

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670169

研究課題名(和文)ミトコンドリアの内部にリソソームが存在するという仮説を証明する研究

研究課題名(英文) Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control

研究代表者

荒川 博文 (Arakawa, Hirofumi)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎児線維芽細胞及びヒト正常乳腺上皮細胞を用いた電子顕微鏡解析、免疫電子顕微鏡解析、プロテナーゼKプロテクションアッセイによって、少なくとも4種類(cathepsin-B, cathepsin-D, LAMP1, LAMP2)のリソソームタンパク質が、低酸素ストレスに反応して、構造破壊を伴わずに、ミトコンドリア内部へ集積することを確認した。The Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondriaは少なくともマウスからヒトの細胞に保存されている低酸素応答性の生理的細胞機能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, by performing electron microscopic and immune-electron microscopic analyses and protease K protection assay, we confirmed that at least four lysosomal proteins (Cathepsin-B, Cathepsin-D, LAMP1 and LAMP2) are accumulated within mitochondria without destroying the mitochondrial structure in response to hypoxia in mouse embryonic fibroblasts and human normal mammary epithelial cells. Therefore, the Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria is a hypoxic-responsive physiological function in the cell, which is conserved at least from mouse to human.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：リソソーム ミトコンドリア タンパク質分解 オートファジー 活性酸素種 酸化ストレス 酸化タンパク質 品質管理機構

1. 研究開始当初の背景

不良なミトコンドリアの蓄積は、ミトコンドリアの機能不全を引き起こし、老化、がん、神経変性疾患、循環器疾患などの原因となり得る。しかしながら、ミトコンドリアの品質管理がどのように行われているかのメカニズムについてはほとんどわかっていない。我々は *Mieap* 遺伝子を同定し、そのコードする蛋白質が、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へのリソソームタンパク質集積を誘導し、ミトコンドリアの品質管理に極めて重要な役割を果たしている事実を発見した(論文 : Miyamoto Y et al. *PLoS ONE* 6, e16054, 2011. [F1000: Rating 8, Must Read], 論文 : Kitamura N et al. *PLoS ONE* 6, e16060, 2011., 論文 : 荒川博文、実験医学 2012 年 6 月号特集「ミトコンドリアのヒト疾患学」vol.30, No. 9, p1407-1417)。

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ソームを集積させ (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(論文)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(論文)。

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ソームの移動による、細胞内小器官内の異常蛋白質に対するリソソ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、これまでのリソソ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にすることである。

3. 研究の方法

ミトコンドリア内リソソームの存在を証明するための研究項目は、

(1) ミトコンドリア内リソソーム存在の形態学的証明

(2) ミトコンドリア内リソソーム存在の生

化学的証明

の2つであり、これらを解明するために、以下の実験を遂行してゆく。

MALM 誘導時の細胞株を用いた電子顕微鏡・免疫電子顕微鏡解析

MALM 誘導時の細胞株からの純度の高いミトコンドリアの単離

単離ミトコンドリア (MALM 誘導後) に対する *2DICAL 法を用いた網羅的プロテオーム解析

*2DICAL (研究協力者の尾野雅哉氏が開発した新規網羅的プロテオーム解析法で 2-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry の略); Ono et al. *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 1338-1347, 2006.

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア内リソソーム存在の形態学的証明

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) 及びヒト正常乳腺上皮細胞を用いて、低酸素刺激で、MEF 細胞及びヒト正常乳腺上皮細胞に MALM が誘導されることを証明した。

Mieap ノックアウト (KO) MEF、p53-KO MEF、ATG5-KO MEF、ATG7-KO MEF、PINK1-KO MEF 細胞を用いた解析から、低酸素による MALM の誘導は、*Mieap* 及び p53 に依存していたが、ATG5、ATG7、PINK1 には依存していなかった。このことから、MALM は、従来のオートファジーとは全く異なる機能・現象であることが証明された。同様の結果を、ヒト正常乳腺上皮細胞でも確認した。

DAB を用いた免疫電子顕微鏡解析によって、構造破壊を伴わずに、4 種類 (cathepsin-B, cathepsin-D, LAMP1, LAMP2) のリソソームタンパク質が、低酸素ストレスに反応して、MEF のミトコンドリア内へ集積することを確認した。同様の結果を、ヒト正常乳腺上皮細胞でも確認した。

MEF 及びヒト正常乳腺上皮細胞を用いた電子顕微鏡解析を行ったが、現在のところミトコンドリア内に典型的なリソソームの構造を検出していない。

(2) ミトコンドリア内リソソーム存在の生化学的証明

網羅的なプロテオミクス解析法である IP-2DICAL 法を用いて、内在性 *Mieap* の存在に依存して、MALM 誘導時に、2 種類 (cathepsin-D, LAMP1) のリソソームタンパク質が、MEF のミトコンドリア内へ集積することを確認した。

ミトコンドリア内タンパク質の生化学的解析法であるプロテナーズ K・プロテクションアッセイによって、MEF 及びヒト正常乳腺上皮細胞において、低酸素刺激によって、ミ

トコンドリア内への Mieap タンパク質、
cathepsin-D タンパク質の集積を確認できた。

以上の結果から、MALM は少なくともマウスからヒトの正常細胞に保存されている、低酸素刺激によって誘導される極めて生理的な細胞機能であると考えられる。

引き続き、この現象は、ミトコンドリア内へのリソソームタンパク質の集積が生じているのか、リソソームというオルガネラが誘導されるのかについて、慎重な解析が必要と考えられる。

