

総説

融合と分裂によるミトコンドリアの形態制御の分子機構と生理機能

石原直忠

ミトコンドリアはダイナミックなオルガネラであり融合と分裂を繰り返しながらその膜構造を動的に変化させている。ミトコンドリアの融合と分裂に関与する、局在の異なる三つの GTPase 群が同定されたことをきっかけにして、哺乳類のミトコンドリア形態制御の分子機構が解明されるようになってきた。近年ではこれらの知見をもとにしてその生理機能の理解も進められつつあり、パーキンソン病など神経変性疾患や、糖尿病など代謝性疾患など多様な病態にミトコンドリアの動的変化が関与していることが明らかになりつつある。哺乳類ミトコンドリアの形態制御、特に融合と分裂についてこれまでの研究の進展と近年の知見を概説する。

1. ミトコンドリアの形態

ミトコンドリアは酸素呼吸細菌の共生を起源とする細胞内オルガネラであり、内部に自身の DNA を持ち、核との協調のもとに増殖・遺伝している^{1,2)}。このミトコンドリアは酸素呼吸により真核細胞内のほとんどのエネルギーを生産するのみならず、脂質やステロイドホルモン・ヘムなど多様な代謝に関与している。またアポトーシス制御において中心的な機能を持つこと、ATP 合成に伴って副次的に産生される酸化ストレスの主要な発生源として多様な病態に関与することなどから、近年では幅広い研究領域で注目を集めるようになってきている^{2,3)}。

古くからこのミトコンドリアの構造は光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察されており、ミトコンドリアは多くの組織で細長くまた枝分かれした構造をとることが知られている^{4,5)}。また、筋細胞の中のミトコンドリアが筋繊維に沿って分布すること、また精子では鞭毛の中片部にらせん状に

巻き付いていることなど、ミトコンドリアの構造が種や組織によって大きく変動することが知られている。しかしこのミトコンドリアの特徴的な構造がどのように形成されるのか、またその形態変化が生命にとってどのような意義を持つかなど、その分子機構と生理機能に関してこれまであまり注目して解析されておらず、特に哺乳類においては限られた知見しか得られていなかった。

2. 融合と分裂によるミトコンドリアの動的な形態変化

ミトコンドリア特異的蛍光色素やミトコンドリア局在化型蛍光タンパク質を用いてミトコンドリアの培養細胞内での生細胞観察を行うと、細胞内でミトコンドリアが動的にその構造を変化させている様子が観察できる(図1)。別々のミトコンドリアが繋り融合して一つのミトコンドリアになり、また一つのミトコンドリアが分裂していく様子を頻繁に観察することができる^{6,7)}。

ミトコンドリアの融合が活性化するとミトコンドリアの長いネットワークが形成され、また逆に分裂が活性化すると細胞内で小さなミトコンドリアの数が増加する。酵母の遺伝学的解析をもとにして、この融合と分裂を両方停止させた酵母ではミトコンドリアの形態が野生型とほぼ同様の正常な形態に回復することから、ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスによって維持されていることが明らかにされた^{8,9)}。

久留米大学 分子生命科学研究所 高分子化学研究部門
(〒839-0864 福岡県久留米市百年公園 1-1 久留米リサーチセンタービル内)

Molecular mechanism and physiological roles of mitochondrial fusion and fission

Naotada Ishihara (Department of Protein Biochemistry, Institute of Life Science, Kurume University, Kurume Research Center Building, 1-1 Hyakunin-koen, Kurume, Fukuoka 839-0864, Japan)

本総説は 2009 年度奨励賞を受賞した

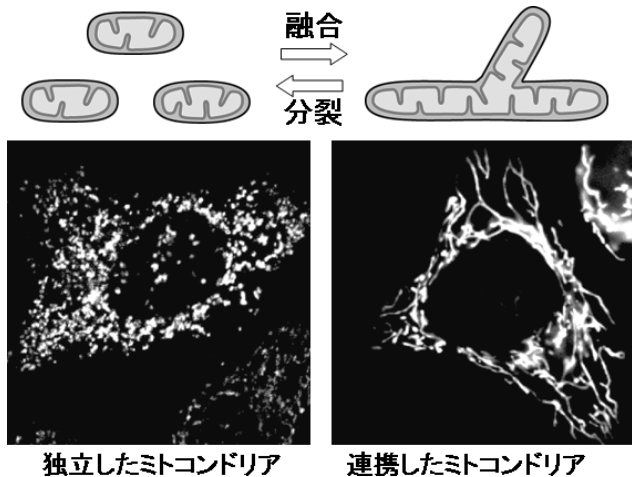


図1 融合と分裂によるミトコンドリアの形態制御

ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスによって維持されている。融合の促進, または分裂の抑制によってミトコンドリアは長く連携し細胞内でネットワーク構造を形成するようになる。逆に分裂の促進, または融合の抑制によってミトコンドリアは小さく断片化され, 細胞内でのミトコンドリアの数が増加することになる。

3. ミトコンドリア融合と分裂を制御する 三つの GTPase 群

ミトコンドリアの動的構造変化の分子機構理解を目指した研究は, 1990 年代に出芽酵母を用いた酵母のミトコンドリア形態不全変異株の単離を中心にして進められた⁵⁾。またショウジョウバエや哺乳類からも関連因子群が同定され, 種を超えて保存された局在の異なる三種の GTPase 群が, ミトコンドリアの融合と分裂に機能することが明らかになっている (図2)。我々は, ミトコンドリア動的構造制御の哺乳類個体における高次生理機能を理解するためには, 哺乳類の関連因子を同定しその分子詳細を理解する必

