

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790556

研究課題名(和文) マイトファジー誘導機序の解明とその臨床検査への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of mitophagy and its application to the laboratory medicine

## 研究代表者

青木 義政 (Aoki, Yoshimasa)

九州大学・大学病院・主任臨床検査技師

研究者番号：80419514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーがミトコンドリアを選択的に分解する現象は、マイトファジーと呼ばれている。本研究では、出芽酵母とヒト培養細胞を用いて、マイトファジー誘導機構を解明し、さらに、臨床検査学的手法でマイトファジーを検出する方法の確立を目指した。ヒト培養細胞においては、Erk2、p38の2つのMAPキナーゼとその上流のシグナル経路がマイトファジーに重要であることが明らかとなった。また、出芽酵母の研究では、マイトファジーに必須のAtg32のリン酸化にCasein Kinase 2が関わっていること、Atg32の発現がTORの下流で制御され、Ume6-Sin3-Rpd3複合体が関わっていることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Mitophagy is a process that degrade mitochondria selectively. In this study, we investigated the signaling pathways that regulate mitophagy using yeast and human cell lines. We further try to establish the method to detect the mitophagy using clinical laboratory test. We found that, in human cells, MAP kinase Erk2 and p38 related signaling pathways are important for mitophagy. In addition, we found that mitophagy dispensable protein Atg32 is expressed under the regulation of TOR and the down Ume6-Sin3-Rpd3 complex.

研究分野：病態検査学

キーワード：マイトファジー ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは、栄養飢餓および種々の細胞ストレスによって誘導され、脂質二重膜構造体（オートファゴソーム）で非選択的に細胞質成分を包み込み、リソソーム（酵母では液胞）と融合することにより内容を分解する現象である。この狭義のオートファジー（非選択的オートファジー）以外に、オートファジーはミトコンドリアなどのオルガネラを選択的に分解していることが近年明らかにされてきた。

(2) ミトコンドリアは、細胞へのエネルギーの供給を行っている半面、細胞内における最大の活性酸素（reactive oxygen species, ROS）産生の際でもある。このため、ミトコンドリアDNAや蛋白質が、自身の産生するROSによって絶えず酸化障害を受けている。ミトコンドリア障害の蓄積は、種々の神経変性疾患、老化、癌、糖尿病など様々な病態と関連しており、ミトコンドリアの品質管理は細胞内で非常に重要な役割を担っている。最近の研究から、オートファジーが、機能低下したミトコンドリアを選択的に分解すること（ミトコンドリアオートファジーまたはマイトファジー）によって、細胞内のミトコンドリアの品質を維持していることや、さらには、マイトファジーの異常が、遺伝性パーキンソン病の原因となっていることが明らかになってきた。

(3) したがって、パーキンソン病などのミトコンドリア機能に異常を認める患者体内でマイトファジーがどの程度誘導されているかを調べることが出来れば、重要な診断・治療の指標となる。

(4) 本研究代表者は、パーキンソン病を含むミトコンドリア機能障害に起因する疾患群の早期発見、診断、治療に直結する臨床検査技術の開発を目標として、その根底にあるマイトファジーの分子機構の解明に取り組んでいる。

(5) マイトファジーの分子機構は未だに多くが解明されていないが、出芽酵母では比較的研究が進んでいる。マイトファジーが誘導されるとミトコンドリア上の膜タンパク質 Atg32 と細胞質に存在する Atg11 が結合する。次いで Atg11 がミトコンドリアをオートファゴソームの形成場所に移行させる。その後、ミトコンドリアはオートファゴソームに包み込まれ、最終的には液胞に運ばれて分解される（廣田有子，青木義政ほか，生化学，83巻，126-130頁，2011年）。本研究代表者は、この Atg32 と Atg11 の結合がマイトファジーにおける最も重要なステップであると考え、この結合を詳細に解析した。その結果、マイトファジーが誘導されると Atg32 の 114 番目

のセリンがリン酸化され、このリン酸化された Atg32 のみが Atg11 と結合すること、すなわち Atg32 のリン酸化がマイトファジーの最初の物理的ステップであることを明らかにした（Aoki Y., et al., Mol Biol Cell, 22巻，3206-3217頁，2011年）。

(6) さらに、Atg32 のリン酸化に関する上流因子を解析し、MAP キナーゼの一つである Hog1 が Atg32 のリン酸化およびマイトファジーに重要な役割を担っていることを明らかにした（Aoki Y., et al., Mol Biol Cell, 22巻，3206-3217頁，2011年）。**図1**に以上の概要を示す。

