

ミトコンドリアの膜構造制御とその生理機能

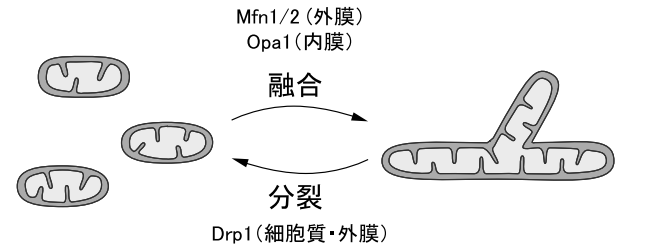
1. はじめに

ミトコンドリアは酸素呼吸細菌の共生を起源とする二重膜構造のオルガネラである。ミトコンドリアは細胞内のほとんどのエネルギーを作り出すのみならずアポトーシス制御・酸化ストレス・代謝・老化など、多様な細胞現象において重要な役割を担っている¹⁾。電子顕微鏡像でもミトコンドリアは容易に特定可能で、また近年はミトコンドリア膜電位、アポトーシス、酸化ストレスなど様々な検出試薬・キットが市販されており、多くの生命学者・医学者にとってミトコンドリアは比較的「身近な」オルガネラであるように思われる。しかしその形や動きなど、ミトコンドリア自身の振る舞いについてはこれまでそれほど注目されていなかった。近年、このミトコンドリアの動的な形態変化の分子機構とその生理的な意義が明らかになりつつある。ここでは特にその生理機能に注目して筆者らの報告と合わせて最新の進展を紹介したい。

2. ミトコンドリアの融合と分裂の分子機構

電子顕微鏡観察ではミトコンドリアは丸、楕円形あるいは細長い構造として観察され、また蛍光染色では多くの培養細胞のミトコンドリアは細胞質内に広がる細長いネットワークとして観察される^{2,3)}。一方、ミトコンドリアはダイナミックなオルガネラであり、生細胞観察を行うと細胞質内で移動し、また融合と分裂を頻繁に繰り返している様子が観察される^{4,5)}。しかし哺乳類の個体においては、どのような組織でまたどのような環境で融合と分裂が活発に起こっているのか、これまでのところほとんど観察されていない。

このミトコンドリアの膜融合・分裂の分子機構に関与する因子として GTPase 群とその関連因子が同定されてきた(図 1)²⁾。ミトコンドリアの融合に機能する因子として、外膜には Mitofusin (Mfn, 酵母では Fzo1) が、内膜には Opa1 (酵母では Mgm1) が知られている。これらはどちらも膜貫通型 GTPase タンパク質であり膜構造変化に直接関与する可能性が考えられる。哺乳類には Mitofusin の二つのアイソフォーム (Mfn1, Mfn2) が発現しており、またその融合関連因子として SLP-2 (Stomatin-like protein 2)



小さく独立したミトコンドリア

- ・アポトーシス促進
- ・ミトコンドリア分化?
- ・ミトコンドリアの空間配置

ミトコンドリアのネットワーク

- ・変異mtDNAの相補
- ・細胞内ミトコンドリア均質化
- ・ミトコンドリア機能維持に必須

図1 融合と分裂によるミトコンドリア形態変化

ミトコンドリアは融合して長くつながったミトコンドリアのネットワークを形成する。この時、細胞内のミトコンドリアの内容物が均質化する。またミトコンドリアゲノムに変異が蓄積したミトコンドリアは正常なミトコンドリアと融合してその機能を相補すると考えられている。この過程には外膜の GTPase である Mfn1/2 と内膜の GTPase である Opa1 が機能している。また、分裂により小さく独立したミトコンドリアが形成される。分裂によりミトコンドリアの数が増え、細胞内に分散して分布ようになる。分裂により一つ一つのミトコンドリアは独立するため、細胞内で機能の異なるミトコンドリアが形成できると考えられる。この分裂には Drp1 が機能する。