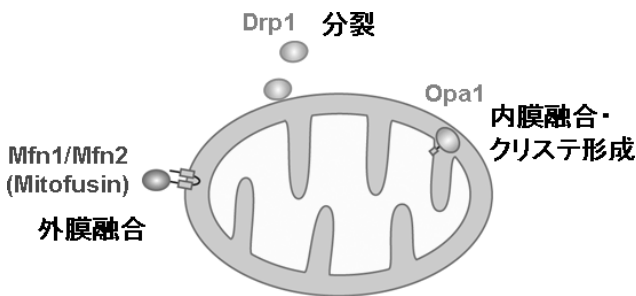


図2 融合と分裂を制御する GTPase 群

種を超えて保存された三つの GTPase 群の局在を図示した。この図には哺乳類の名前を示している。Mitofusin (Mfn)1/Mfn2 は外膜を貫通しておりミトコンドリアの融合に機能する。出芽酵母では Fzo1, ショウジョウバエの精子特異的アイソフォームは Fzo と呼ばれる。Opa1 は膜間スペースで内膜に結合しており融合と内膜のクリステ構造の形成に機能する。出芽酵母ホモログは Mgm1。Drp1 は細胞質からミトコンドリア分裂点に局在化しミトコンドリア分裂に機能する。酵母ホモログは Dnm1。

要があると考え, 哺乳類のミトコンドリア融合と分裂に機能する因子群の同定と解析を続けてきた。

Mitofusin (Mfn)/fuzzy onion (Fzo) はミトコンドリア外膜の融合に^{10,11)}, Opa1/Mgm1 はミトコンドリア内膜の融合に^{12,13)}, また Drp1/Dnm1 はミトコンドリアの分裂に機能している^{14,15)}。哺乳類では Mfn は二つのアイソフォームが発現している^{11,16,17)}。また Opa1 は視神経形成異常となる autosomal dominant optic atrophy type-I から, Mfn2 は末梢神経障害となる Charcot-Marie-Tooth neuropathy type2a から単離されていることから, ミトコンドリア融合は神経機能維持に重要な機能を持っていると考えられる¹⁸⁻²⁰⁾。

4. 哺乳類ミトコンドリア融合反応の解析系構築と 基礎的理解

Fzo (fuzzy onion) は 1997 年にショウジョウバエの雄性不稔変異株から同定された²¹⁾。この変異体では昆虫の精子形成に特徴的にみられる巨大ミトコンドリアの形成が阻害されることで精子形成不全となる。Fzo タンパク質は比較的小分子の大きなタイプの GTPase タンパク質であり, その C 末端部分でミトコンドリア外膜を貫通している。その酵母ホモログ Fzo1 の欠損により細胞内のミトコンドリアが小さく断片化する。また Fzo1 の欠損酵母は酸素呼吸不全となり, ミトコンドリア DNA が欠損する。

我々は哺乳類ミトコンドリアの融合に関与する因子の同定と解析を目指して, まず最初に融合反応の解析系を構築した (図3)。ミトコンドリアのマトリックスに 2 色の異なる蛍光タンパク質を発現する HeLa 細胞をそれぞれ構築することでミトコンドリアを可視化した (図3B 左図)。さらにセンダイウイルスを用いてこれらの細胞同士を細胞融合させ, 2 色に標識されたミトコンドリアを持つ細胞の生細胞観察を行った。するとこの 2 色の蛍光は時間経過に伴って一致した分布を示すようになり (図3B 中), 6~9 時間後にはほぼ全てのミトコンドリアが両方の蛍光を持つようになった (図3B 右)。この結果から, 哺乳類のミトコンドリアは融合してそのマトリックスの内容物を交換できることが明らかになった⁷⁾。

この実験系を用いて哺乳類のミトコンドリア融合の基本反応の観察を行った。様々な阻害剤を用いてミトコンドリア融合の特性解析を行ったところ, 脱共益剤である CCCP の添加によってミトコンドリアの融合がほぼ完全に停止することがわかった (図4A)。この CCCP によるミトコンドリア融合阻害は可逆的であり, 薬剤を洗い流すことで融合活性が再び回復することもわかった (図4B)。融合反応時に微小管の重合を阻害するノコダゾールを添加すると 2 色のミトコンドリア蛍光の混合は強く阻害された (図4A 右)。しかし CCCP 処理後の wash out 時にノコダゾールを添加しても融合は観察されたことから (図4B 右), 微小

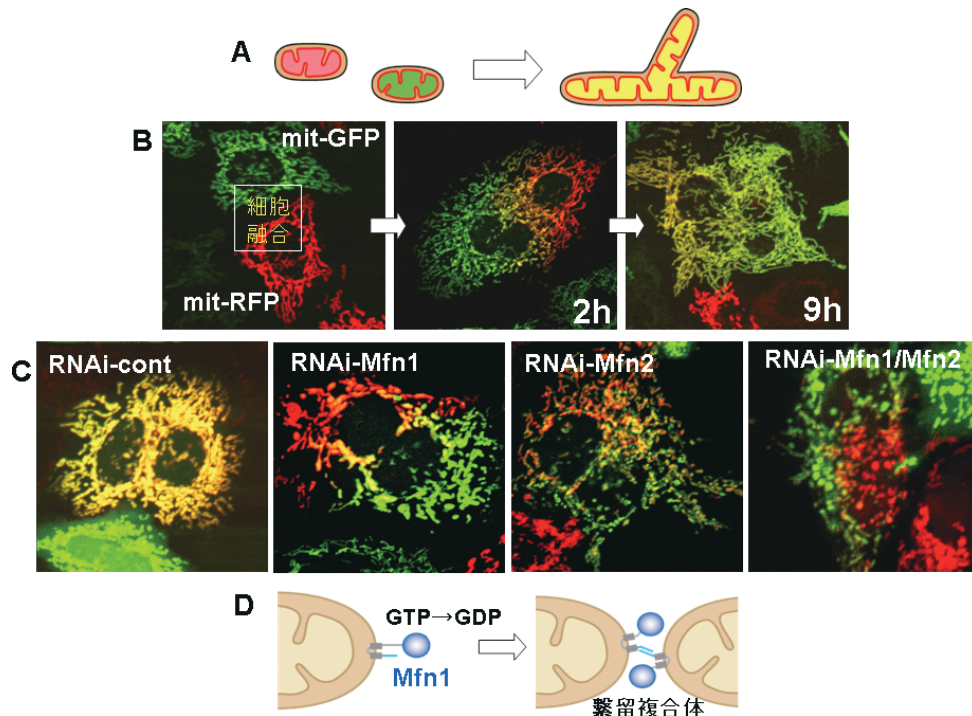


図3 ミトコンドリア融合反応の解析系の構築

A, B ミトコンドリアを2色でそれぞれ標識した細胞を共培養し細胞融合を行うと、生細胞内で2色のミトコンドリアが融合していく様子を観察することができる。

C HeLa細胞の二つのMfnアイソフォームをRNAiにより特異的に発現抑制した後に、Bと同様の方法でミトコンドリア融合を解析した。それぞれ一方のアイソフォームの発現抑制により融合が強く阻害された。またそれぞれの発現抑制によりミトコンドリアの形態に特徴的な変化が観察された。

