

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291046

研究課題名(和文)ミトコンドリア分裂の制御機構

研究課題名(英文)Molecular Mechanisms of Mitochondrial Fission

研究代表者

三原 勝芳 (Mihara, Katsuyoshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：40029963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは細胞内外のストレスに応じて分裂を伴いながらMtマトリクス内のCytochrome Cを放出しカスパーゼカスケードを活性化することでアポトーシス執行に関わる。しかしその機構の詳細は不明であった。我々は各種のMt分裂関連遺伝子(分裂因子Drp1とその受容体Fis1, Mff, MiD49, MiD51)を破壊した細胞を用いて、Drp1-MiD49/MiD51経路による分裂が内膜のクリステリモデリングと共役してCytochrome C放出に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial fission-facilitated cytochrome c release from the mitochondrial cristae into the cytoplasm constitutes the key step of intrinsic apoptosis, although how the mitochondrial fission GTPase Drp1 and its mitochondrial receptors Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 are involved in this reaction remained elusive. We found with the fission factors-KO cell lines that Drp1-dependent mitochondrial fission through MiD49/MiD51, but not through the other factors, regulates cytochrome c release by cristae remodeling during intrinsic apoptosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリア融合 ミトコンドリア分裂 アポトーシス

## 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(Cyt.c)、Smac/Diablo、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

本申請ではアポトーシスシグナルを受けて細胞質のDrp1がMtに集積し分裂に共役してクリステ構造の再構築と共にクリステ内のCyt.cを細胞質に放出する機構を解明する。

## 3. 研究の方法

分裂関連因子(Drp1に加えて外膜のDrp1受容体Mff、MiD49、MiD51、Fis1)のKO細胞を作成し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

アポトーシスシグナルに応じてDrp1がMtに集積し、分裂に共役してクリステ構造の再構築と内部に貯留されたCyt.cがMt外に放出されカパーゼ活性化カスケードを介して細胞死が起きるがこの際外膜のMiD49とMiD51を介した経路を介した分裂に共役したCyt.cの放出が起り、さらにOPA1、prohibitin2(PHB2)、ROMO1がクリステ構造維持に関わることを明らかにした。これに加え、我々が作成したDrp1-KOマウスを用いて国内外の研究者との共同研究によってミトコンドリア品質管理、神経疾患、代謝障害に果たすミトコンドリア分裂の役割を明らかにした。

## 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)

- (1) Mechanisms and Functions of Mitochondrial Dynamics. K. Mihara and H. Otera (2016) ***Encyclopedia of Cell Biology***, **2**, 279-292.
- (2) Mitochondrial fission is an acute and adaptive response in injured motor neurons. Sumiko Kiryu-Seo, Hiromi Tamada, Yukina Kato, Katsura Yasuda, Naotada Ishihara, Masatoshi Nomura, Katsuyoshi Mihara, and Hiroshi Kiyama (2016) ***Scientific Reports*** SREP-15-37806B
- (3) Synaptic dysfunction, memory deficits and hippocampal atrophy due to ablation of mitochondrial fission in adult forebrain neurons. B. Oettinghaus, JM Schultz, LM Restelli, M. Licci, A. Schmidt, K. Schmitt, A. Grimm, L. More, J. Hench, M. Tolnay, A. Eckert, P. D'Adamo, P. Franken, N. Ishihara, K. Mihara, J. Bischofberger, L. Scorrano, and S. Frank (2016) ***Cell Death and Differentiation*** **23**, 18-28.
- (4) Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission. S. Saita, T. Ishihara, M. Maeda, SI. Iemura, T. Natsume, K. Mihara, and N. Ishihara (2016) ***Genes to Cells***, **21**, 408-424.
- (5) Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling. H. Otera, N. Miyata, O. Kuge and K. Mihara (2016) ***J. Cell Biol.*** **212**, 531-544.
- (6) Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced obesity and metabolic deterioration. L. Wang, T. Ishihara, Y. Ibayashi, K. Tatsushima, D. Setoyama, Y. Handa, Y. Takeichi, S. Sakamoto, S. Yokota, K. Mihara, D. Knag, N. Ishihara, R. Takayanagi, M. Nomura (2015) ***Diabetologia*** **58**, 2371-2380.
- (7) Endogenous Drp1 Mediates Mitochondrial Autophagy and Protects the Heart Against Energy Stress. Y. Ikeda, A. Shitakabe, Y. Maejima, P. Zhai, S. Sciarretta, J. Toli, M. Nomura, K. Mihara, K. Egashira, M. Ohnishi, M. Abdellatif and J. Sadoshima (2015) ***Circulation Research***, **116**, 264-278.
- (8) Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured Fibroblasts. Moshi Song, Katsuyoshi Mihara Yun Chen, Luca Scorrano, and Gerald W Dorn II (2015) ***Cell Metabolism***, **21**, 273-285.
- (9) Dynamics of mtDNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. T. Ishihara, R. Ban-Ishihara, M. Maeda, Y. Matsunaga, A. Ichimura, S. Kyogoku, H. Aoki, S. Katadam K. Nakada, M. Nomura, N. Mizushima, K. Mihara, and N. Ishihara (2015) ***Mol Cell Biol.*** **35**, 211-223.
- (10) Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. O. Udagawa, T. Ishihara, M. Maeda, Y. Matsunaga, S. Tsukamoto, N. Kawano, K. Miyado, H. Shitara, S. Yokota, M. Nomura, K. Mihara, N. Mizushioma, and N. Ishihara (2014) ***Current Biology***, **24**, 2451-2458.
- (11) Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via

Tom40 channels and induces defective innate immunity. T. Yoshizumi, T. Ichinohe, O. Sasaki, H. Otera, S. Kawabata, K. Mihara, and T. Koshiba (2014) ***Nature Communications***, 5, 1-14.

〔雑誌論文〕(計 11 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(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)

九州大学大学院医学研究院・名誉教授

研究者番号: 40029963

### (2) 研究分担者

大寺 秀典 (Otera Hidenori)

九州大学大学院医学研究院・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

野村 政壽 (Noimura Masahisa)

九州大学大学院医学研究院・講師

研究者番号: 30315080

増田 啓次 (Masuda Keiji)

九州大学大学院歯学病院・講師

研究者番号: 60392122