

## 140. ミトコンドリア品質管理からアプローチする疾患生物学

田中 敦

Key words: ミトコンドリア, 品質管理,  
オートファジー, 鉄代謝

\*山形大学 医学部  
メディカルサイエンス推進研究所  
田中敦研究室

### 緒 言

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー産生・脂質代謝・ヘム生合成などの主要器官として知られるが、近年神経変性疾患を始めとするさまざまな疾患の発症原因としてミトコンドリアの機能を維持するメカニズム（品質管理）の崩壊が目されるようになってきた。ミトコンドリア品質管理のひとつとして、細胞内分解系オートファジーが機能不全に陥ったミトコンドリアの駆除（マイトファジー）に重要であること、それにはパーキンソン病関連因子が関与していることをこれまでに明らかにしてきたが<sup>2,4)</sup>、これらの成果は、単一遺伝子産物の機能解析では病態解明が困難であった神経変性疾患の理解に「ミトコンドリアの品質管理とその破綻」という視点をもたらした点で世界に先駆けた成果であった。しかしながら個体内の生理的なレベルでのミトコンドリア品質管理の意義については、マイトファジーも含め未だ明確な証拠は示されていない。また、ミトコンドリア機能は、細胞内の個々のミトコンドリアの機能の総和（ミトコンドリアネットワーク）として定義される<sup>4)</sup>。その際にどれだけの個別機能不良ミトコンドリアの蓄積が全体のミトコンドリア機能を負に傾けるか（閾値）は、未だ明確に検出されていない。本研究課題では「生理的なレベルでのミトコンドリア品質管理とその崩壊像の検出」と「ミトコンドリア機能不良の閾値検出と、ミトコンドリア機能指標となりうる新規バイオマーカー検出」を目標に以下の検討を行った。

### 方 法

#### 1. オートファジー必須遺伝子欠損マウスを用いた生化学的・形態学的検討

オートファジー必須遺伝子である ATG5 (*Autophagy-related 5*)<sup>5)</sup> を肝臓 (*ATG5<sup>lox</sup>/Mx1-Cre*) および神経系 (*ATG5<sup>lox</sup>/Nestin-Cre*) で欠損したマウスを用い、ミトコンドリア機能の崩壊過程を組織形態学的に、あるいは臓器から分画精製したミトコンドリア<sup>6)</sup> を生化学的に観察・検討した。

#### 2. 薬剤処理による哺乳動物培養細胞株へのミトコンドリアストレス負荷とその影響検討

ミトコンドリアに対するさまざまなストレス負荷薬剤を用い、その影響をミトコンドリアの形態、機能、酸化ストレスなどを指標に観察検討した。各種哺乳動物培養細胞株に対し、ミトコンドリア膜電位消失剤 CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)、呼吸鎖阻害剤 Antimycin A、鉄キレート剤 DFO (Deferoxamine) などを処理し、細胞を固定後に各種抗体による免疫抗体染色を行い、ミトコンドリアの形態およびコンディションを検討した。観察にはレーザー共焦点顕微鏡および生細胞観察用の蛍光顕微鏡システムを用いた。

### 結果および考察

#### 1. オートファジー欠損により生体内ミトコンドリアの機能異常が発生・蓄積する

オートファジー必須遺伝子を欠損したマウスの臓器（肝臓）内のミトコンドリア形態を観察した結果、膨潤した異常な形態を認めた（図1）。これは一般的にミトコンドリアの機能が失われ、機能指標となる膜電位の消失を示唆するも

\*現所属：山形大学 医学部 メディカルサイエンス推進研究所 生化学解析センター 田中敦研究室

のであり、オートファジー欠損から時間依存的にその異常形態の増加が認められることから、オートファジーの生理的な機能はミトコンドリア機能維持に必須であることが確認された。神経組織におけるオートファジー欠損においても、ミトコンドリア形態異常が認められたことから、異なる臓器においても広くミトコンドリア機能維持におけるオートファジー機能の必要性が示唆された。