D Mfn1はGTP加水分解に依存してミトコンドリア間を結合させる繋留複合体を形成する。

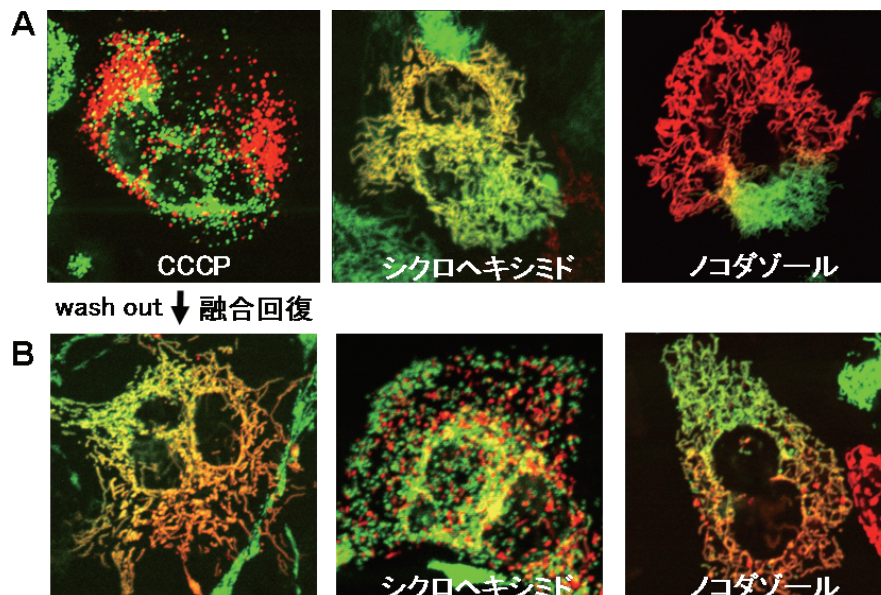


図4 ミトコンドリア融合における薬剤の効果

A 細胞融合と同時に薬剤を添加しミトコンドリア融合反応を観察した。脱共益剤CCCP (左), タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (中), 微小管形成阻害剤ノコダゾール (右)を添加した。

B CCCP処理後に培地を洗い流して膜電位を再回復させると融合活性が回復した。このwash outと同時にそれぞれの薬剤を添加した (中, 右)。

管はミトコンドリアの融合自身には必須ではないことがわかった。通常の融合反応 (図 4A) におけるノコダゾールによる融合阻害は、ミトコンドリアの細胞内移動が阻害されることでミトコンドリアの均質化が阻害されたためと考えられる。タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを添加しても融合反応自体は阻害されないが (図 4A 中)、CCCP 処理後の wash out に伴う融合活性回復時にシクロヘキシミドを添加した場合には、融合の回復が見られないことがわかった (図 4B 中)⁷⁾。

この薬剤を使ってミトコンドリア膜電位を変化させることでミトコンドリアの融合活性を自由に停止・再開させる実験系は、その後の関連因子の機能解析に有用な解析系として広く利用されるようになっていく。なお 2 色の蛍光タンパク質と細胞融合を用いる今回の方法以外に、現在では photoactivatable-GFP など蛍光変換型 GFP を用いて単一細胞内で光刺激後のミトコンドリアに注目して蛍光変化を計測することで、より詳細に融合反応の観察ができるようになっていく²²⁾。

5. 二つの Mitofusin アイソフォームによるミトコンドリア融合の制御機構

このミトコンドリア融合解析実験系を用いて関連因子の詳細観察を行った。酵母及びショウジョウバエの Fzo に相同性を持つ因子が哺乳類には二つ発現しており、Mfn1、Mfn2 と呼ばれている¹¹⁾。これらの因子の特異的抗体を作製し、組織における発現を観察したところ、これらは確認したほぼ全ての組織で発現が認められたが、それぞれの組織によってその発現様式が大きく異なっており、たとえば脳では Mfn2 がより強く、心臓では Mfn1 が比較的強く発現していた¹⁶⁾。

これらの因子の機能分担を解析する目的で、HeLa 細胞で RNAi による発現抑制を行いミトコンドリア融合活性を観察した (図 3C)。それぞれ一方の Mfn アイソフォームを発現抑制すると強い融合阻害が見られ、両方の RNAi により完全に融合活性が阻害された。それぞれ一方の RNAi によってミトコンドリアの形態が大きく変化することも確認された。これらの結果から、哺乳類の二つの Mitofusin アイソフォームの両方が HeLa 細胞のミトコンドリアの融合と形態を正常に維持するために必須であることが明らかになった¹⁶⁾。

さらに我々はこれらの二つのアイソフォームの機能の詳細を理解するため、単離したミトコンドリアを用いて試験管内反応系により詳細な解析を行った。まず我々は、定常状態において多量体を形成している Mfn タンパク質が、GTP 加水分解に伴ってさらに大きな複合体に変化することに気付いた。この反応は GTP の非加水分解アナログ GTP γ S により阻害されることから、GTP 加水分解が必須