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 1 件)

1. 荒川博文 「p53 誘導性蛋白質 Mieap による新規ミトコンドリア品質管理機構 - がん抑制遺伝子 p53 の新しい機能」 医学のあゆみ 250: 505-510 (2014). 査読無

[学会発表](計 21 件)

1. 中村康之、喜多村憲章、安田さや香、諸田沙織、常木雅之、中西るり、荒川博文
演題「消化管腫瘍の発生及び進展における Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の役割について」 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会 平成 26 年 12 月 3 日(福岡市)

2. 中村康之、荒川博文

演題「消化管腫瘍の発生及び進展における Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の役割について」 第 8 回オートファジー研究会 平成 26 年 11 月 10 日(札幌市)

3. Yasuyuki Nakamura, Noriaki Kitamura, Hiroki Kamino, Hitoya Sano, and Hirofumi Arakawa. Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in mouse intestinal tumorigenesis. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 26, 2014, Yokohama.

4. Hirofumi Arakawa. Mieap-regulated mitochondrial quality control and its alteration in cancer. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 25, 2014, Yokohama.

5. Hirofumi Arakawa. Mitochondrial quality control and cancer. 2104 Soul National University Cancer Research Institute Cancer Symposium, April 17, Mokpo, Korea.

6. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Yuri Saito, Hitoya Sano, and Hirofumi Arakawa. p53-dependent and independent functions of Mieap. AACR Annual Meeting 2014, April 7, San

Diego, USA.

7. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Yuri Saito, Noriaki Kitamura, Hitoya Sano, and Hirofumi Arakawa. Specific role of Mieap α in Mieap-induced vacuole generation through an interaction with UVRAG. AACR Annual Meeting 2014, April 6, San Diego, USA.

8. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Hitoya Sano, Ryuya Murai, Yuri Saito, Manabu Futamura, Kazuhiro Yoshida, Nobuyuki Hiraoka, Yae Kanai, Ryoji Kushima, Toyomasa Katagiri, and Hirofumi Arakawa. Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in pancreatic and breast cancer. AACR Annual Meeting 2014, April 6, San Diego, USA.

9. 荒川博文

演題「Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の生理的意義について」第 72 回日本癌学会学術総会シンポジウム 平成 25 年 10 月 3 日(横浜市)

10. 加美野宏樹、中村康之、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、平岡伸介、金井弥栄、九嶋亮治、荒川博文
演題「膵がん及び乳がんで見られる Mieap による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」第 72 回日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月 3 日(横浜市)

11. 佐野仁哉、中村康之、加美野宏樹、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、荒川博文
演題「胃がんのがん抑制における Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の役割について」第 72 回日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月 3 日(横浜市)

12. 齋藤有理、中村康之、加美野宏樹、佐野仁哉、村井竜也、吉田将紀、荒川博文
ポスター発表、演題「精子運動能におけるミトコンドリア品質管理機構を介した Mieap の極めて重要な役割について」第 72 回日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月 3 日(横浜市)

13. 中村康之、加美野宏樹、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、荒川博文
演題「マウス消化管腫瘍の発生と進展における Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の役割について」第 72 回日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月 3 日(横浜市)

14. 荒川博文

演題「ミトコンドリア品質管理のメカニズムとがん：がん抑制遺伝子 p53 の新規機能について」第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 11 日(横浜市)

15. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Masaki Yoshida, Hitoya Sano, Hirofumi Arakawa. Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. Cell Symposia "Mitochondria: from signaling to disease" May 6, 2013, Lisbon (Portugal)

16. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Yuji Miyamoto, Noriaki Kitamura, Hitoya Sano, Shizuko Ichinose, Hirofumi Arakawa. Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control. Cell Symposia "Mitochondria: from signaling to disease" May 5, 2013, Lisbon (Portugal)

17. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Noriaki Kitamura, Hitoya Sano, Shizuko Ichinose, Hirofumi Arakawa. Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. Cell Symposia "Mitochondria: from signaling to disease" May 5, 2013, Lisbon (Portugal)

18. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Noriaki Kitamura, Manabu Futamura, Masaki Yoshida, Ryuya Murai, Yuri Saito, Hitoya Sano, Yae Kanai, Yoshihiro Moriya, Hirofumi Arakawa. Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in colorectal cancer. AACR Annual Meeting 2013. April 8, 2013, Washington D.C. (USA)

19. Yasuyuki Nakamura, Masaki Yoshida, Noriaki Kitamura, Hiroki Kamino, Ryuya Murai, Yuri Saito, Hitoya Sano, Hirofumi Arakawa. Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. AACR Annual Meeting 2013. April 8, 2013, Washington D.C. (USA)

20. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Hitoya Sano, Hirofumi Arakawa. Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. AACR Annual Meeting 2013. April 8, 2013, Washington D.C. (USA)

21. Hitoya Sano, Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Masaki Yoshida, Ryuya Murai, Yuri Saito, Manabu Futamura, Kazuhiro Yoshida, Hirofumi Arakawa. Frequent inactivation of the p53/Mieap/BNIP3 mitochondrial quality control pathway in gastric cancer. AACR Annual Meeting 2013.

April 8, 2013, Washington D.C.(USA)

〔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 (ARAKAWA, Hirofumi)
国立がん研究センター・研究所・分野長
研究者番号：70313088