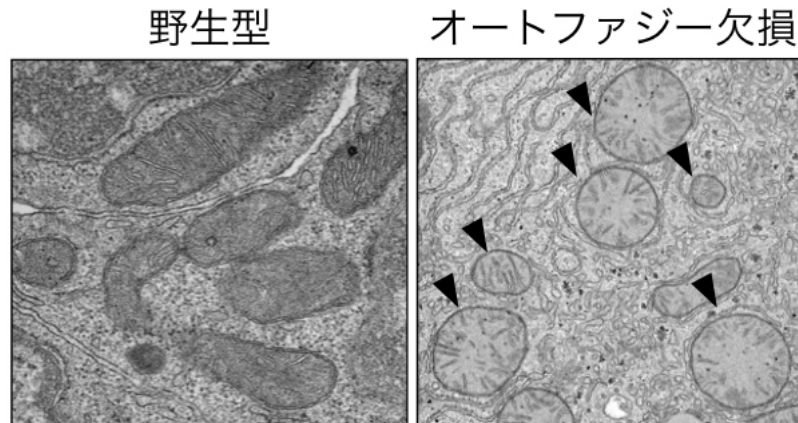


図1. オートファジー欠損により生体内ミトコンドリアの形態異常が認められる。

オートファジー欠損マウス肝臓におけるミトコンドリア形態は野生型マウスのミトコンドリア (左) と比較して膨潤した異常な形態を示す (右)。

2. オートファジー欠損により認められる生体内ミトコンドリアの崩壊は鉄異常を併せ持つ

ミトコンドリア形態異常を示す臓器 (肝臓) からミトコンドリアを生化学的手法により分画。精製した。結果ミトコンドリアにおけるストレス関連タンパク質の増加 (ユビキチン化タンパク質, ユビキチンアダプター p62 タンパク質など) が認められること、ミトコンドリア主要機能である酸化リン酸化反応 (ATP 産生) 複合体のサブユニットタンパク質の欠落, それによる ATP 産生量の低下, ミトコンドリア呼吸鎖活性の低下などが認められた (図2)。これらのことは全て、オートファジー欠損臓器のミトコンドリア機能の崩壊過程を生化学的にも示すものであった。

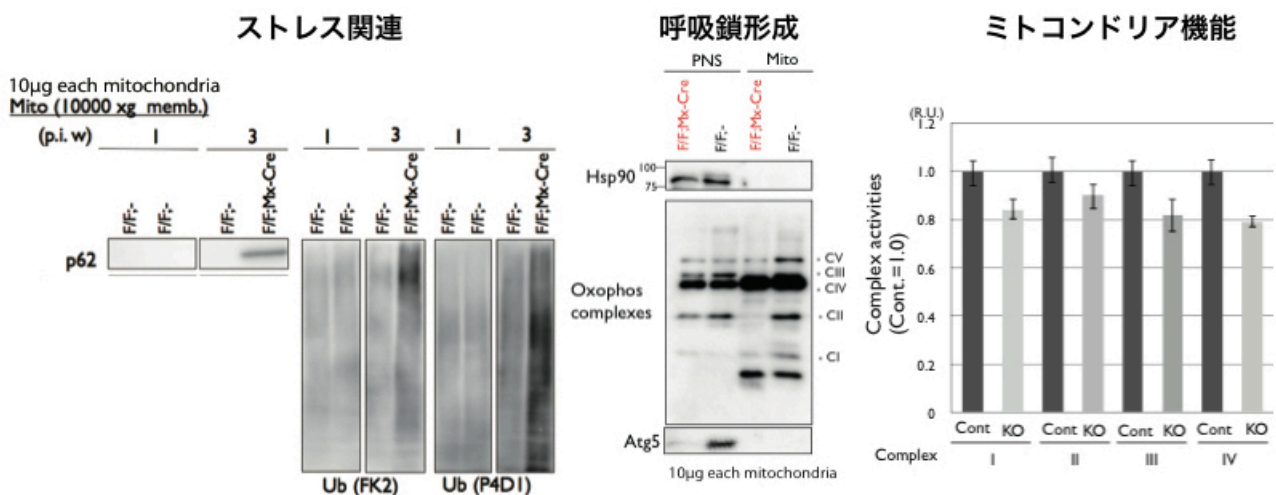


図2. オートファジー欠損により生体内ミトコンドリアの機能異常が発生・蓄積する。

オートファジー欠損マウスより分画精製した肝臓ミトコンドリアを用いた解析。ミトコンドリアにはユビキチン化したタンパク質の蓄積, ユビキチンアダプター p62 タンパク質の局在化などが認められる (ストレス関連)。さらに ATP 産生に必要なタンパク質複合体サブユニットの欠落が認められる (呼吸鎖形成)。それに伴いミトコンドリア機能としての呼吸鎖活性の低下も生じる (ミトコンドリア機能)。