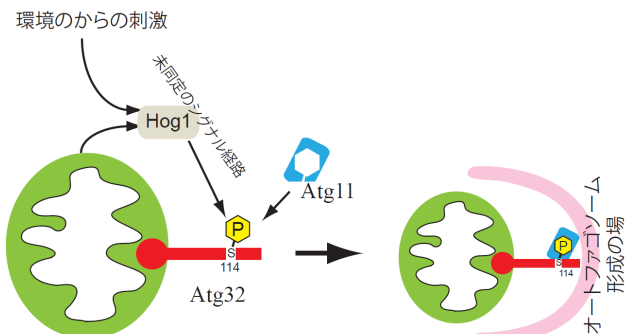


図1 研究成果の概要: マイトファジーは、ミトコンドリア自身の障害、飢餓などの外部からの刺激により誘導される。こうした刺激が未同定のシグナル経路を通じて最終的に Atg32 の 114 番目のセリンをリン酸化する。この未同定の経路には MAPK の一つである Hog1 が関与している。Atg32 のリン酸化により細胞質の Atg11 が Atg32 と結合し、この Atg32-Atg11 複合体がミトコンドリアをオートファゴソーム形成の場に移行させる。最終的には、ミトコンドリアはオートファゴソームに包まれて分解される。

## 2. 研究の目的

上述したように、本研究代表者は、出芽酵母で Atg32 のリン酸化とその上流にある MAP キナーゼのシグナル経路がマイトファジーに重要であることを明らかにした。残念なことに Atg32 は哺乳類にホモログが存在しない。そこで本研究代表者は、ヒト培養細胞で MAP キナーゼとマイトファジーの関連を調べたところ、出芽酵母と同様にヒト培養細胞でも 2 つの MAP キナーゼ (Erk2 と p38) がマイトファジーの誘導に関与していることが明らかとなった。このことから、本研究課題では、次の 2 つの研究目的を設定する。

(1) ヒト培養細胞におけるマイトファジーは、電子伝達系の阻害剤、脱共役剤、光刺激によって引き起こされるミトコンドリアへの障害、あるいは飢餓などで誘導される。こうした刺激下で、マイトファジーに関与する 2 つの MAP キナーゼの上流、下流のどの因子が活性化、あるいは抑制されるのかを明らかにし、刺激からマイトファジー誘導までのシグナル伝達経路を明らかにする。

(2) マイトファジー誘導時もしくは MAP キナーゼ阻害剤でマイトファジー抑制時に、培地中に放出される物質、あるいは放出を抑制する物質をプロテオミクスの手法によって同定する。こうして同定された物質の中から、患者におけるマイトファジー誘導状態の指標、ならびに血液生化学的検査の対象と成り得る物質を選別していく。

### 3. 研究の方法

(1) 蛍光タンパク質 Keima は pH 依存的にその構造が変化し、発光に必要な励起光波長が中性環境では 440nm であるのに対し、酸性環境では 590nm に変化する。マイトファジーによる分解はリソソームによって行われるため、分解時のミトコンドリアの周囲はリソソーム内と同じ pH 3~4 となる (Katayama H., et al., Chem Biol, 2011)。本研究代表者らは、この原理を利用して培養細胞でマイトファジーを動的に観察している。すなわち、HeLa 細胞や SH-SY5Y 細胞にミトコンドリア移行シグナルをつけた Keima (以後 mt-Keima と記す) を発現させると、ミトコンドリア内に局在する mt-Keima は、ミトコンドリア内が中性であるため 440nm の励起光を当てるとミトコンドリアが発光する。一方で 590nm の励起光では何も起こらない。マイトファジーの誘導によって、ミトコンドリアがリソソームに取り込まれ分解が進んでいくと、ミトコンドリア内の mt-Keima は、周囲が酸性のため、440nm の励起光では発光せず、590nm の励起光で発光するようになる。この結果、590nm の励起光で発光する mt-Keima はマイトファジーによって分解過程にあるミトコンドリアということになる。この方法は非常に感度が高くマイトファジーの誘導を検出できる。この手法を mt-Keima 法と呼び、**図 2** に HeLa 細胞を用いた場合の例を示す。

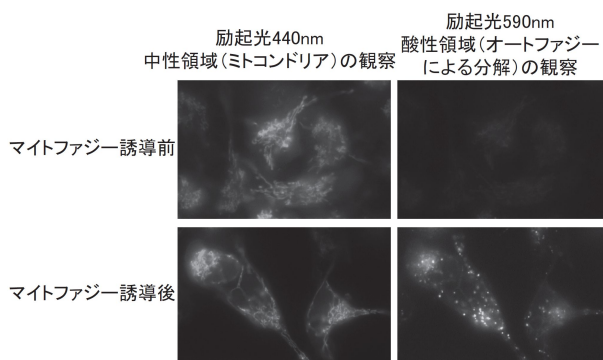


図2 mt-Keima 法によるマイトファジーの観察  
ミトコンドリアに局在する mt-Keima は 440nm で励起され、チューブ状のミトコンドリアの形態として観察される。一方、590nm で励起しても、マイトファジー誘導前にはほとんどシグナルを認めない。  
マイトファジー誘導により、ミトコンドリアがリソソームにより分解されると、周囲の環境が酸性となり、分解中のミトコンドリアのみ 590nm で励起されるドットとなって観察される。