や MIB (Mitofusin-binding protein) が報告されている。また、Opa1 は内膜融合のみならずクリステ形成にも関与している。酵母では外膜と内膜の融合に関与する GTPase の間を連結する因子が同定されている。外膜融合と内膜融合が協調して起こることは合理的に思えるが、哺乳類を含むその他の種では未だ不明である。酵母遺伝学解析から分泌経路の膜融合に必須な NSF (NEM-sensitive fusin protein) はミトコンドリア融合に必須でないことが明らかになっているが⁶⁾、それでは二つのミトコンドリアの間で外膜・内膜の二枚の膜の融合がどのような機構で起こるのか、大変興味深い。高等植物でもミトコンドリアが融合することが生細胞観察から明確に示されているにもかかわらず、ミトコンドリアの Mitofusin ホモログは見られないようだ³⁾。Mitofusin は一体どのように機能するのか解明が待たれる。

ミトコンドリア分裂に機能する因子であるダイナミン様 GTPase タンパク質 (哺乳類では Drp1 または Dlp1, 酵母では Dnm1) は種を超えて普遍的に保存されている²⁾。その関連因子として、広く保存された外膜タンパク質 Fis1, 酵母類に存在する WD モチーフを持つ Mdv1, Caf4 などが単離されている。またショウジョウバエ細胞のスクリーニングから単離された外膜因子 Mff は哺乳類まで保存されており、高等植物のスクリーニングから単離された Elm1 は Drp1 と協調的に機能する植物特異的な因子である。こ

のように現在も分裂に機能する因子の同定と解析が進められつつある。面白いことに Drp1 はペルオキシソームの分裂にも機能しており、また植物では葉緑体の分裂にミトコンドリア分裂とは別のダイナミン様タンパク質が機能することも報告されている³⁾。今後、種を超えて保存された普遍的機構と種特異性機構の両面の解析から分裂の分子機構理解が進められていく必要がある。

3. ミトコンドリア融合の生理機能

酵母のミトコンドリア融合因子変異株では酸素呼吸不全となりその後 mtDNA が欠失することから、ミトコンドリアの活性維持に融合が必須であることがわかっている²⁾。HeLa 細胞やマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) の融合抑制条件でも呼吸活性が低下する⁶⁾。しかし、なぜ融合不全細胞では呼吸欠損となりまた mtDNA を欠失するのか、その理由はわかっていない。

Fzo はショウジョウバエの精子形成不全変異体の原因遺伝子として単離された、精子特異的 Mitofusin ホモログである⁷⁾。ミトコンドリアは精子分化時には鞭毛中片部に集まり巻き付くが、ショウジョウバエではこの過程に Fzo が関与することから、精子分化にミトコンドリア融合が必須であることがわかっている。

2003 年にミトコンドリア形態形成不全モデルマウスとして初めて Mfn1 と Mfn2 の遺伝子欠損マウスが報告された⁸⁾。それぞれ一方のみを欠損したマウスはいずれも胎生期初期に致死となったことから、Mitofusin の両アイソフォームは異なる必須の機能を持つことが示された。同時に Mfn2 は胎盤形成に必須であるとも報告されているがその詳細は不明である。その後 Opa1 変異マウスも胎生致死となることが報告されている。Mfn2 と Opa1 は神経変性疾患の原因因子となること、また神経特異的 Mfn2 欠損マウスは神経機能不全となることから、ミトコンドリア融合は神経機能維持に必須な反応であることが明らかになっている⁶⁾。

前述したようにミトコンドリア融合が阻害されると結果的に呼吸不全となることが酵母と哺乳類で報告されている。また Mfn2 欠損神経細胞でも同様に呼吸障害が観察される。今後ミトコンドリア融合の生理機能を理解するには、なぜ細胞中でミトコンドリア融合が活性維持に必須であるのか、明らかにする必要があるだろう。酵母の遺伝学研究から得られた興味深い知見として、分裂因子を欠損すると、融合が呼吸維持に必須でなくなることが報告されている^{2,9)}。細胞内で融合と分裂が同時に進行していることを