であることがわかった。一方、Mfn2 は Mfn1 と比較してこの GTP 依存的な変化が極めて小さく、実際に GTP 加水分解活性も弱かった。さらに興味深いことに、この Mfn1 の複合体は二つの独立したミトコンドリア間でも形成されること、この複合体に依存してミトコンドリア同士が結合することが確認された。これらの結果から、Mfn1 の GTP 加水分解活性はミトコンドリアの融合反応に先立って起こるミトコンドリア間の繫留を促進していることが明らかになった²³⁾ (図 3D)。

我々の報告とほぼ同時期に Mfn1 の C 末端の細胞質ドメインの断片の部分立体構造が解かれ、逆並行の二量体を形成することが示された。この構造は我々が生化学的解析から提案するミトコンドリア繫留仮説とよく合致している²⁴⁾。Mfn2 のミトコンドリア融合における Mfn1 との機能分担は現在もまだよくわかっていないが、一方、ミトコンドリア融合以外の機能が報告されてきている。Mfn2 が細胞増殖刺激応答²⁵⁾、小胞体とミトコンドリアの結合²⁶⁾に加えて、ミトコンドリア外膜上での抗ウイルス自然免疫応答に関与すること²⁷⁾が報告されている。外膜同士が結合した後に、Mfn1 による繫留複合体はどのように解離し、どのような機構で二つのミトコンドリア膜の融合が進展するのか、解決すべき大変興味深い問題であると考えている。

6. Opa1 の切断によるミトコンドリア融合活性の制御機構とミトコンドリア品質管理

我々は、上記ミトコンドリア融合反応系の解析から、ミトコンドリア内膜の膜電位が融合に必須であること、膜電位を再獲得した時の融合活性の回復には新規タンパク質合成が必須であることを見出していた (図 4、図 5A)⁷⁾。この結果から、我々はミトコンドリアが自身の呼吸活性を何らかの機構で感知し、融合を制御しているのではないかと考えた。このミトコンドリア呼吸活性失活による膜電位消失時の融合制御機構を解明する目的でさらなる解析を行ったところ、内膜のダイナミン様 GTPase、Opa1 の変動を明らかにすることになった。

視神経形成異常の遺伝病の原因因子である Opa1 は、酵母の融合に必須な因子 Mgm1 (mitochondria genome maintenance) の哺乳類ホモログである^{12,18,19)}。我々は、ミトコンドリアが膜電位を消失すると Opa1 の分子量が複雑に変化していくことに気が付いた。まず、ヒトの Opa1 には少なくとも 8 種類のスプライスバリエントが発現しており、N 末端付近の内膜結合ドメインと思われる疎水性領域の前後に様々な挿入が起こることがわかっていた²⁸⁾。HeLa 細胞を CCCP で処理すると、Opa1 の高分子量側のバンドが消失し、またいくつかの低分子側バンドが増加した。この反応の詳細を理解するため、主要なアイソフォーム (バリエント 1 とバリエント 7) を外来的に発現させ、CCCP 処理

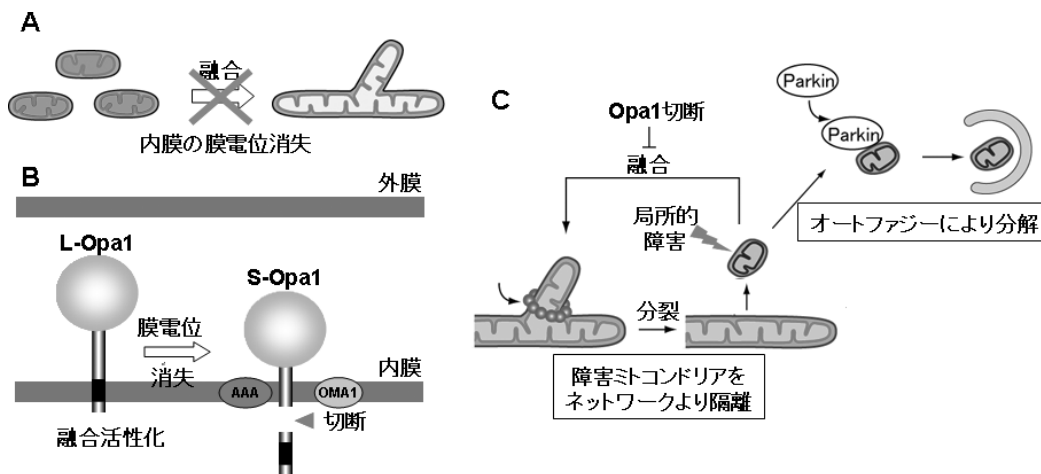


図5 Opa1の切断によるミトコンドリア融合活性制御のモデル図

A, B 膜電位消失時には、ミトコンドリア内のL-Opa1のN末端部分がタンパク質切断を受けS-Opa1に変換される。この切断によりミトコンドリアは融合活性化能を失う。膜電位消失時にはL-Opa1が新規合成され、ミトコンドリアに輸送され融合活性が回復する。

C ミトコンドリアの動的な品質管理のモデル図。障害を受け膜電位を消失したミトコンドリアは、Opa1の切断を介して融合活性を失うことでミトコンドリアネットワークから隔離される。また同時に膜電位を消失したミトコンドリアはParkinの局在化を引き金としてオートファジー分解される。このミトコンドリア動態と分解に関して現在多くの研究が進められているが、上記図はモデルであり、その全容理解には今後の解析が必要であると考えている。

への反応を観察したところ、やはりどちらのアイソフォームも高分子側のバンド (L-Opa1 と名付けた) が消失し、低分子側のバンド (同 S-Opa1) が増加した。これらの切断点解析を行ったところ、N 末端の膜結合ドメイン付近でタンパク質切断を受けていることがわかった。切断前の L-Opa1 と切断後の S-Opa1 の活性を観察するため、RNAi により抑制した細胞にそれぞれのアイソフォームを再導入して活性を観察したところ、L-Opa1 の発現時に融合活性が回復することがわかった。これらの結果から、膜電位を失うと内膜付近で Opa1 がタンパク質切断を受け、その結果ミトコンドリア融合活性を失うことが明らかになった。膜電位を回復させた時には、細胞質での新規タンパク質合成に伴って L-Opa1 がミトコンドリア内に輸送・再供給されることで、ミトコンドリア融合活性が回復すると考えられる²⁹⁾(図 5)。

