は、これまでのリソゾームの役割やミトコンドリア内蛋白質分解に関する常識を大きく塗り替え、細胞生物学における未知の領域を明らかとすることである。

3. 研究の方法

まずは *Mieap* 結合タンパク質の同定から、そのメカニズムに迫る。具体的には、外来性及び内在性 *Mieap* によって MALM を誘導し、MALM 誘導の比較的初期において、*Mieap* 複合体の免疫沈降を行い、その後の 2DICAL (2-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry) によるプロテオーム解析へ進める。いずれも *Mieap* 存在下と非存在下、抗 *Mieap* 抗体とコントロール抗体などの適切な 2 群間における差の検出から、標的蛋白質の

同定を試みる。また、すでにミトコンドリア外膜上に存在し、MALM に重要な働きを有することが示されている NIX/BNIP3L についても、MALM 発生時における抗 NIX/BNIP3L 抗体を用いた同様の解析を行うことで、NIX/BNIP3L が形成する未知のチャンネル複合体の構成分子の同定を試みる。同様に、同定された有意な候補蛋白質についても同様のアプローチを試みる。

同定された候補蛋白質においては、FLAG や HA などの適切なタグを N 末、及び C 末に有する融合蛋白質の発現ベクターを構築し、結合の再現性の確認実験を行い、その確からしさの確認作業を行う。これらの実験において、特異的な結合が確認できた分子については、大腸菌におけるリコンビナントタンパク質合成と精製を行い、内在性蛋白質検出のための特異抗体の作成へと進める。また、プラスミドあるいはアデノウイルスベクターなどの、一過性の過剰発現可能なシステムを構築し、あるいは、siRNA を用いた内在性蛋白質のノックダウン実験、免疫染色実験を行い、MALM における重要性の確認実験を進めていく。

4. 研究成果

Mieap 結合タンパク質として、BH3 ドメインを有するミトコンドリア外膜タンパク質である BNIP3 と NIX (BNIP3L) を同定した。内在性及び外来性いずれのタンパク質においても、MALM 発生時における、*Mieap* と BNIP3 及び NIX の結合が証明された。BNIP3 や NIX は、ミトコンドリア外膜において *Mieap* と結合した。内在性 BNIP3 あるいは NIX のノックダウンにより MALM の誘導は、ほぼ完全に抑制された。従来の報告とは異なり、BNIP3 あるいは NIX 単独の過剰発現は、ミトコンドリア膜電位の低下やそれに伴う細胞死の誘導は認めなかった。しかし、*Mieap*、BNIP3、NIX の 3 者を同時に過剰発現したときのみ、劇的な膜電位の低下を認めた。ところが、この現象は、細胞死とは全く無関係であった。

このことから、*Mieap* によるミトコンドリアの構造破壊を伴わないミトコンドリア内リソゾームの誘導には、BNIP3 と NIX が極めて重要な役割を果たしている事が明らかとなった。*Mieap*、BNIP3、NIX の 3 者のミトコンドリア外膜上での会合は、ミトコンドリア二重膜に未知の孔 (通り道) を開口させる可能性が示唆された。さらにこの未知の孔は、これまでに細胞死との関連で知られている Permeability transition pore と異なる可能性が示された。

Mieap 結合タンパク質として、14-3-3gamma を同定した。BNIP3 や NIX とは異なり、14-3-3gamma は、MALM 誘導時に細胞質ゾルで *Mieap* と結合して、*Mieap* と共にミトコンド

リア内へ移動し、ミトコンドリア内におけるリソソームによる酸化蛋白質の分解に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。14-3-3タンパク質は、2分子間のアダプター分子としての役割が知られており、酸化蛋白質のリソソーム内への取り込みへ関与している可能性がある。

以上の結果から、我々の発見した新規ミトコンドリア品質管理機構は、実験にともなうアーチファクトではなく、極めて特異的な細胞機能の可能性が高まった。リソソームのミトコンドリア内への移動に深く関与すると考えられるミトコンドリア二重膜に開口する未知の孔が存在し、BNIP3とNIXによって制御されること、さらにミトコンドリア内へ移動したリソソームによる酸化蛋白質の分解に14-3-3 γ が極めて重要な働きを有していることは、この現象のメカニズム解明に大きく貢献する成果と考えられる。