踏まえてその生理機能を解析していくことが今後必要であろう。

4. ミトコンドリア分裂の生理機能

哺乳類培養細胞では、Drp1 のドミナントネガティブ変異体発現あるいは RNAi による発現抑制を用いてミトコンドリア分裂の解析が進められてきた。これまでに、分裂阻害でアポトーシスの進行が遅延するとの報告を契機にして、アポトーシスにおけるミトコンドリア動態の解析が活発に進められてきている¹⁰⁾。Fis1 の発現抑制でもアポトーシスが遅延し、逆に Opa1 を抑制するとアポトーシスが促進される。またこれらの形態制御因子がミトコンドリア融合・分裂とは異なる過程でアポトーシス制御に関わる可能性も考えられる。ミトコンドリア膜構造変化はアポトーシス進行において重要な過程であり、また同時にアポトーシスはミトコンドリア形態制御因子の働きを知る上で有益な解析系となっている。

酵母のミトコンドリア分裂変異体は呼吸活性も正常で、ミトコンドリアの形態以外に目立った表現型は見られない²⁾。ミトコンドリア分裂変異シロイヌナズナは成長が遅延し、また線虫は Drp1 抑制により幼虫期に発生が停止する³⁾。我々は哺乳類の細胞分裂期のミトコンドリア動態を解析し、細胞分裂期に Drp1 が特異的に Cdk1/cyclinB によりリン酸化され、ミトコンドリア分裂を促進することを見い出している¹¹⁾。分裂により断片化した多数のミトコンドリアが M 期細胞質中に分散し、その結果ミトコンドリアが娘細胞にほぼ均等に分配される^{11,12)}。ところが Drp1 を完全に欠損した細胞でも細胞分裂は進行するのみならず、酸素呼吸活性、細胞増殖もほとんど変化が見られないことが明確になった。それでは哺乳類のミトコンドリア分裂はどのような機能を担っているのだろうか。

5. 哺乳類個体におけるミトコンドリア分裂の機能

近年、生後 37 日で死亡した患者から Drp1 の優性突然変異が報告され、Drp1 が哺乳類の発生に必要な可能性が示唆されていた¹³⁾。我々はミトコンドリア分裂の生理機能を明らかにする目的で Drp1 遺伝子の条件欠損マウス系列を構築した¹²⁾。Drp1 を欠損した MEF 細胞は前述の通り細胞増殖・酸素呼吸ともにほぼ正常であったにもかかわらず、Drp1 全身欠損マウスは胎生期初期に致死となった。このことから Drp1 は初期発生に必須であることが明らかになった。