酵母の Mgm1 もタンパク質切断により活性の制御を受けるが、そのシステムはかなり異なっている。Mgm1 の切断にはミトコンドリア内膜のロンボイド様プロテアーゼが関与することが明確に示されている^{30,31)}。一方、哺乳類の Opa1 の切断反応に関してはロンボイド様プロテアーゼ PARL、二つのトポロジーの異なる内膜 AAA プロテアーゼ (m-AAA 及び i-AAA プロテアーゼ) や Oma1 など、様々なプロテアーゼの関与が報告されている^{29,32~37)}。この切断反応の詳細や、膜電位の感知機構、また切断による Opa1 機能の変化の詳細など、多くの疑問が現在も残されている。

この Opa1 切断制御の報告を契機として、ミトコンドリア

の動的変化がその品質管理に関与するのではないかと考えられるようになってきた (図 5C)^{38,39)}。細胞の中で一部のミトコンドリアのみが失活し膜電位を失った場合、そのミトコンドリアの内部で Opa1 が切断を受け融合活性を失うことで失活したミトコンドリアが細胞内ミトコンドリアネットワークから排除されることになる。つまり障害を受けたミトコンドリアの隔離システムとして機能する可能性が考えられる。さらに最近、膜電位を失ったミトコンドリアにはパーキンソン病の原因遺伝子産物である Parkin が局在化することにより、ミトコンドリアの分解を促進することが明らかになっている^{38,40,41)}。つまり障害ミトコンドリアを Opa1 システムにより隔離し、またオートファジーにより分解することで、細胞内のミトコンドリアの品質を維持している可能性が考えられる。このようなミトコンドリアの品質管理は特に神経細胞内で重要な役割を果たすのではないかと考えられる。今後、神経細胞における Parkin の機能とパーキンソン病の病態との関連を解明し、またミトコンドリアの選択的分解機構の詳細などを解析することで、生体内におけるミトコンドリア品質管理機構とその制御の詳細を明らかにしていく必要があると考えている。

7. 哺乳類ミトコンドリアの分裂に関与する因子

種を超えて保存されたミトコンドリア分裂に関与する因子として、細胞質に存在するダイナミン様タンパク質 Drp1 (別名 Dlp1 などとも呼ばれる、酵母ホモログは Dnm1) が同定されている¹⁴⁾。ドミナントネガティブ体発現や RNAi

などで Drp1 の機能を抑制すると、分裂が抑制されミトコンドリアの長いネットワーク構造が形成される。Drp1 は当初、エンドサイトーシスに機能する GTPase であるダイナミンと構造上の相同性を持つ因子として同定された。しかし、その機能抑制では分泌及びエンドサイトーシス自体には大きな影響は見られないが^{14, 42, 43}、ミトコンドリアのみならずペルオキシソームの構造に影響を与えることが明らかになった⁴⁴。現時点では、Drp1 がどのようにミトコンドリア二重膜の分裂を促進するのか、その分子機構の詳細はよくわかっていない。

種を超えて保存されたもう一つの分裂関連因子として、ミトコンドリア外膜を貫通して存在する低分子タンパク質 Fis1 が知られている⁴⁵⁻⁴⁷ (図2)。酵母の遺伝学的スクリーニングから同定された Fis1 は、酵母では WD モチーフを持つアダプター因子 Mdv1 及び Caf4 を介して Dnm1 と結合し、Dnm1 の外膜上での複合体形成に機能していると考えられている^{48, 49}。しかし哺乳類にはこれら WD モチーフを持つ Drp1 アダプター因子は同定されていない。近年、植物では Elm1 が、また哺乳類では Mff が Drp1 のミトコンドリア局在化に機能することが明らかになっており、Drp1 のミトコンドリア局在は進化に伴って大きく変化していることが明らかになっている^{50, 51}。今後、Drp1 および Fis1 などミトコンドリア分裂因子群の機能の解析を進める

必要があると考えている。

8. 細胞分裂期のミトコンドリアの分配と分裂の制御機構

ミトコンドリアは細菌の共生を起源としており、分裂して増殖すると考えられてきたが、これまで細胞増殖時のミトコンドリア分裂の機能及び制御に関する解析は行われていなかった。そこで我々は細胞分裂時のミトコンドリアの娘細胞への分配における Drp1 の機能を解析した。HeLa 細胞を用いて細胞周期におけるミトコンドリアの形態を観察したところ、細胞分裂期にミトコンドリアが小さく断片化することに気が付いた。RNAi により Drp1 の発現抑制を行うと細胞分裂期にもミトコンドリアが長い構造を維持していることから、細胞分裂期には Drp1 に依存したミトコンドリアの分裂が活性化していることがわかった。この活性化機構を解析し、細胞分裂期には Drp1 の特定のセリン残基がリン酸化を受けること、そのリン酸化は Cdk1/サイクリン B 複合体によること、またこのセリン残基の改変により細胞分裂期のミトコンドリアの断片化が抑制されることを明らかにした。これらの結果は、細胞分裂期に Drp1 のリン酸化によりミトコンドリア分裂が活性化されることを示している⁵² (図6A)。

