

# Mitophagy マウス樹立と疾患研究への応用

新潟大学大学院医歯学総合研究科・機能制御学分野

神吉 智丈

## 1. はじめに

ミトコンドリアオートファジー（略してマイトファジー）は、オートファジーによるミトコンドリア分解機構であり、細胞内の余剰なミトコンドリアや機能低下に陥ったミトコンドリアを分解することで、細胞内のミトコンドリア品質管理を行っていると考えられている。ミトコンドリア機能の破綻は、神経変性疾患や老化現象に結びつくため、マイトファジーの理解は医学的にも重要である。最近の研究から、家族性パーキンソン病の原因因子であるParkinとPINK1がマイトファジーの誘導に関わっていること（Narendra et al. *J Cell Biol.* 2008など）や、網赤血球から赤血球となる過程に必要なミトコンドリア分解をマイトファジーが担っていること（Schweers et al. *PNAS* 2007など）が明らかとなり、マイトファジーは国内外で活発に研究されるようになってきた。この結果、培養細胞における研究成果が大部分を占めるものの、マイトファジーの理解が徐々に進んでいる。この様に広く研究が進められるようになってきたマイトファジーであるが、動物の臓器レベルでマイトファジーを具体的に観察した報告は非常に少ない。マイトファジーと病態との関連を知るためには、動物の臓器レベルでマイトファジーを効率よく観察する実験系の確立が重要である。

本研究では、動物の各臓器においてマイトファジーを観察するために蛍光タンパク質を発現したトランスジェニックマウスを作製し、このマウスを用いて各臓器で起こっているマイトファジーを観察する手技を確立することを目的とした。さらに、確立した手法を用いて、種々のストレスや病態モデルがマイトファジー誘導に与える影響を観察することで、マイトファジーと病態との関わりを解明を目指した。

## 2. 方法

マイトファジーが起こると、細胞内のミトコンドリアのごく一部がリソソームに運ばれ分解される。分解対象となったミトコンドリアは分解・消失するため、マイトファジーが起こったことを分解が完了した後に検出するのは従来の手法では困難である。RFPやmCherryなどの蛍光タンパク質は、GFPなどの他の蛍光タンパク質異質に比べてよりタイトな $\beta$ -barrel構造を取っており、リソソーム内でも比較的長期間安定して存在できることが知られている。ミトコンドリア移行シグナルを付けたタンデム蛍光タンパク質mCherry-EGFP (MTS-mCherry-EGFP)を細胞に発現させると、MTS-mCherry-EGFPはミトコンドリアに局在

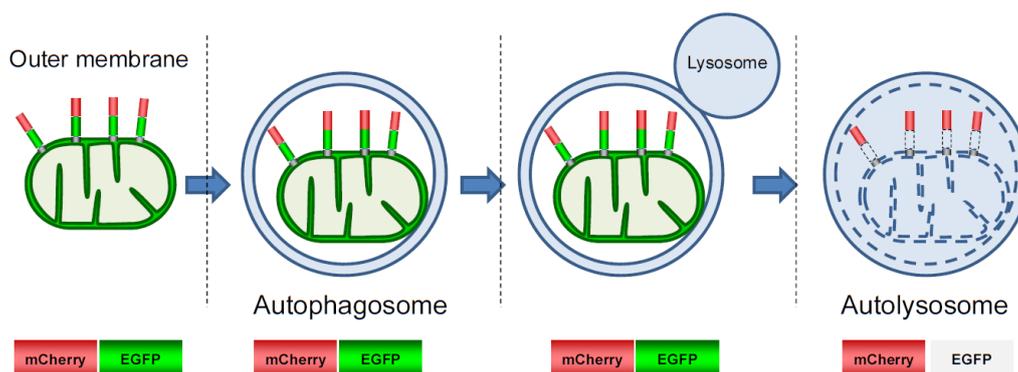


図1：MTS-mCherry-EGFPを用いたマイトファジー検出法の原理

する。マイトファジーが誘導されるとミトコンドリア内のMTS-mCherry-EGFPはリソソームに運ばれるが、EGFPが早期に分解されるのに対してmCherryは分解が遅れるため、リソソームがmCherryの蛍光で標識されることになる（図1）。

HeLa細胞にMTS-mCherry-EGFPを発現させ予備実験を行ったところ、マイトファジー誘導時にmCherryのみで標識されるリソソーム様（点状）像が明瞭に検出できることから、マイトファジー誘導の検出法として有効であることが分かった（図2, Yamashita et al. *J Cell Biol.* 2016）。この手法が動物個体でも利用出来るかどうかを確かめるために、MTS-mCherry-EGFP発現トランスジェニックマウスを作製し（Mitophagyマウス）、通常飼育環境時及び24時間絶食後のマウスの各臓器凍結切片標本でマイトファジーが観察できるかどうかを検討した。