これまでに神経培養細胞やショウジョウバエの遺伝学的

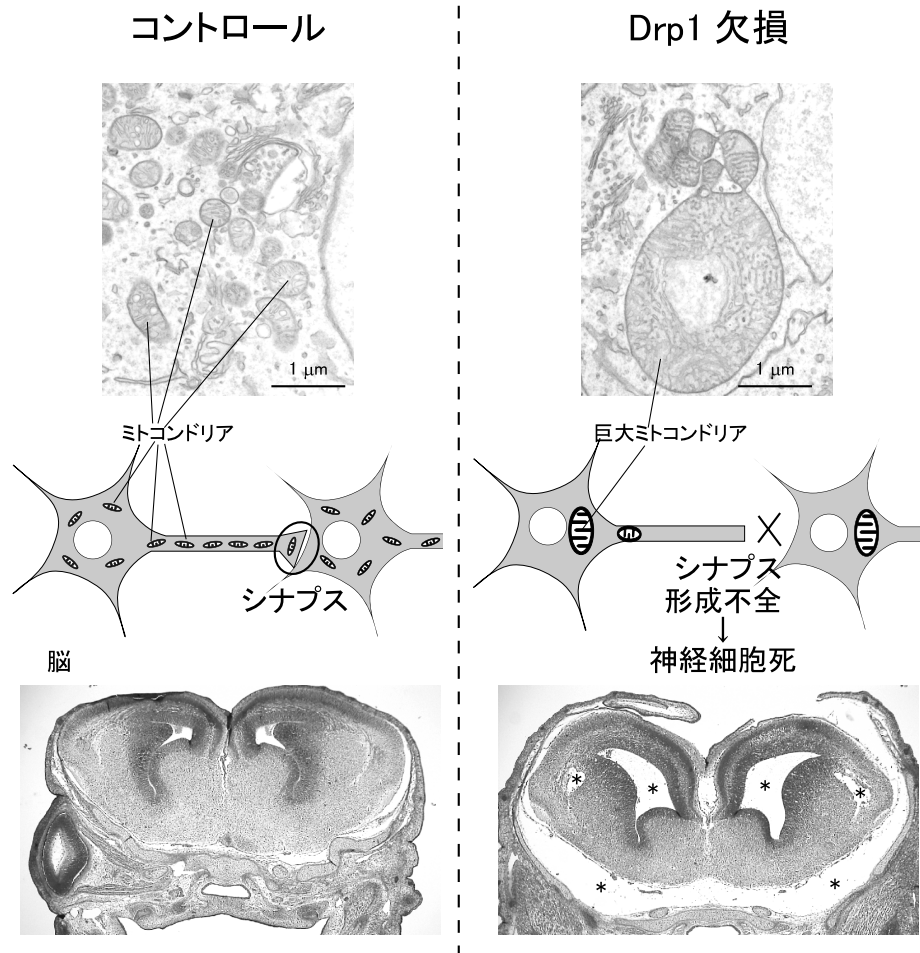


図2 神経細胞におけるミトコンドリア分裂の生理機能

神経細胞特異的に Drp1 を欠損したマウス胎児の、脳の形成（ヘマトキシリン-エオシン染色，下図）とミトコンドリア形態（電子顕微鏡像，上図）を観察した．左：コントロールのマウス胎児，右：Drp1 神経欠損マウス胎児．神経特異的 Drp1 欠損マウス胎児では脳の低形成が認められる（“*”）．Drp1 を欠損した神経細胞では巨大ミトコンドリアが細胞体に観察されるが神経突起にはあまり観察されない．この神経細胞はシナプス形成不全となり神経細胞死が誘導される．

解析から，ミトコンドリア分裂が神経形成に重要な機能を持つことが示唆されていた．そこで我々は Cre-loxP システムを用いて，ミトコンドリア分裂の神経形成における生理機能の解析を行った（図2）^{12）}．神経特異的 Drp1 欠損マウスは出生直後に致死となった．胎児脳切片を観察すると，白質低形成による脳全体のサイズの縮小と脳室の拡大が認められた．

これまで哺乳類培養系及び線虫を用いた解析から，Drp1 の機能抑制で神経細胞死が抑制されることが報告されている．しかし Drp1 全身欠損マウス及び神経特異的欠

損マウスの胎児脳の TUNEL 染色を行ったところ，いずれも顕著な神経細胞死が誘導されていることを見出した^{10）}．さらにこの胎児脳から単離培養した神経細胞は分化可能であるにもかかわらず，細胞あたりの神経突起数が有意に減少していた．野生型では細胞あたり 10 以上の突起が観察される細胞が多く観察されたが，Drp1 欠損神経細胞では 2-4 の突起を持つ細胞が優先的に観察されるようになった．さらに，シナプスマーカーによる染色を行ったが，Drp1 欠損神経細胞ではその形成はほとんど認められなくなった．このとき神経細胞体には極めて肥大化したミ

トコンドリアが存在しており、一方神経突起内のミトコンドリアは減少していた。これらの結果から、ミトコンドリアの分裂阻害によりミトコンドリアの空間配置異常となり、その結果シナプス形成不全から神経細胞死を引き起こすのではないかと考えられる。胚の初期発生過程では不均等な細胞分裂と細胞分化により組織形成が進んでいく。初期発生時には神経以外にもミトコンドリアの分配制御が必須となる過程があり、その結果全身欠損マウスは胎生致死となるのではないかと考えられる。