我々の報告の後に、Drp1 は CaMK, PKA など様々なキ

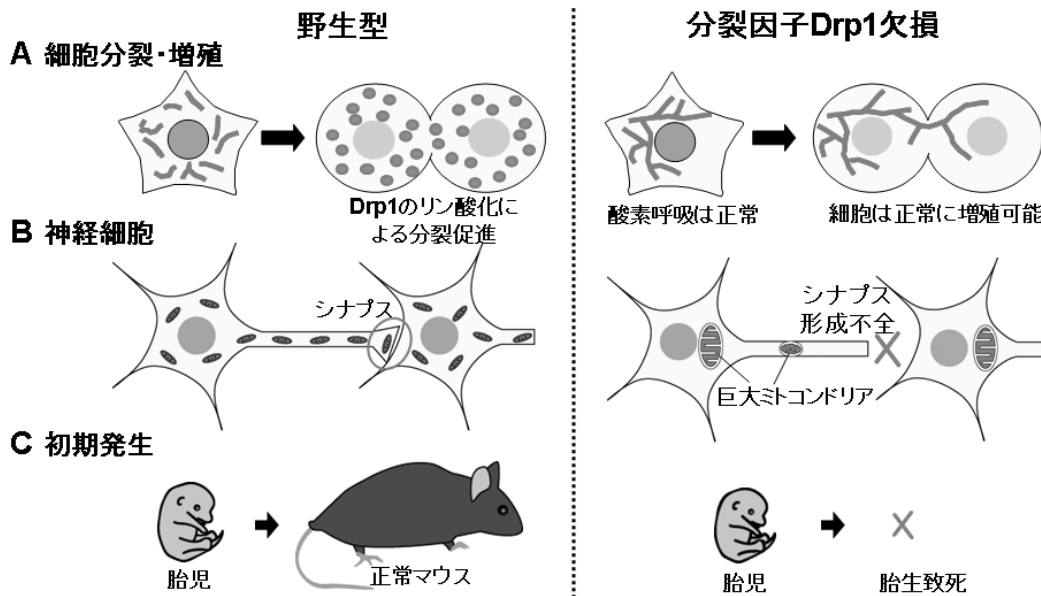


図6 哺乳類におけるミトコンドリア分裂の制御と生理機能のモデル

A (左図) 細胞分裂期には Drp1 がリン酸化されミトコンドリア分裂を促進することでミトコンドリアが分散する。(右図) Drp1 欠損 MEF ではミトコンドリアの形態変化に伴い娘細胞への均等分配が不全となるが、細胞分裂及びミトコンドリアの機能自体は正常のまま維持される。

B (左図) 神経細胞内ではミトコンドリアの分裂により正常なミトコンドリアの分布が維持される。(右図) Drp1 欠損神経細胞ではミトコンドリアが巨大化し、神経突起内でのミトコンドリア分布不全およびシナプス形成不全となる。

C Drp1 全身欠損マウスは胎生期に致死となるが、現時点ではその理由はまだ明らかになっていない。

ナーゼによるリン酸化のみならず、ユビキチン化、SUMO化、*N*-ニトロシル化などの翻訳後修飾を受け機能が制御されることが明らかになっている^{53~58}。これらの翻訳後修飾により、Drp1の合成・分解による発現量の変化、GTPaseの活性化やミトコンドリアへの局在化が制御され、その結果ミトコンドリア分裂が制御されるのではないかと考えられる。

細胞分裂期にはミトコンドリア分裂が促進され、断片化したミトコンドリアが細胞質中に分散して分布するため、細胞質分裂時に娘細胞へミトコンドリアが均等配分されるのではないかと考えられる。そこでDrp1の細胞分裂に及ぼす影響を解析する目的でRNAiによりDrp1の発現抑制を行ったが、予想に反して細胞周期の進行や細胞増殖への顕著な影響を観察することができなかった。そこで我々は、ミトコンドリア分裂はなぜ必要なのか、その生理的意義にさらに興味を持つようになった。

9. ミトコンドリアの融合と分裂の生理的機能

酵母において、ミトコンドリア融合因子群 Fzo1 および Mgm1 の欠損株では、ミトコンドリアの形態異常に引き続いて呼吸不全及びミトコンドリア DNA の欠失が引き起こされることから、ミトコンドリアの融合は細胞レベルでのミトコンドリアの機能維持に必須な役割を担っていることがわかっている^{10,59}。また前述のように、哺乳類においてもミトコンドリア融合因子 Opa1 および Mfn2 は神経変性疾患の原因となる^{18~20}。これらのことから、ミトコンドリアの融合異常はミトコンドリアの機能不全を引き起こし、その結果特に神経において重篤な障害を引き起こす可能性が考えられている。しかし現時点では融合不全により呼吸不全が誘導される機構はまだよくわかっていない。近年、融合不全によりミトコンドリア DNA の変異が蓄積するとの報告もあり、ミトコンドリアの機能維持における融合の役割についての理解が待たれている⁶⁰。

一方、これまで哺乳類個体におけるミトコンドリア分裂の生理機能はほとんど理解されていなかった。そこで我々は Drp1 遺伝子を欠損した細胞及びマウス系列を構築し、ミトコンドリア分裂の生理的機能解析を行った (図 6A)。まず、Drp1 遺伝子を欠損したマウス胎児線維芽細胞系列 (MEF) を構築しその解析を行った。Drp1 の欠損により極めて長い連結したミトコンドリアのネットワークが形成されているが、この細胞は野生型細胞とほぼ遜色ない速度で増殖することができた。また酸素呼吸活性及び細胞内 ATP 濃度もほぼ正常であった。これらの結果は RNAi による発現抑制実験の結果とよく合致していた。つまり Drp1 に依存したミトコンドリア分裂反応は細胞の生存及び増殖自体には必須ではないことが明らかになった (図 6A)⁶¹。

10. マウス個体内でのミトコンドリア分裂の生理的機能

次に Drp1 を全身で欠損させたマウスの解析を試みた。このマウスは胎生期 12.5 日ごろまでに致死となることから、個体レベルでは Drp1 によるミトコンドリアの分裂は必須であり、胎生期の発生に機能していることが明らかになった (図 6C)。このマウスの胎児ではミトコンドリアのシトクロムオキシダーゼの活性染色は観察されるため、ミトコンドリアの呼吸活性が消失しているのではないにも関わらず発生が停止していると考えられる。