これらの成果を起点として、さらなるメカニズムの解明が必要と思われる。また、Mieap結合分子の探索から、さらなる手がかりが明らかとなってくると考えられる。現時点での最大の問題点は、電子顕微鏡解析に於いて、ミトコンドリア内に、オルガネラとしてのリソソームを形態学的に同定できていないことである。この現象の仮説である「ミトコンドリア内リソソーム」が本当に存在するのか、あるいは、リソソームタンパク質の集積を見ているのか、について今後はより詳細かつ慎重な形態学的解析も行っていく必要があると考えられる。

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2件)

英文原著 (査読あり)

1. Miyamoto T, Kitamura N, Ono M, Nakamura Y, Yoshida M, Kamino H, Murai R, Yamada T, Arakawa H. Identification of 14-3-3 γ as a Mieap-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Scientific Reports* 2: 379 (2012).

2. Nakamura Y, Kitamura N, Shinogi D, Yoshida M, Goda O, Murai R, Kamino H, Arakawa H. BNIP3 and NIX mediate Mieap-induced accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. *PLoS ONE* 7: e30767 (2012).

[学会発表] (計27件)

1. 加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、二村学、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、金井弥栄、荒川博文 口

演発表 演題「大腸がんで見られる Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の破綻とその意義について」平成24年12月19日 第12回日本ミトコンドリア学会年会(つくば市)

2. 佐野仁哉、加美野宏樹、中村康之、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、荒川博文 口演発表 演題「Analysis of the p53/Mieap/BNIP3 mitochondrial quality control pathway in esophageal and gastric cancer」平成24年12月19日 第12回日本ミトコンドリア学会年会(つくば市)

3. 吉田将紀、中村康之、喜多村憲章、加美野宏樹、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、荒川博文 口演発表 演題「低酸素ストレスはリソソームタンパク質のミトコンドリア内集積を誘導する」平成24年12月19日 第12回日本ミトコンドリア学会年会(つくば市)

4. 中村康之、尾野雅哉、宮本嵩史、喜多村憲章、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、山田哲司、荒川博文 口演発表 演題「Mieap 結合タンパク質としての 14-3-3 γ の同定とそのミトコンドリア品質管理における役割について」平成24年12月19日 第12回日本ミトコンドリア学会年会(つくば市)

5. 村井竜也、中村康之、吉田将紀、加美野宏樹、齋藤有理、佐野仁哉、荒川博文 口演発表 演題「ミトコンドリア由来活性酸素種のがん治療標的としての意義」平成24年12月20日 第12回日本ミトコンドリア学会年会(つくば市)

6. 齋藤有理、中村康之、喜多村憲章、吉田将紀、加美野宏樹、佐野仁哉、荒川博文 口演発表 演題「Mieap誘導性液胞様構造物の形成におけるUVRAGとの結合を介したMieap- α の役割について」平成24年12月20日 第12回日本ミトコンドリア学会年会(つくば市)

7. 中村康之、尾野雅哉、宮本嵩史、喜多村憲章、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、山田哲司、荒川博文 ポスター発表 演題「Mieap 結合タンパク質としての 14-3-3 γ の同定とそのミトコンドリア品質管理における役割について」平成24年12月11日 第35回日本分子生物学会年会(福岡市)

8. 加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、二村学、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋

藤有理、佐野仁哉、金井弥栄、荒川博文 ポスター発表 演題「大腸がんで高頻度に生じるMieap制御性ミトコンドリア品質管理機構の不活性化」平成24年12月11日 第35回日本分子生物学会年会(福岡市)

9. 齋藤有理、中村康之、喜多村憲章、吉田将紀、加美野宏樹、佐野仁哉、荒川博文 ポスター発表 演題「Mieap誘導性液胞様構造物の形成におけるUVRAGとの結合を介したMieap- α の役割について」平成24年12月11日 第35回日本分子生物学会年会(福岡市)

10. 吉田将紀、中村康之、喜多村憲章、加美野宏樹、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、荒川博文 ポスター発表 演題「低酸素ストレスはリソソームタンパク質のミトコンドリア内集積を誘導する」平成24年12月12日 第35回日本分子生物学会年会(福岡市)

11. Yasuyuki Nakamura, Masaki Yoshida, Noriaki Kitamura, Hiroki Kamino, Ryuya Murai, Yuri Saito, Hitoya Sano, Hirofumi Arakawa. Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. The 6th International Symposium on Autophagy 2012, Oct 29, 2012, Okinawa

12. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Masaki Yoshida, Noriaki Kitamura, Ryuya Murai, Yuri Saito, Hitoya Sano, Shizuko Ichinose, Hirofumi Arakawa. Mieap controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. The 6th International Symposium on Autophagy 2012, Oct 29, 2012, Okinawa

13. 荒川博文、シンポジウム：オートファジー・プロテオステイシスとがん 演題「ミトコンドリア品質管理のメカニズムとがん：p53誘導性タンパク質Mieapによる新規ミトコンドリア品質管理機構」平成24年9月19日、第71回日本癌学会学術総会(札幌市)

14. 村井竜也、中村康之、吉田将紀、加美野宏樹、齋藤有理、佐野仁哉、荒川博文 ポスター発表 演題「ミトコンドリア由来活性酸素種のがん治療標的としての意義」平成24年9月19日 第71回日本癌学会学術総会(札幌市)

15. 齋藤有理、中村康之、喜多村憲章、吉田将紀、加美野宏樹、佐野仁哉、荒川博文 ポスター発表 演題「Mieapが誘導する液胞様

構造物の形成においてUVRAGと結合して働くMieap- α の特異的な役割」平成24年9月19日 第71回日本癌学会学術総会(札幌市)

16. 佐野仁哉、加美野宏樹、中村康之、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、荒川博文 ポスター発表 演題「食道がん及び胃がんにおけるミトコンドリア品質管理に関わるp53/Mieap/BNIP3経路の解析」平成24年9月19日 第71回日本癌学会学術総会(札幌市)

17. 吉田将紀、中村康之、喜多村憲章、加美野宏樹、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、荒川博文 口演発表 演題「低酸素環境下におけるミトコンドリア品質管理機構を介したMieapの腫瘍抑制作用について」平成24年9月20日 第71回日本癌学会学術総会(札幌市)

18. 加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、二村学、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、金井弥栄、荒川博文 口演発表 演題「大腸がんで高頻度に生じるMieapによるミトコンドリア品質管理機構の破綻について」平成24年9月20日 第71回日本癌学会学術総会(札幌市)

19. 中村康之、尾野雅哉、宮本嵩史、喜多村憲章、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、山田哲司、荒川博文 口演発表 演題「Mieap結合タンパク質としての14-3-3 γ の同定とそのミトコンドリア品質管理における役割について」平成24年9月20日 第71回日本癌学会学術総会(札幌市)

20. 荒川博文 シンポジウム：がん・組織障害とオートファジー 演題「p53誘導性タンパク質Mieapによる新規ミトコンドリア品質管理機構とヒトがんにおけるその破綻について」平成24年7月24日 第21回日本 Cell Death 学会(名古屋市)

21. 中村康之、喜多村憲章、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文 口演発表 演題「Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria」平成23年12月14日 第34回日本分子生物学会年会(横浜市)

22. 喜多村憲章、中村康之、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文 口演発表 演題「Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control」平成23年12月15日 第34回日本分子生物学会

年会（横浜市）

23. 吉田将紀、中村康之、喜多村憲章、村井竜也、加美野宏樹、荒川博文 口演発表 演題「BNIP3 and NIX mediate Miep-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria」平成23年12月15日 第34回日本分子生物学会年会（横浜市）

24. 荒川博文 2011JCA-Mauvernay Award 受賞講演 演題「がんのアキレス腱を知る～p53 標的遺伝子研究からのアプローチ」平成23年10月4日 第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

25. 吉田将紀、喜多村憲章、中村康之、宮本嵩史、加美野宏樹、村井竜也、尾野雅哉、荒川博文 口演発表 演題「リソソーム様オルガネラがミトコンドリア内に存在する可能性とミトコンドリア品質管理におけるその役割について」平成23年10月4日 第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

26. 中村康之、喜多村憲章、宮本嵩史、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文 ポスター発表 演題「修復と排除：p53 誘導性タンパク質 Miep による新規ミトコンドリア品質管理機構」平成23年10月3日 第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

27. 荒川博文 シンポジウム・疾患に関与するミトコンドリア研究の新展開 演題「修復と排除：p53誘導性タンパク質Miepによる新規ミトコンドリア品質管理機構」平成23年9月24日 第84回日本生化学会大会（京都）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/06biop/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 博文 (Hirofumi Arakawa)

独立行政法人国立がん研究センター・

研究所・分野長

研究者番号：70313088