(2) 研究目的でも示したように、本研究代表者は、出芽酵母におけるマイトファジーに MAP キナーゼが関与していることを見出し、さらに mt-Keima 法を用いてヒト培養細胞でも 2 つの MAP キナーゼ Erk2 と p38 がマイトファジーに重要であることを見出している。この MAP キナーゼの上流、下流のどの因子がマイトファジーに関連しているのか、マイトファジー誘導に関与するシグナル伝達経路の解明を行う。

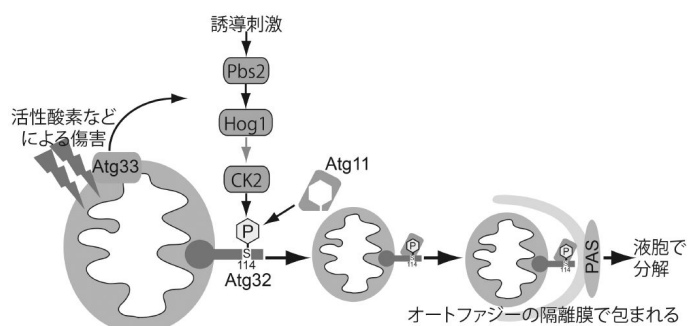
(3) 具体的には、Erk2 はその上流が Ras c-Raf/B-Raf MEK1/2 という MAPKs の経路、その下流は、Elk-1、Fos など 10 以上の転写因子、転写産物に結びつく。同様に p38 はその上流が TAK1/ASK1/PKA1 MKK3/6 という経路、その下流は MEF2、MSK1 など複数の転写因子、転写産物に結びつく。こうした因子を RNAi のノックダウンした細胞を用い、マイトファジーの誘導を観察することで、マイトファジー誘導に関連するシグナル伝達経路の解明を行う。また、MAPKs にはそれぞれの経路、分子に特異的な阻害剤 (Erk に対する PD98059、p38 に対する SB202190 など) が存在し、これら阻害剤によるマイトファジー誘導抑制実験を行うことで、シグナル伝達経路の確認を行う。

### 4. 研究成果

(1) MAP キナーゼ Erk2 と p38 やその上流の MAPKK、MAPKKK の siRNA によりマイトファジーが強く抑制された。さらに、Erk2 や p38 の阻害剤 (それぞれ PD98059、SB202190) でもマイトファジーが強く抑制された。これらのことから、マイトファジーには 2 つの MAP キナーゼ Erk2 と p38 が関わるシグナル伝達経路が重要であることを証明できた。しかしながら、マイトファジーの観察は、想定以上に困難であり、マイトファジーにおける MAP キナーゼの重要性は、完全に証明できたものの、その臨床検査への応用研究にまで発展させることは、今回の研究期間内には困難であった。

(2) 本研究課題では、研究の効率化のため、一部の研究については、出芽酵母を用いて行った。この結果、マイトファジーに必須な Atg32 の直接的なリン酸化は、Casein Kinase 2 によって引き起こされることを明らかにした (Kanki T., et al., EMBO Rep, 14 巻, 788-794 頁, 2013 年)。さらに、Atg32 蛋白質の発現には、マイトファジーの誘導刺激によって抑制される TOR (target of rapamycin) が重要であり、そのシグナル伝達経路の下流で制御されている Ume6-Sin3-Rpd3 複合体が ATG32 遺伝子の転写を抑制することによって、Atg32 の発現量を制御していることを明らかにした (Aihara M., et al., J Cell Sci, 127

巻, 3184-3196 頁, 2014 年)。これらの研究成果から、**下図**のように出芽酵母におけるマイトファジー分子機構が解明された。これらの成果は、マイトファジーを検出するための臨床検査法の開発を目指すうえで、有用な成果を得ることができたと思われる。



## 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)

Aihara M, Jin X, Kurihara Y, Yoshida Y, Matsushima Y, Oku M, Hirota Y, Saigusa T, Aoki Y, Uchiumi T, Yamamoto T, Sakai Y, Kang D, Kanki T. Tor and the Sin3-Rpd3 complex regulate expression of the mitophagy receptor protein Atg32 in yeast. *J Cell Sci*. 査読有 2014 Jul 15;127(Pt 14):3184-96. doi: 10.1242/jcs.153254. Epub 2014 May 16.

Kanki T, Kurihara Y, Jin X, Goda T, Ono Y, Aihara M, Hirota Y, Saigusa T, Aoki Y, Uchiumi T, Kang D. Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Rep*. 査読有 2013 Sep;14(9):788-94. doi: 10.1038/embor.2013.114. Epub 2013 Jul 30.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cclm2.med.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 義政 (AOKI YOSHIMASA)

九州大学・大学病院・主任臨床検査技師

研究者番号：80419514