さらに我々は、神経細胞におけるミトコンドリア分裂の機能解析を行った。神経特異的 Drp1 欠損マウスは出生直後に致死となった。このマウスから初代神経培養細胞系を構築し観察を行ったところ、細胞内に極めて巨大化したミトコンドリアが観察された。野生型の神経細胞では神経突起内に多くのミトコンドリアが分散して存在しているが、Drp1 欠損神経細胞ではまばらに分布している像が観察された。さらにこの神経細胞では野生型細胞と比較してシナプスの形成が強く抑制されていることも確認された (図 6B)。

これらの結果から、Drp1 の欠損により神経細胞内のミトコンドリアの分裂が阻害されると、ミトコンドリアの細胞内分布不全、特に神経突起内で分布異常となることにより神経変性が誘導されることが考えられる。このようにミトコンドリア分裂は細胞分化、特に極性細胞のミトコンドリアの細胞内配置に必須の機能を持つことが明らかになった⁶¹。

一方、現時点では Drp1 の全身欠損マウスが胎生致死となる主因はよくわかっていない。今後様々な組織においてミトコンドリアの形態と動態を観察し、また Drp1 の組織特異的欠損マウスを解析することで、個体におけるミトコンドリア分裂の生理機能について理解を進めていきたいと考えている。

11. ミトコンドリアの構造変化とアポトーシス制御

哺乳類細胞でのミトコンドリアの融合と分裂の生理機能は未だ多くは理解されていない。しかしミトコンドリア融合・分裂の分子機構について理解が進むに伴いアポトーシスへの関与について様々な報告がなされてきた。2001 年の培養細胞で Drp1 の機能を抑制するとアポトーシスの進行が遅延するとの報告は関連研究者に大きなインパクトを与えた⁶²。その後、融合因子群を抑制すると、アポトーシスの進行が促進されることも明らかになり、ミトコンドリアの融合・分裂におけるバランスの変化自体がアポトーシス制御に関与するのではないかと考えられるようになった^{63,64}。これらの因子によりシトクロム *c* のミトコンドリアからの放出が制御されるが、Drp1 や Mfn は Bcl-2 ファ

ミリータンパク質と協調して機能し外膜からのシトクロム *c* 放出を制御する可能性や^{65, 66)}, Opa1 は内膜の陥入したクリステの構造形成を促進することでシトクロム *c* を内部に保持する可能性^{35, 36)}などが議論されている。さらに Bax などアポトーシス誘導因子がミトコンドリア融合の制御に働くとの報告もされている⁶⁷⁾。ミトコンドリア形態制御因子とアポトーシス因子との関連にはまだ不明な点が多く残されている。

我々は, Drp1 欠損マウスを用いた解析から, Drp1 欠損 MEF ではアポトーシスの抑制が, Drp1 欠損神経細胞では細胞死の促進が起こる, との組織によって異なる結果を得た⁶¹⁾。神経細胞では Drp1 の機能不全によってミトコンドリアの細胞内での分布が異常となり, その結果アポトーシスが誘導されるのではないかと考えている (図 6)。

ミトコンドリアはエネルギー生産のみならずアポトーシスやカルシウム制御, さらに酸化ストレスなど, 多岐にわたる細胞機能の制御に関与すると考えられている。融合と分裂を伴う細胞内ミトコンドリア構造の動的な変化は, 機能分化した組織においてミトコンドリアの機能的多様性を支える基盤的な機構だと考えられる。近年の分子機構についての理解から様々な解析ツールが構築され, 細胞及び個体における生理的意義が理解される素地が整いつつある。今後これらの解析が進展することで, 生命の生と死を同時に司るミトコンドリアの動的な姿が分子レベルで詳細に理解されることが期待される。さらにこれらの解析から, 細菌を起源とするミトコンドリアを取り込み, また飼育慣らしてきた宿主細胞の巧妙な戦略を解明し, ミトコンドリアの多様な動的振る舞いを理解していきたいと考えている。

謝辞

本研究は九州大学分子生命科学, 三原勝芳博士の研究室で開始したものである。東京医科歯科大学細胞生理学の水島昇博士の研究室では極めて恵まれた環境でご指導と強力なサポートを頂きながら研究を進めさせていただいた。大学院生として大村恒雄博士, 三原先生の研究室で, ポスドクとして基礎生物学研究所の大隅良典博士の研究室にて多くの経験を得ることができたことも幸運なことだったと思っている。

本研究を進める上で一緒に努力してくださった樋口 (江浦) 由佳博士, 新 (田口) 奈緒子博士, 城福昭裕様, 藤田優様, 加藤大樹博士, また岡敏彦博士, 大寺秀典博士始め三原研究室の皆様, 松永結様始め水島研究室の皆様, また久留米大学分子生命科学研究所の尾上健太様, 石原 (前田) 真希様に感謝申し上げます。マウス研究を進める上で九州大学病態制御学の野村政壽博士, 神経病理学の鈴木論博士には特に多大なご協力を戴いており感謝申し上げます。この欄に書ききれない多くの共同研究者の方々に深く感謝致

します。

文 献

- 1) 林 純一ほか (2004) 二層膜オルガネラの遺伝学. 蛋白質核酸酵素増刊, 共立出版.
- 2) 内海耕謹ほか (2001) 新ミトコンドリア学, 共立出版.
- 3) Yaffe, M.P. (1999) *Science*, **283**, 1493-1497.
- 4) Shaw, J.M. & Nunnari, J. (2002) *Trends. Cell Biol.*, **12**, 178-184.
- 5) Okamoto, K. & Shaw, J.M. (2005) *Annu. Rev. Genet.*, **39**, 503-536.
- 6) Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W., & Walter, P. (1997) *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1233-1242.
- 7) Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y., & Mihara, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 891-898.
- 8) Sesaki, H. & Jensen, R. E. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 699-706.
- 9) Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., & Shaw, J.M. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 298-304.
- 10) Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., & Shaw, J.M. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 359-373.
- 11) Santel, A. & Fuller, M.T. (2001) *J. Cell Sci.*, **114**, 867-874.
- 12) Shepard, K.A. & Yaffe, M.P. (1999) *J. Cell Biol.*, **144**, 711-720.
- 13) Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., & van der Bliek, A.M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18792-18798.
- 14) Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N., & van der Bliek, A.M. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 351-358.
- 15) Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W., & Shaw, J.M. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 333-349.
- 16) Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., & Mihara, K. (2003) *J. Biochem.*, **134**, 333-344.
- 17) Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., & Chan, D.C. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 189-200.
- 18) Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S., & Wissinger, B. (2000) *Nat. Genet.*, **26**, 211-215.
- 19) Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquellerc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J., & Hamel, C.P. (2000) *Nat. Genet.*, **26**, 207-210.
- 20) Zuchner, S., Mersyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M., & Vance, J.M. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 449-451.
- 21) Hales, K.G. & Fuller, M.T. (1997) *Cell*, **90**, 121-129.
- 22) Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D.C., Smith, C. L., & Youle, R.J. (2004) *J. Cell Biol.*, **164**, 493-499.
- 23) Ishihara, N., Eura, Y., & Mihara, K. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 6535-6546.
- 24) Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., & Chan, D.C. (2004) *Science*, **305**, 858-862.
- 25) Chen, K.H., Guo, X., Ma, D., Guo, Y., Li, Q., Yang, D., Li, P., Qiu, X., Wen, S., Xiao, R.P., & Tang, J. (2004) *Nat. Cell*