またさらに、ミトコンドリアが機能異常に陥っている状態ではミトコンドリアが保持する鉄量が有意に低下していること、しかしながら等細胞タンパク質量における鉄量の変化はほぼ認められないことが明らかになった（図3）。これらのことはミトコンドリアが正常に鉄を保持できていないことを示唆した。またこのミトコンドリア鉄量の低下はミトコンドリアが形態異常を示すよりも早期に検出できることが明らかとなり、このことはミトコンドリア鉄量のモニターが、組織・細胞内コンディションの指標として適用できる可能性を示すものであった。

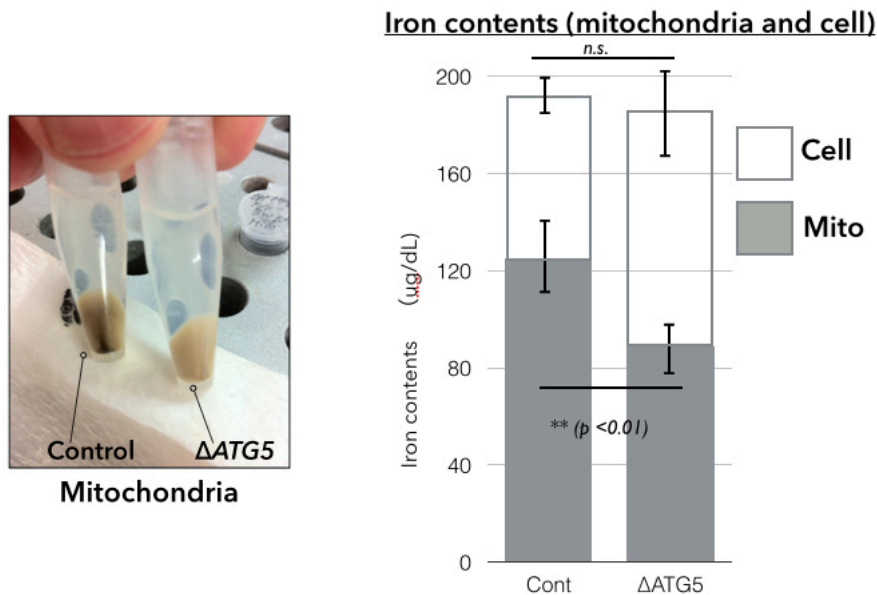


図3. オートファジー欠損により認められる生体内ミトコンドリアの崩壊は鉄異常を併せ持つ。

野生型およびオートファジー欠損マウス肝臓から得られたミトコンドリア画分（左）は鉄性の色素の差が認められる。各ミトコンドリア画分および細胞全画分の鉄量を検討した結果、オートファジー欠損肝臓ミトコンドリアにおいて有意に鉄量の減少が認められたが、等細胞タンパクあたりの鉄量には有意差が認められなかった。

### 3. 細胞内鉄異常を引き起こすとミトコンドリア機能異常が認められる

ミトコンドリアにおける鉄量の異常を引き起こすために、培養細胞に対して鉄キレート剤である Deferoxamine (DFO) を処理しその影響を観察したところ、薬剤に対する長時間暴露はミトコンドリアからのシトクローム c の漏出を引き金とする一連の細胞死（アポトーシス）を示すこと、そこに至るまでにミトコンドリア機能の段階的な低下を示すことを明らかとした（図4）。これらのことはミトコンドリアが利用する鉄の量が厳密に維持制御されることがミトコンドリア機能と細胞内環境に重要であることを示唆した。

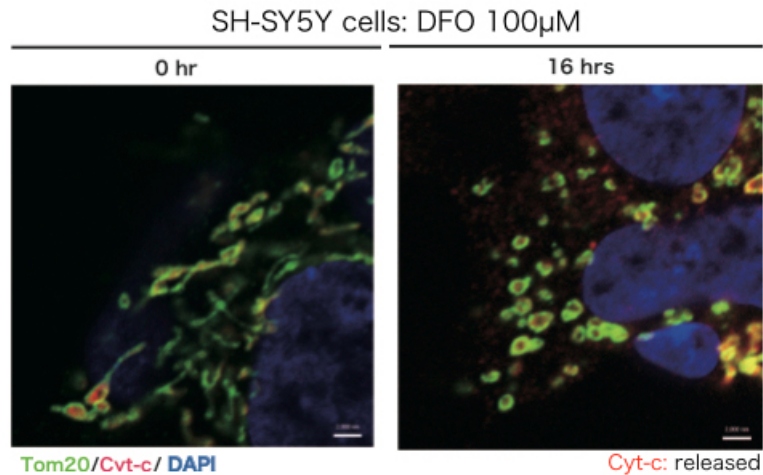


図4. 細胞内鉄異常を引き起こすとミトコンドリア機能異常が認められる。

ヒト培養細胞 SH-SY5Y 細胞に鉄キレート剤である Deferoxamine (DFO) を処理すると、正常なミトコンドリア形態 (0 hr) に比較して断片化した機能異常形態を示す (16 hrs). この時、ミトコンドリアから漏出し細胞死のイニシエーターとなるシトクローム c の細胞質への放出 (赤) が認められる. Scale bar: 1  $\mu$ m

