

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870067

研究課題名(和文)ミトコンドリアを中心とした細胞内鉄動態と疾患生物学

研究課題名(英文)Iron metabolism and mitochondria-related disease

研究代表者

田中 敦(TANAKA, ATSUSHI)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：60404000

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)：ミトコンドリア鉄異常とオートファジー欠損の関係性を検討し、オートファジー欠損マウスにおけるミトコンドリア鉄の異常な減少が認められる一方、細胞全体での鉄量は変化せず、ミトコンドリアから流失した鉄は細胞質内で異所性に存在し得ることを明らかとした。このことは鉄動態異常が細胞環境の増悪の原因となることを示唆した。

ミトコンドリア機能制御のための鉄動態の重要性を検討すべく、オートファジー欠損マウスを用い鉄補充法を中心とした機能回復検討を行った。結果、ミトコンドリア機能異常は細胞内鉄分布異常に起因するものであることで、生体外からの鉄補充操作ではミトコンドリア鉄の欠乏を救済できない可能性を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria produce cellular energy in response to cellular demands. Accumulation of dysfunctional mitochondria due to impaired quality control system, links to multiple human disorders. Recent studies revealed that elimination of damaged mitochondria through the autophagy is important for the quality and quantity control of them. We have revealed that autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors with accumulation of cellular stress and damaged mitochondria. During mitochondrial collapse in autophagy deficit tissues, we observed that liver mitochondria in autophagy-deficient mice show decreased iron content, however total iron contents in a cell is normal. These results suggested that insufficiently amounts of iron cause deformation of oxidative phosphorylation complex in a mitochondrion, then mitochondrion turn to be inactive. Alos abnormal iron distribution in a cell might cause an aggravating factor for the cellular environment, such as a trigger for fenton reaction.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 鉄代謝 小胞 神経変性疾患 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

細胞内に取り込まれる鉄量は生体において厳密に制御されており、一旦細胞内に取り込まれると、鉄はその存在がヘム合成や鉄-硫黄クラスター形成にとって重要である一方、遊離鉄は容易に酸化ストレスを生成する触媒となってしまうことから、適切な場（小器官など）に適切な輸送（エンドソームなど）が行われることが重要である。一方、ミトコンドリアの生理的機能についてはこれまで、ATP 産生や脂質代謝をはじめとする多くの細胞生存に必須な機能が報告されてきたが、さらにミトコンドリアはヘム合成、鉄-硫黄クラスター生成の重要な場であり、ミトコンドリアにおける鉄代謝関連因子の変異 (Frataxin など) は、余剰かつ異常な状態の鉄から生成される酸化ストレス(ヒドロキシラジカル)が細胞内環境の悪化を引き起こし、ヒト神経疾患の原因になるなど、疾患との関わりが注目されている。その中で細胞に取り込まれてからミトコンドリアへたどり着く鉄の輸送や、ミトコンドリア内の鉄代謝、維持機構については、未だ詳細な分子メカニズムが明らかにされていない。

これまでの研究から、パーキンソン病責任因子であるミトコンドリアキナーゼ PINK1 やユビキチンリガーゼ Parkin が、機能障害ミトコンドリアを細胞内から細胞内分解系オートファジーを用いて駆除することを報告してきた (ミトコンドリア機能維持システム、業績欄参照)。さらには、細胞からオートファジーを欠損させた場合に認められる機能障害ミトコンドリアの発生・蓄積過程において、そのごく初期においてミトコンドリアが鉄を正常に維持できなくなることを新たに見出したこれは、近年疾患との関わりが注目されているミトコンドリア機能維持システム (品質管理) の一つであるオートファジーを欠損させたマウス個体に顕著に認められるものであり、オートファジーの生理的機能には機能不良ミトコンドリアの駆除以外にも、積極的に細胞内、特にミトコンドリア鉄動態を制御、維持する新機能が存在することを示唆した。