- Biol.*, 6, 872–883.
- 26) de Brito, O.M. & Scorrano, L. (2008) *Nature*, 456, 605–610.
 - 27) Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., Kawabata, S., & Koshiba, T. (2009) *Sci. Signal.*, 2, ra47.
 - 28) Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., & Hamel, C.P. (2001) *Hum. Genet.*, 109, 584–591.
 - 29) Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., & Mihara, K. (2006) *EMBO J.*, 25, 2966–2977.
 - 30) McQuibban, G.A., Saurya, S., & Freeman, M. (2003) *Nature*, 423, 537–541.
 - 31) Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., & Reichert, A.S. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 27781–27788.
 - 32) Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S., & van der Bliek, A.M. (2009) *J. Cell Biol.*, 187, 959–966.
 - 33) Ehses, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J.C., Westermann, B., Rugarli, E.I., & Langer, T. (2009) *J. Cell Biol.*, 187, 1023–1036.
 - 34) Griparic, L., Kanazawa, T., & van der Bliek, A.M. (2007) *J. Cell Biol.*, 178, 757–764.
 - 35) Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L., & De Strooper, B. (2006) *Cell*, 126, 163–175.
 - 36) Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., & Scorrano, L. (2006) *Cell*, 126, 177–189.
 - 37) Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., & Chan, D.C. (2007) *J. Cell Biol.*, 178, 749–755.
 - 38) McBride, H.M. (2008) *J. Cell Biol.*, 183, 757–759.
 - 39) Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., & Shirihai, O.S. (2008) *EMBO J.*, 27, 433–446.
 - 40) Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., & Youle, R.J. (2008) *J. Cell Biol.*, 183, 795–803.
 - 41) Ishihara, N. & Mizushima, N. (2009) *Dev. Cell*, 17, 1–2.
 - 42) Shin, H.W., Shinotsuka, C., Torii, S., Murakami, K., & Nakayama, K. (1997) *J. Biochem.*, 122, 525–530.
 - 43) Pitts, K.R., Yoon, Y., Krueger, E.W., & McNiven, M.A. (1999) *Mol. Biol. Cell*, 10, 4403–4417.
 - 44) Li, X. & Gould, S.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 17012–17020.
 - 45) Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., & Shaw, J.M. (2000) *J. Cell Biol.*, 151, 367–380.
 - 46) Jofuku, A., Ishihara, N., & Mihara, K. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333, 650–659.
 - 47) Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., & McNiven, M.A. (2003) *Mol. Cell Biol.*, 23, 5409–5420.
 - 48) Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K., & Nunnari, J. (2002) *J. Cell Biol.*, 158, 445–452.
 - 49) Zhang, Y. & Chan, D.C. (2007) *PNAS*, 104, 18526–18530.
 - 50) Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., & Mihara, K. (2010) *J. Cell Biol.*, 191, 1141–1158.
 - 51) Arimura, S., Fujimoto, M., Doniwa, Y., Kadoya, N., Nakazono, M., Sakamoto, W., & Tsutsumi, N. (2008) *Plant Cell*, 20, 1555–1566.
 - 52) Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., & Mihara, K. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 11521–11529.
 - 53) Chang, C.R. & Blackstone, C. (2007) *EMBO Rep.*, 8, 1088–1089; author reply 1089–1090.
 - 54) Cribbs, J.T. & Strack, S. (2007) *EMBO Rep.*, 8, 939–944.
 - 55) Han, X.J., Lu, Y. F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H., & Matsushita, M. (2008) *J. Cell Biol.*, 182, 573–585.
 - 56) Jahani-Asl, A. & Slack, R.S. (2007) *EMBO Rep.*, 8, 912–913.
 - 57) Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., & Lipton, S.A. (2009) *Science*, 324, 102–105.
 - 58) Harder, Z., Zunino, R., & McBride, H. (2004) *Curr. Biol.*, 14, 340–345.
 - 59) Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., & Nunnari, J. (2000) *J. Cell Biol.*, 151, 341–352.
 - 60) Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., & Chan, D.C. (2010) *Cell*, 141, 280–289.
 - 61) 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.
 - 62) Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., & Youle, R.J. (2001) *Dev. Cell*, 1, 515–525.
 - 63) Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., & Youle, R.J. (2004) *Mol. Biol. Cell*, 15, 5001–5011.
 - 64) Sugioka, R., Shimizu, S., & Tsujimoto, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 52726–52734.
 - 65) Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.Y., & Youle, R.J. (2006) *Nature*, 443, 658–662.
 - 66) Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D. J., Bossy-Wetzel, E., Basanez, G., Meda, P., & Martinou, J.C. (2010) *Cell*, 142, 889–901.
 - 67) Hoppins, S., Edlich, F., Cleland, M.M., Banerjee, S., McCaffery, J.M., Youle, R.J., & Nunnari, J. (2011) *Mol. Cell*, 41, 150–160.