

ミトコンドリア品質管理機構と神経機能制御

白根 道子

1. はじめに

FK506-binding protein 38 (FKBP38) は主にミトコンドリア外膜に存在する膜型シャペロンタンパク質であり、そのカルボキシ末端に膜貫通ドメインを有するテールアンカー型のタンパク質である。FKBP38 は peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) 活性を持つ FKBP ドメインを有しているが、一般的な FKBP 分子と異なり Ca^{2+} -カルモジュリン結合時にのみ PPIase が活性化されるという点で特殊である。FKBP38 の機能として、Bcl-2 や Bcl-x_L をミトコンドリアにリクルートしアポトーシスを抑制することが知られている。FKBP38 欠損マウスは異常なアポトーシスを生じ、神経管閉鎖不全を呈し生直後に死亡する。このように FKBP38 はミトコンドリアにおけるアポトーシス制御に重要な因子であるが、最近我々は、マイトファジー（損傷ミトコンドリアをオートファジーにより除去する機構）の際に FKBP38 と Bcl-2 がミトコンドリアから小胞体へ移動し、ミトコンドリアがなくなってもアポトーシスを抑制し続けることを発見した。ほかのミトコンドリアタンパク質のほとんどがマイトファジーによって分解されてしまうのに対し、FKBP38 と Bcl-2 だけが小胞体へ移動することは特徴的である。このタンパク質の運命決定は、そのカルボキシ末端側のアミノ酸配列の電荷に依存し、FKBP38 や Bcl-2 のように塩基性度が低いタンパク質は小胞体へ移動することが明らかとなった。このように、FKBP38 はミトコンドリアの品質管理機構に関与し、健常時と病態時のいずれにおいてもアポトーシス抑制に働いている。

2. FKBP38 は多機能のシャペロンタンパク質である

FKBP は、免疫抑制剤 FK506 とラパマイシンに結合するイムノフィリンファミリータンパク質であり、PPIase 活性により結合分子のコンホメーションや輸送を制御している。FKBP38 の名称は、ヒトでは FKBP38、マウスでは FKBP8 であるが、もともと我々は Bcl-2 の結合タンパク質としてヒトの脳の cDNA ライブラリーから同定した経緯があるため FKBP38 の呼称を用いている¹⁾。FKBP38 の PPIase 活性は、 Ca^{2+} -カルモジュリン修飾により活性化される非典型的な FKBP である。FKBP38 は全組織に普遍的に発現しているが、特に神経系に発現が高い。FKBP38 はミトコンドリアに Bcl-2 や Bcl-x_L のような抗アポトーシス分子をリクルートしアポトーシスを抑制するが（後述）、ほかにも (i) 26S プロテアソームに結合し、prolyl 4-hydroxylase domain-containing enzyme (PHD2) の分解調節を介して hypoxia-inducible transcription factor (HIF1) 安定性の制御、(ii) 熱ショックタンパク質 Hsp90 のコシャペロンとして働き、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) や電位依存性カリウムチャンネル HERG のフォールディングや細胞内局在の調節、(iii) nonstructural protein 5A (NS5A) に結合しウイルス RNA の複製制御、(iv) 低分子量 GTPase の Rheb を介して mammalian target of rapamycin (mTOR) の抑制、に関与する²⁾ことが知られている。

3. FKBP38 はミトコンドリア依存的なアポトーシスを抑制する

ミトコンドリア外膜の完全性が損なわれると、シトクロム *c* 等が放出されカスパーゼが活性化されてアポトーシスが誘導される。Bcl-2 はもともと濾胞性リンパ腫の染色体転座 t(14; 18) の切断点近傍に位置する遺伝子として発見された³⁾。Bcl-2 ファミリータンパク質群はミトコンドリア外膜の透過性制御に働いており、その中で Bcl-2 や Bcl-x_L はアポトーシス抑制に働いている⁴⁾。Bcl-2 ノックアウトマウスでは、アポトーシス亢進により全身にさまざまな不全が認められる⁵⁾。我々は以前に、FKBP38 が Bcl-2 や Bcl-

九州大学生体防御医学研究所（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学生体防御医学研究所分子医科学分野）

Mitochondrial quality control and regulation of neuronal function

Michiko Shirane (Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan)