ミトコンドリアが機能維持のためにどのようにして細胞内鉄を取り込み、厳密に制御しながら代謝していくのかを明らかにすることは、関連疾患の分子病態理解のためにも非常に重要である。

2. 研究の目的

(1) ミトコンドリア鉄異常とオートファジー欠損の関係性

ミトコンドリアの鉄維持がオートファジー欠損により損なわれるという観察結果は、その理由として「オートファジーが関与する細胞内からミトコンドリアへの鉄動態 (輸送、供給) の不全」と、「ミトコンドリア機能障害におけるいち表現形としての鉄減少」が考えられる。

細胞内における鉄動態へのオートファジーの関与は、細胞内鉄量の減少に呼応して、鉄貯蔵タンパク質フェリチンの一部がオートファジー・リソソーム経路で分解され細胞内に鉄を供給する可能性が報告されており、これまでの観察結果と合わせると、オートファジー・リソソーム経路が関わる鉄の供給機構を用い、積極的にミトコンドリア鉄を供給している可能性が考えられる。これらの可能性をマウス個体、培養細胞を用いて検証する。その一方で、ミトコンドリア機能障害には共通してその初期段階において鉄量の減少が認められる可能性も考えられる。一つには、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 (電子伝達系) の形成タンパク質には鉄配位タンパク質が多く認められることから、ミトコンドリア機能障害における複合体崩壊過程において鉄が流出する可能性、さらに機能障害ミトコンドリアに集積するストレス応答性タンパク質 (ユビキチン、p62/SQSTM1 など) とそれに応答した転写変化 (Keap1-Nrf2 経路など) が、鉄応答性タンパク質の存在量を変化させることで、最終的にミトコンドリアへの鉄供給あるいは取り込みが抑制されている可能性も考えられる。これらの可能性については、オートファジー欠損ではない他の手法によるミトコンドリア機能障害を引き起こした場合の鉄量変化を検討することや、ミトコンドリア鉄量変化前後の転写状態を特にストレス応答性、もしくは鉄応答性因子について検討することで検証していく。

(2) ミトコンドリア機能制御のための鉄動態の重要性

これまでに明らかにしてきたミトコンドリア機能維持システムの内容から、ミトコンドリア機能維持にとっての鉄動態制御の重要性は明らかである。このことは、ミトコンドリアの機能維持、もしくは軽度の機能障害ミトコンドリアの回復について、ミトコンドリアへの鉄供給、維持を回復させることが有効な手段である可能性を示している。近年、ミトコンドリアにおけるヘム合成の前駆物質 (5-アミノレブリン酸、5-ALA) を経口投与することによってヘム合成経路の活性化が認められることが報告されており、本研究計画で使用するオートファジー欠損マウス、細胞においてもこのような鉄の補充実験が有効であるかを *in vivo* で検討する。同時に、マウス組織、および各ミトコンドリア鉄関連因子ノックダウン細胞などから精製したミトコンドリアを用いた、鉄補充とミトコンドリア機能評価実験などを *in vitro* で行うことで、より詳細な分子メカニズムを明らかにし、最終的にはミトコンドリア機能制御のための手法開発へと発展させる。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア鉄異常とオートファジー欠損の関係性を検討

これまでにミトコンドリア機能異常の初期段階における鉄減少が認められている、オートファジー欠損マウスと培養細胞を用い、特にミトコンドリア画分を比較的容易に精製できる肝臓特異的なオートファジー欠損マウスを用い、形態学的、組織学的、生化学的、さらに遺伝子発現プロファイルなどを検討した。組織・細胞における鉄定量、鉄染色や鉄関連因子の挙動などを中心に検討した。ミトコンドリアに種々のストレスや鉄異常を加えることが可能な、オートファジーもしくはミトコンドリア関連因子欠損培養細胞系も用いた。

さらに、転写レベルでの鉄動態変化が認められるかについて、すでに所有するオートファジー欠損組織と野生型組織から得られた遺伝子発現プロファイルの解析結果の中から、特に鉄関連因子の挙動について再検討した。