### 3. 結果

Mitophagyマウスの心筋、骨格筋、脳、腎臓、肝臓、脂肪組織の組織切片でマイトファジーの観察を試みたところ、腎臓、肝臓では非特異的な蛍光が多く明瞭な結果が得られなかったが、心筋、骨格筋、脳神経細胞、脂肪細胞では、通常飼育環境であってもリソソーム様（点状）のmCherry像が認められ、マイトファジーが恒常的に誘導されていることが示唆された。さらに心筋、骨格筋では飢餓（24時間絶食）に応答して、点状mCherry像の増加が認められた（心筋の例を図3に示す）。脳神経細胞では、こうした飢餓に応答したマイトファジーの増加は認められなかった。

### 4. 考察

上記のようにMitophagyマウスを用いることで、少なくとも心筋、骨格筋、脳神経、脂肪組織ではマイトファジーを観察する事が可能となった。現在、新たなトランスジェニックマウスの作製及び蛍光観察法の改良により、より多くの臓器でマイトファジーが観察出来る方法を開発中である。今回の観察結果

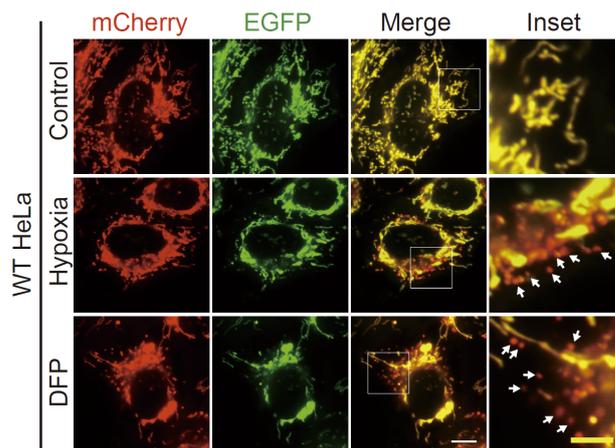


図2：HeLa細胞におけるマイトファジー観察  
HeLa細胞にMTS-mCherry-EGFPを発現させ、低酸素環境や鉄キレート剤（DFP）処理によりマイトファジーを誘導した。ミトコンドリアは、mCherryとEGFPの両方で標識されているが、マイトファジー誘導に応答してmCherryのみで可視化される点状像（矢印）が検出されるようになる。

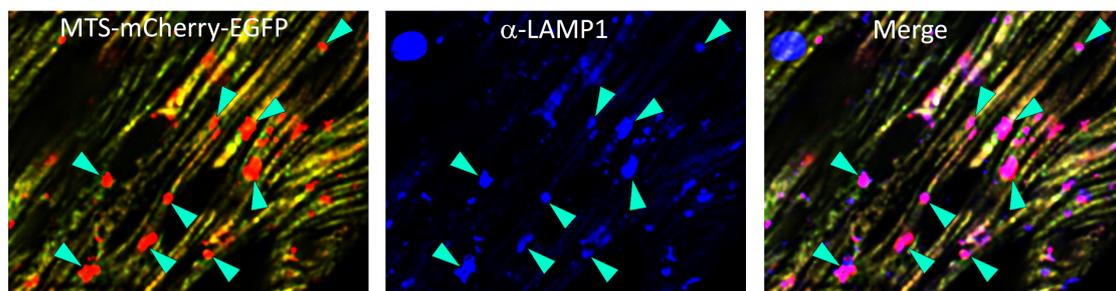


図3：Mitophagyマウス心筋におけるマイトファジー観察  
Mitophagyマウスを24時間絶食後、灌流固定した心筋の凍結切片におけるmCherry（赤）とEGFP（緑）を蛍光顕微鏡で観察した。mCherryのみで可視化される点状像は全てリソソームに局在するLAMP1（青）と共局在することから、これらはミトコンドリアを取り込んだAutolysosomeと考えられる。

から、動物個体では培養細胞とは異なり、特別な誘導刺激が無い環境でもマイトファジーが恒常的に誘導されており、ミトコンドリアの新陳代謝に関わっている可能性が示唆された。このようなミトコンドリアの恒常的な分解は、細胞内の不良ミトコンドリア蓄積を防止し、ミトコンドリア恒常性維持に貢献していると考えられる。こうしたマイトファジーの生理的意義を解明するために、種々の疾患モデルに本実験系を適用してマイトファジーを観察することで、疾患病態とマイトファジーの関わりを明らかにす

ることを目指して研究を進めている。特に、神経変性疾患や心筋虚血、脳虚血では、ミトコンドリア機能低下が病態の増悪に大きく関与している事が知られているため、これらの疾患におけるマイトファジーの意義を解明していきたいと考えている。

## 5. 発表論文、参考文献

### 発表論文

Yamashita SI, Jin X, Furukawa K, Hamasaki M, Nezu A, Otera H, Saigusa T, Yoshimori T, Sakai Y, Mihara K, Kanki T. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol.* 2016;215(5):649-665.

### 参考文献

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 2008;183(5):795-803.

Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, Kundu M, Opferman JT, Cleveland JL, Miller JL, Ney PA. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19500-5.