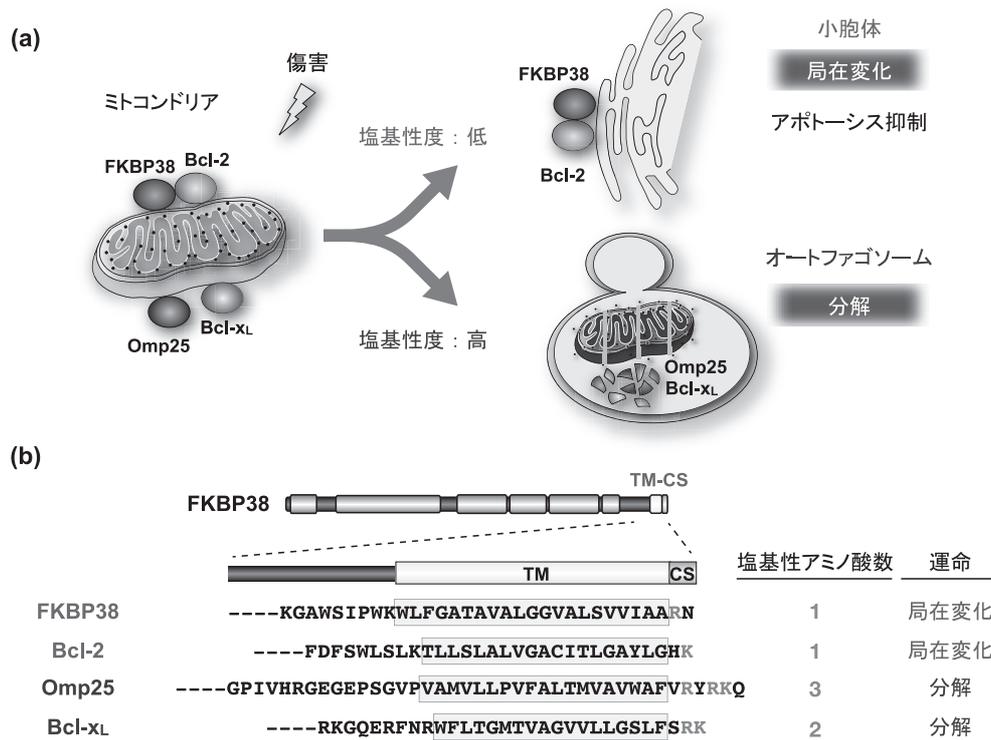


図1 マイトファジーにおけるミトコンドリアタンパク質の運命

(a) ミトコンドリアが傷害を受けると、多くのミトコンドリアタンパク質はマイトファジーにより分解されるが、FKBP38やBcl-2は小胞体へ移動しアポトーシス抑制に働く。(b) マイトファジー時のミトコンドリアタンパク質の運命は、カルボキシ末端のアミノ酸 (CS) の塩基性度に依存する。すなわち塩基性度が低いと局在変化し、高いと分解される。(Shirane-Kitsuji, M. & Nakayama, K.I. (2014) *Int. J. Bio. Cell Biol.*, 51, p. 21 より Elsevier の許諾を得て転載)

xLをミトコンドリアにリクルートしアポトーシス抑制に寄与していることを見いだした¹⁾。またその調節機構が他グループより報告され、細胞内カルシウム濃度の上昇によりFKBP38とCa²⁺-カルモジュリンが複合体を形成し、その結果Bcl-2との結合が促進されることが示されている⁶⁾。さらに我々は、アルツハイマー病の原因に関与するプレセニリンがFKBP38と結合しBcl-2のミトコンドリア局在化を抑制することを明らかにし、FKBP38と精神神経疾患との関連が示唆されている⁷⁾。

4. FKBP38は神経上皮の細胞構築に必須である

FKBP38欠損マウスは、100%の割合で二分脊椎という神経管閉鎖不全を呈し、生直後に死亡する⁸⁾。その神経上皮組織では細胞構築が乱れており、異常なアポトーシスの亢進が認められる。また発生期の神経系において、FKBP38はSonic Hedgehogの抑制分子として働いており、FKBP38欠損マウスでは、Sonic Hedgehogシグナルの拡大と神経管の腹側化が顕著に認められる⁹⁾。

5. マイトファジーに伴いFKBP38は局在変化する (図1)

1) Parkin 依存的ミトコンドリア分解

オートファジーは、栄養飢餓などの状況下で、細胞内の細胞質成分、オルガネラ、タンパク質などを脂質膜で包み液胞やリソソームと融合し分解する機構である。ミトコンドリア特異的なオートファジーはマイトファジーと呼ばれ、損傷ミトコンドリアを除去し細胞を傷害から守る役割を果たしている¹⁰⁾。ユビキチン化酵素Parkinとリン酸化酵素PINK1はマイトファジーの制御機構に関与しており、これらの遺伝子変異はパーキンソン病における黒質線条体のドーパミン神経脱落と関連している。ミトコンドリアが損傷を受けると、膜電位低下に伴いPINK1が外膜上に凝集し、Parkinが細胞質から損傷ミトコンドリアに選択的にリクルートされる。Parkinはミトコンドリアタンパク質をユビキチン化し、それに伴いミトコンドリアは隔離膜に包まれリソソームと融合する。