4. 細胞内鉄異常により認められるミトコンドリア機能異常には、初期においてストレス応答小胞形成が認められる  
ミトコンドリアが鉄異常に晒された場合、ストレスに対して初期にどのような応答を示すかを観察したところ、ミトコンドリア外膜を主成分とする特徴的な小胞の形成が認められることを明らかとした (図5). この小胞形成はミトコンドリア機能異常部位を選択的に内包し、ミトコンドリアから細胞内分解・解毒の場であるリソソームやペルオキシソームへと向かうことがこれまでに明らかにされており、鉄異常応答性の小胞についても、何らかの選択的内包物をミトコンドリアから隔離、出芽している可能性が考えられた。

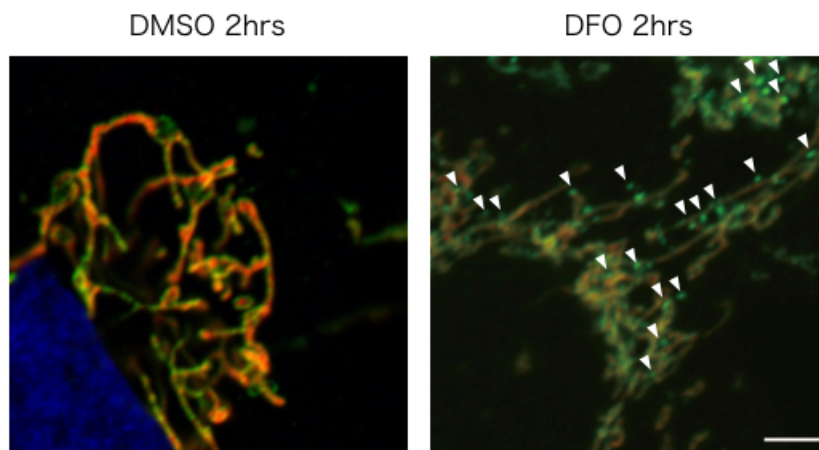


図5. 細胞内鉄異常により認められるミトコンドリア機能異常には、初期においてストレス応答的な小胞形成が認められる。

SH-SY5Y 細胞への鉄キレート処理 (DFO) 初期において、ミトコンドリアから小胞の形成が認められる (右, 2 hrs, 白矢頭). 小胞の形成は処理時間とともに増大する. Scale bar: 1  $\mu$ m.

ミトコンドリア機能維持にとってのオートファジーの生理的重要性を確認し、その欠損によるミトコンドリア崩壊像の詳細な解析からミトコンドリア鉄異常を特徴とする初期崩壊像をつかむことができた. さらには細胞内において鉄

異常を感知したミトコンドリアは、小胞形成によりストレス応答を示している可能性が明らかになり、今後この小胞形成の生理的意義とその阻害に因るミトコンドリア機能変化をさらに解析したい。

### 共同研究者

本研究における共同研究者は McGill 大学 Heidi McBride 教授, 東京大学大学院医学系研究科の水島 昇教授である。本研究にご支援いただきました上原記念生命科学財団に深謝します。

### 文 献

- 1) Tanaka, A. & Youle, R. J. : ミトコンドリアの品質維持とパーキンソン病. *細胞工学*, **29** : 431-437, 2010.
- 2) Narendra, D. P., Tanaka, A., Suen, D. F. & Youle, R. J. : Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.*, **183** : 795-803, 2008.
- 3) Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D. F., Karbowski, M. & Youle, R. J. : Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J. Cell Biol.*, **191** : 1367-1380, 2010.
- 4) Tanaka, A. : Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin purges damaged organelles from the vital mitochondrial network. *FEBS Lett.*, **584** : 1386-1392, 2010.
- 5) Mizushima, N. & Komatsu, M. : Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, **147** : 728-741, 2011.
- 6) 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*, **32** : 2283-2291, 2014.
- 7) Sugiura, A., McLelland, G. L., Fon, E. A. & McBride, H. M. : A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.*, **33** : 2142-2156, 2014.