(2) ミトコンドリア機能制御のための鉄動態の重要性検討

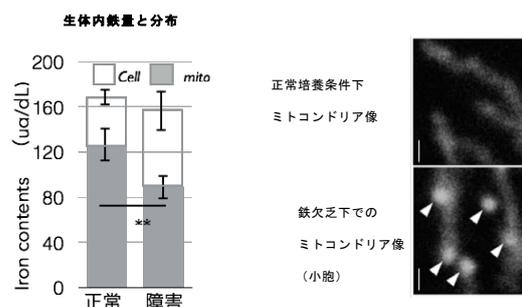
使用予定である肝臓特異的なオートファジー欠損マウスを用い、「ミトコンドリア機能救済のための手法」を、鉄補充法を中心として検討した。

ミトコンドリア鉄異常を示すマウスに腹腔への鉄投与（鉄デキストラン）によりミトコンドリア機能の回復（チトクロームcオキシダーゼ活性、呼吸鎖複合体形成など）、鉄量の回復などが認められるかを検討した

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア鉄異常とオートファジー欠損の関係性

オートファジー欠損マウスにおけるミトコンドリア鉄の異常な減少が認められる一方、細胞全体での鉄量は変化せず、ミトコンドリアから流失した鉄は細胞質内で異所性に存在し得ることを明らかとし、このことは鉄動態（細胞内での鉄の移動、局在、利用など）異常が細胞環境の増悪の原因となることを示唆した（図左）。この現象はヒト神経由来培養細胞においても再現され、細胞内鉄動態異常はミトコンドリアの機能維持の崩壊を招くことを確認した。



さらにミトコンドリア機能の指標となるミトコンドリア形態（ダイナミクス）を詳細に検討した結果、ミトコンドリアが鉄欠乏状

態に陥ると、ミトコンドリア膜が特異的に突出した小胞様の構造をとることを明らかとした（図右）。小胞様構造にはミトコンドリアに関連すると予想される幾つかのオルガネラ、細胞内分解システム、小胞形成のためのシステムが関与していること、小胞には特異的な基質が含まれることも明らかにしており、ミトコンドリアを積極的にメンテナンスするシステムとしては、オートファジーやユビキチン・プロテアソームシステム等従来報告されてきたもの以上に、多様な細胞内メカニズムの関与が予想される結果となった。

今後はこのミトコンドリア小胞の形成をミトコンドリア機能指標として捉えることで、新たなミトコンドリア関連疾患マーカーの検討を行う。

(2) ミトコンドリア機能制御のための鉄動態の重要性

臓特異的なオートファジー欠損マウスを用い、鉄補充法を中心としてミトコンドリア機能回復を検討した。結果、腹腔内鉄補充においては、ミトコンドリア機能の回復は容易には認められず、鉄過剰の影響と思われる臓器鉄沈着、炎症反応の促進などが認められた。このことは、ミトコンドリア鉄欠乏である原因が、細胞内鉄分布異常に起因するものであることから、生体外からの鉄補充操作ではミトコンドリア鉄の欠乏を救済できない可能性を示しており、より特異的なミトコンドリア鉄補充の手法、並びに過剰に分布している細胞質性鉄の除去などをさらに検討する必要性が考えられた。

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 2 件）

- (1) Narumi T., Shishido T., Otaki Y., Kadowaki S., Honda Y., Funayama A., Honda S., Hasegawa H., Kinoshita D., Nishiyama S., Takahashi H., Arimoto T., Miyamoto T., Watanabe T., Tanaka A., Woo CH., Abe J., Takeishi Y., and Kubota I.
Cardiac-specific Overexpression of High-mobility Group Box 1 Attenuates Cardiomyocyte Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction associated with the Pathogenesis of Doxorubicin-induced Cardiomyopathy
J. Mol. Cell. Cardiol., 2015 (82):1-12.
査読あり
- (2) Tamiya G., Makino S., Hayashi M., Abe A., Numakura C., Ueki M., Tanaka A., Ito C., Toshimori K., Ogawa N., Terashima T., Maegawa H., Yanagisawa D., Tooyama I., Tada M., Onodera O., Hayasaka K.