2) マイトファジー時のミトコンドリア消去からの避難

我々は、FKBP38がミトコンドリアタンパク質であるこ

とから、マイトファジーとの関連を調べた¹¹⁾。まずマウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts: MEF) に Parkin を過剰発現させてミトコンドリア脱共役剤 carbonyl-cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) で処理し、マイトファジーが培養細胞で再現できるか試みた。その結果、ミトコンドリアの消失に伴い、TOM40, Tim23, シトクロム *c* などのミトコンドリアタンパク質の減少が認められ、マイトファジーが確認できた。しかし予想に反して、FKBP38 も Bcl-2 も量的変化は認められず分解されなかった。内在性の Parkin を発現している神経細胞株 SHSY5Y においても同様に、CCCP でマイトファジーを誘導した際、多くのミトコンドリアタンパク質が消失したにも関わらず FKBP38 と Bcl-2 は分解されなかった。しかし興味深いことに、イムノブロット解析では FKBP38 の量的変化は認められなかったものの、イメージング解析では FKBP38 の細胞内分布パターンが変化することに気がついた。すなわち、FKBP38 はマイトファジー誘導前にはミトコンドリア様のチューブ状パターンに分布しているのだが、マイトファジー誘導後には小胞体様のメッシュ状パターンに分布が変化する。各種オルガネラマーカールとの共免疫染色を行ったところ、FKBP38 はマイトファジー誘導によりミトコンドリアから小胞体に局在変化する事が確認された。この事実は、生化学的にオルガネラを分画する実験によっても重ねて証明された。また KikGR という光変換型蛍光タンパク質タグを利用して、マイトファジー誘導後に小胞体に観察される FKBP38 が、小胞体で新規合成されたものではなくミトコンドリアから小胞体に移動したものであることを確認した。そしてこの FKBP38 の局在変化が起こる条件を詳細に調べたところ、単なるミトコンドリア膜電位低下では起こらず Parkin 依存的なマイトファジーシグナルに伴って起こることがわかった。ちなみに、オートファジーを誘導する典型的な栄養飢餓では起こらなかった。またプロテアソーム活性には依存しなかった。さらに、mitochondria-associated ER membrane (MAM) と呼ばれるミトコンドリアと小胞体の接点を介した移動ではなく、微小管依存的な小胞輸送を介した移動であることが示唆された。ところで、FKBP38 欠損マウスの MEF でも野生型の MEF と同様にマイトファジーは誘導されることより、マイトファジーの誘導には FKBP38 は必要ないことが確認された。そこで、マイトファジー時の FKBP38 の局在変化の生理的意義について検討したところ、マイトファジーを誘導した際、野生型に比べて FKBP38 欠損マウスの MEF ではアポトーシスの有意な亢進が認められた。よって FKBP38 は、マイトファジー時にミトコンドリアから小胞体に避難することにより分解から逃れて細胞内に残存し、アポトーシスの抑制に働いていると示唆された。ミトコンドリアが消去された状況で FKBP38 がアポトーシス抑制作用を示す

ことから、FKBP38 がミトコンドリアだけでなく小胞体依存的なアポトーシス抑制にも寄与している可能性が示唆された。

3) ミトコンドリア・小胞体間のタンパク質の輸送機構

FKBP38 は、Bcl-2, Bcl-x_L, Omp25 とともにミトコンドリア外膜タンパク質で、いずれもそのカルボキシ末端にテールアンカーと呼ばれるミトコンドリア局在化シグナルを有している。しかし、マイトファジー時におけるそれらの運命は異なっている。FKBP38 と Bcl-2 はミトコンドリアから小胞体に避難して生き残り、一方で Bcl-x_L と Omp25 はミトコンドリア除去に伴って分解消去される。ちなみに Bcl-2 と Bcl-x_L とは構造的にも機能的にも類似している。我々は、これらの運命の違いを生じさせる機構が、カルボキシ末端のアミノ酸の電荷と関連があることを見いだした。以前より、カルボキシ末端のアミノ酸配列がミトコンドリアへのタンパク質の局在化に重要であることが知られていたため¹²⁾、FKBP38, Bcl-2, Bcl-x_L, Omp25 のカルボキシ末端のアミノ酸 (COOH-terminal sequence: CS) を比較してみた。すると、小胞体に移動するタンパク質にはアルギニンやリシンといった塩基性アミノ酸が一つしか存在しないのに対し、ミトコンドリアとともに消去されるタンパク質には塩基性アミノ酸が二つ以上存在することに気がついた。そこで、カルボキシ末端を入れ替えた変異体や塩基性アミノ酸の数を变化させた変異体などを作製して、それらのマイトファジー誘導時の運命が変化するか調べた。その結果、やはりカルボキシ末端のアミノ酸の塩基性度が運命決定に強く関連しており、塩基性度が低いと小胞体に移動し、塩基性度が高いとミトコンドリアとともに消去されることが確認された。