6. お わ り に

ミトコンドリアの融合・分裂の生理機能を理解するために今後様々な組織特異的欠損マウスを解析することは極めて有用であると考えられる。併せて、マウス組織や発生・分化・病変などにおけるミトコンドリア形態と動態をより詳細に観察する必要がある。もう一つの重要な課題は、このミトコンドリアの動的変化の、ミトコンドリアの品質管理及びミトコンドリアゲノム増殖における効果である¹⁴⁾。ミトコンドリアの最大の特徴の一つは自身のゲノムを持つことであり、またその変異導入は様々な病態を引き起こすと考えられている。ミトコンドリアゲノムの遺伝様式、さらには変異ミトコンドリアゲノムの選別と排除の過程における、ミトコンドリア融合・分裂の効果の詳細はこれまでほとんど解析されていない。

さらに細胞内で障害を蓄積したミトコンドリアが選択的に除去され分解されることが近年明らかになりつつある¹⁵⁾。興味深いことに、パーキンソン病モデル系ショウジョウバエを用いた研究において、ミトコンドリアの融合・分裂を人為的に変動させることによる治療効果が報告されている¹⁶⁾。このようにミトコンドリア融合・分裂は様々なミトコンドリア関連疾患の新規治療ターゲットとしても期待されている。今後ミトコンドリアの動的な振る舞いが分子機構と生理機能の両面から理解されていくことにより、ミトコンドリアが関与する幅広い研究領域・疾患に新しい視点をもたらすことができるのではないかと考えている。

謝辞

本解説文は現所属の東京医科歯科大学細胞生理学（水島昇教授）、前所属の九州大学分子生命科学（三原勝芳教授）の研究室のメンバーと共に進めた研究を基にして寄稿した。特にマウス研究では九州大学病態制御内科の野村政壽講師、神経病理学の鈴木論准教授に多大なご協力を戴いて

いる。多くの共同研究者の方々に深く感謝致します。

- 1) 内海耕鎚, 井上正康 (2001) 新ミトコンドリア学, 共立出版。
- 2) Okamoto, K. & Shaw, J.M. (2005) *Annu. Rev. Genet.*, **39**, 503–536.
- 3) 林 純一ほか (2004) 二層膜オルガネラの遺伝学, 共立出版。
- 4) Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y., & Mihara, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 891–898.
- 5) Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W., & Walter, P. (1997) *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1233–1242.
- 6) Chen, H., Chomyn, A., & Chan, D.C. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 26185–26192.
- 7) Hales, K.G. & Fuller, M.T. (1997) *Cell*, **90**, 121–129.
- 8) Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., & Chan, D.C. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 189–200.
- 9) Sesaki, H. & Jensen, R.E. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 699–706.
- 10) Suen, D.F., Norris, K.L., & Youle, R.J. (2008) *Genes. Dev.*, **22**, 1577–1590.
- 11) Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., & Mihara, K. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 11521–11529.
- 12) Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., Taguchi, N., Morinaga, H., Maeda, M., Takayanagi, R., Yokota, S., & Mihara, K. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 958–966.
- 13) Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W., Mooyer, P. A., Wanders, R.J., & Leonard, J.V. (2007) *N. Engl. J. Med.*, **356**, 1736–1741.
- 14) Nakada, K., Sato, A., & Hayashi, J.I. (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1907–1913.
- 15) Ishihara, N. & Mizushima, N. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 1–2.
- 16) Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M.F., McQuibban, A., Vogel, H., & Lu, B. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7070–7075.

石原 直忠

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
細胞生理学分野)

Regulation and physiological roles of mitochondrial dynamics

Naotada Ishihara (Department of Physiology and Cell Biology, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan)

核内高分子ノンコーディング RNA の世界

1. は じ め に

多くの人はノンコーディング RNA といえば、「RNA サイレンシング」に関わる長さが 20–30 塩基の「小さな RNA」