A Mutation of COX6A1 Causes a Recessive Axonal or Mixed Form of Charcot-Marie-Tooth Disease
Am. J. Hum. Gen., 2014
Sep4;95(3):294-300. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 田中敦、井上弘章、大塚理奈、Heidi McBride
鉄代謝障害に応答するミトコンドリア由来小胞の形成とその詳細
第 88 回日本生化学会年会・第 38 回日本分子生物学会年会
2015 年 12 月 3 日
神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- (2) 井上弘章、大塚理奈、田中敦 (責任著者)
細胞内ストレスに応答するミトコンドリア由来小胞の形成メカニズム
第 88 回日本生化学会年会・第 38 回日本分子生物学会年会
2015 年 12 月 2 日
神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- (3) 田中敦
ストレス応答性ミトコンドリア由来小胞の形成とリソソームの関係
第 9 回オートファジー研究会・第 3 回オートファジー班会議
2015 年 11 月 16 日
淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)
- (4) 田中敦、井上弘章、大塚理奈、水島昇
細胞内鉄異常とミトコンドリアストレス応答のメカニズム
第 39 回日本鉄バイオサイエンス学会
2015 年 8 月 29 日
岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)
- (5) 田中敦
ストレス応答性ミトコンドリア由来小胞の形成と鉄代謝の関係性
第 14 回日本ミトコンドリア学会年会
2014 年 12 月 3~6 日
九州大学医学部 100 年講堂 (福岡県・福岡市)
- (6) 田中敦
Analysis of mitochondria-derived vesicle formation in response to cellular stress
第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 25~27 日
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (7) 田中敦
細胞内に取り込まれた鉄の動態とミトコンドリア機能維持の関係性
第 87 回日本生化学会年会 (招待講演)

2014 年 10 月 15~18 日
京都国際会議場 (京都府・京都市)

- (8) 押切由美、田中敦 (責任著者)
Analysis of mitochondria-derived vesicle formation in response to cellular stress
第 87 回日本生化学会年会
2014 年 10 月 15~18 日
京都国際会議場 (京都府・京都市)
- (9) 田中敦
細胞内鉄の動態とミトコンドリア機能維持メカニズムの関係
第 38 回鉄バイオサイエンス学会
2014 年 9 月 6~7 日
仙台国際センター (宮城県・仙台市)

[図書] (計 2 件)

- (1) 田中敦、岡本徳子、風間智彦
「さまざまなモデル生物からミトコンドリア画分を分離する簡便な方法」
実験医学 (羊土社) 2014 年 9 月号
Vol. 32 No. 14 " クローズアップ実験法 "
2283-2291 (9 ページ)
- (2) 田中敦
問題は膜で包んで分解へ
実験医学 (羊土社) 2014 年 4 月号
Vol. 32 No. 6 " News & Hot Paper Digest "
890-891 (2 ページ)

[その他]

- (1) ホームページ等
<http://tanaka.yu-med-tenure.com>
- (2) 研究人材データベース JREC-IN ポータルサイト化 (2014 年 10 月より) にともなう「研究人材キャリア情報」へのインタビュー記事掲載
<https://jrecin.jst.go.jp/seek/html/yomimono/tokuhon1/entry/02.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
田中 敦 (Atsushi TANAKA)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号：60404000
- (2) 研究分担者
なし ()
研究者番号：
- (3) 連携研究者
なし ()
研究者番号：
- (4) 研究協力者
大塚 理奈 (Rina OTSUKA)
研究者番号：なし
井上 弘章 (Hiroaki INOUE)
研究者番号：なし