6. FKBP38 と神経疾患との関連

パーキンソン病の最も顕著な神経病理学的特徴は黒質線条体のドーパミン神経細胞の脱落であり、その結果、線条体に分泌されるドーパミン量が減少する。マイトファジー関連分子である Parkin と PINK1 の遺伝子変異は、パーキンソン病の病態と関連していることがよく知られている。しかし、マイトファジー自体がパーキンソン病の病態と関連しているという確実な証拠は、いまだ示されていない^{13,14)}。それは、個体のドーパミン神経細胞でマイトファジー現象を顕在化させることが困難なため、したがってパーキンソン病患者脳やパーキンソン病モデル動物脳でマイトファジーの不全が示されていないのが現状である。しかし、パーキンソン病とミトコンドリア不全の関連は確かであると考えられているため、今後実験手技の進歩によりマイトファジーとの関係が明らかにされることが期待され

る。培養細胞を用いた我々の今回の実験結果より、FKBP38はマイトファジーと関連したアポトーシス抑制に働いていることが明らかになったため¹¹⁾、FKBP38がパーキンソン病の進行抑制に寄与している可能性が予想される。FKBP38欠損マウスは生直後に死亡するため、FKBP38欠損マウスではその可能性を検討するのは不可能であった。今後、ドーパミン神経特異的なFKBP38コンディショナルノックアウトマウスを用いることで、その検証が進むことが期待される¹⁵⁾。

- 1) Shirane, M. & Nakayama, K.I. (2003) *Nat. Cell Biol.*, 5, 28–37.
- 2) Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q.J., Liu, Y., & Jiang, Y. (2007) *Science*, 318, 977–980.
- 3) Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., & Croce, C.M. (1984) *Science*, 226, 1097–1099.
- 4) Youle, R.J. & Strasser, A. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 47–59.
- 5) Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M.C., Fields, L.E., Lucas, P.J., Stewart, V., Alt, F. W., et al. (1993) *Science*, 261, 1584–1588.
- 6) Edlich, F. & Lucke, C. (2011) *Curr. Opin. Pharmacol.*, 11, 348–353.
- 7) Wang, H.Q., Nakaya, Y., Du, Z., Yamane, T., Shirane, M., Kudo, T., Takeda, M., Takebayashi, K., Noda, Y., Nakayama, K.I., & Nishimura, M. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, 14, 1889–1902.
- 8) Shirane, M., Ogawa, M., Motoyama, J., & Nakayama, K.I. (2008) *Genes Cells*, 13, 635–651.
- 9) Bulgakov, O.V., Eggenschwiler, J.T., Hong, D.H., Anderson, K.V., & Li, T. (2004) *Development*, 131, 2149–2159.
- 10) Youle, R.J. & Narendra, D.P. (2011) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, 9–14.
- 11) Saita, S., Shirane, M., & Nakayama, K.I. (2013) *Nat. Commun.*, 4, 1410.
- 12) Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., & Borner, C. (2003) *J. Cell Biol.*, 160, 53–64.
- 13) Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Goetz, C.G., Marin, C., Kordower, J.H., Rodriguez, M., Hirsch, E.C., Farrer, M., Schapira, A.H., & Halliday, G. (2010) *Nat. Med.*, 16, 653–661.
- 14) Vives-Bauza, C. & Przedborski, S. (2011) *Trends. Mol. Med.*, 17, 158–165.
- 15) Shirane-Kitsuji, M. & Nakayama, K.I. (2014) *Int. J. Bio. Cell Biol.*, 51, 19–22.

著者寸描

●白根 道子 (しらね みちこ)



九州大学生体防御医学研究所准教授。博士(薬学)。

■略歴 1990年大阪大学理学部卒業。99年博士(薬学, 東京大学)。2000年より日本学術振興会特別研究員。03年より科学技術振興機構さきがけ研究者。04年より九州大学生体防御医学研究所助手。06年より同助教授。07年より同准教授。

■研究テーマと抱負 神経発生・分化・機能制御の分子機構について、主に細胞生物学的な方法で研究している。脳神経系の機構や神経精神疾患の理解に繋がるような研究を目指したい。

■ウェブサイト <http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

■趣味 音楽。