

# 神経細胞での小胞体-ミトコンドリア情報交換機構の解明

高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門

難波 卓司

## 1. はじめに

ミトコンドリアは細胞の生存に必須な ATP の大部分を産生し、一方で活性酸素を産生するなど細胞死も誘導する細胞小器官である。近年、癌や神経疾患など様々な病気でミトコンドリアの量的、質的变化が起こっていることが明らかになってきた。特にニューロパチーなどの末梢神経疾患やパーキンソン病、アルツハイマー病などの神経変性疾患においては、遺伝的または後天的なミトコンドリアの機能低下が確認され、ミトコンドリアの機能を回復することがそれらの疾患の新たな治療法になると考えられている。そのためミトコンドリアの恒常性維持機構の解明が急速に行われている。最近、小胞体とミトコンドリアが直接接触し、お互いに情報伝達を行うことがミトコンドリアの恒常性維持に必須であることが新たに発見された。これまでに小胞体とミトコンドリアに局在する膜タンパク質 Mitofusin-2 はミトコンドリアと小胞体の接触を助けることで、小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオンの流入を促進し、ミトコンドリアのカルシウムイオン濃度の維持に重要な役割を果たしていることや(Mitofusin-2 の遺伝子変異は遺伝型ニューロパチーの原因)、小胞体膜タンパク質 Nogo-B の欠損により小胞体とミトコンドリアの接触が阻害され、ミトコンドリアの活性が低下することが報告されている(de Brito OM et al., *Nature*. 2008)。私はこれまでに小胞体膜タンパク質である BAP31 の働きにより、小胞体とミトコンドリアのタンパク質が相互作用することでアポトーシスのシグナルを小胞体からミトコンドリアへ伝達することを発見した(Namba T et al., *Cell reports*. 2013)。一方でヒトにおいて BAP31 の遺伝的な機能喪失によって重度の神経障害が起こること(Cacciagli P et al., *Am J Human Genetics*. 2013)が示唆されること。また、神経細胞で過剰なオートファジーが誘導されていることも神経障害の発症の原因となっていることが最近明らかになってきた。一方、生物種を超えて保存されているタンパク質相互作用のデータベースである、Metazoan complexes ([http://metazoa.med.utoronto.ca/php/gene\\_details.php?gene=BCAP31&sp=hs](http://metazoa.med.utoronto.ca/php/gene_details.php?gene=BCAP31&sp=hs))を用いた解析から、BAP31 はミトコンドリアに局在するタンパク質 (NADH 脱水素酵素、VDAC1 や COXIV など)と相互作用していることが示唆されている。そこで、BAP31 の機能を解析することで新たな BAP31 の働き、及び小胞体とミトコンドリアの情報交換機構の解明を行う。

## 2. 方法と結果

これまでの報告により神経障害の原因の一つに神経細胞におけるオートファジーの誘導が報告されている。そこで、BAP31 の発現抑制によりオートファジーされるか検討を行った。これまでに我々は BAP31 の発現抑制により小胞体ストレスによる細胞死が顕著に抑制されることを報告しているが、BAP31 がオートファジーの誘導に関与しているかどうかは全く分かっていない。そこで BAP31 の発現を shBAP31 で抑制したところ、LC3II の発現が増加し、オートファジーが誘導されていることが示唆された。以上の結果から BAP31 は小胞体ストレスによる細胞死に関与するだけでなく、オートファジーの誘導にも関与することが示唆された。

次に BAP31 によるオートファジーの制御機構について検討を行った。BAP31 は小胞体膜タンパク質であることから、小胞体近傍で起こるオートファジーの誘導経路に関与している可能性を考えた。これまでにオートファゴソームの形成に重要な Atg14 複合体(Atg14、Becline1 や Syntaxin17(Stx17)など)の形成と活性化が小胞体膜上で起こることが報告されているので、これらのタンパク質とオートファジーの誘導に関与している Atg7 及び Atg12 と BAP31 が相互作用しているかを免疫沈降法で検討した。細胞ライセートを BAP31 の抗体で免疫沈降したところ、BAP31 と Stx17 の結合が確認された (図 1a)。また、Atg14 とも弱いながら結合していることが考えられた (図 1a)。次に BAP31 と Stx17 の結合を Duo-link 法を用いた免疫蛍光染色法で確認した。この手法により実際の細胞内で BAP31 と STX17 が結合しているかを調べることができる。Duo-link 法は目的のタンパク質の距離が近い時のみそれぞれのタンパク質の一次抗体に反応して蛍光を発する。まず、BAP31 と Stx17 の細胞内局在を調べた。Stx17(緑色)と BAP31 (赤色) は BFA 処理及び通常状態で共局在することが確認された(黄色)。同じ実験条件下で Duo-link 法を行ったところ緑色の蛍光が観察された(図 1b)。この結果により endogenous な条件においても BAP31 と Stx17 は結合していること、小胞体ストレスによっても BAP31 と Stx17 の結合はほとんど変化しないことが考えられる。以上のことから BAP31 は Stx17 と結合することでオートファジーの誘導を制御している可能性が示唆された。今後は、BAP31 が Stx17 と結合することで Atg14 複合体の形成にどのような影響を与えるかを検討していき、BAP31 によるオートファジーの制御機構の全容を明らかにしていく。

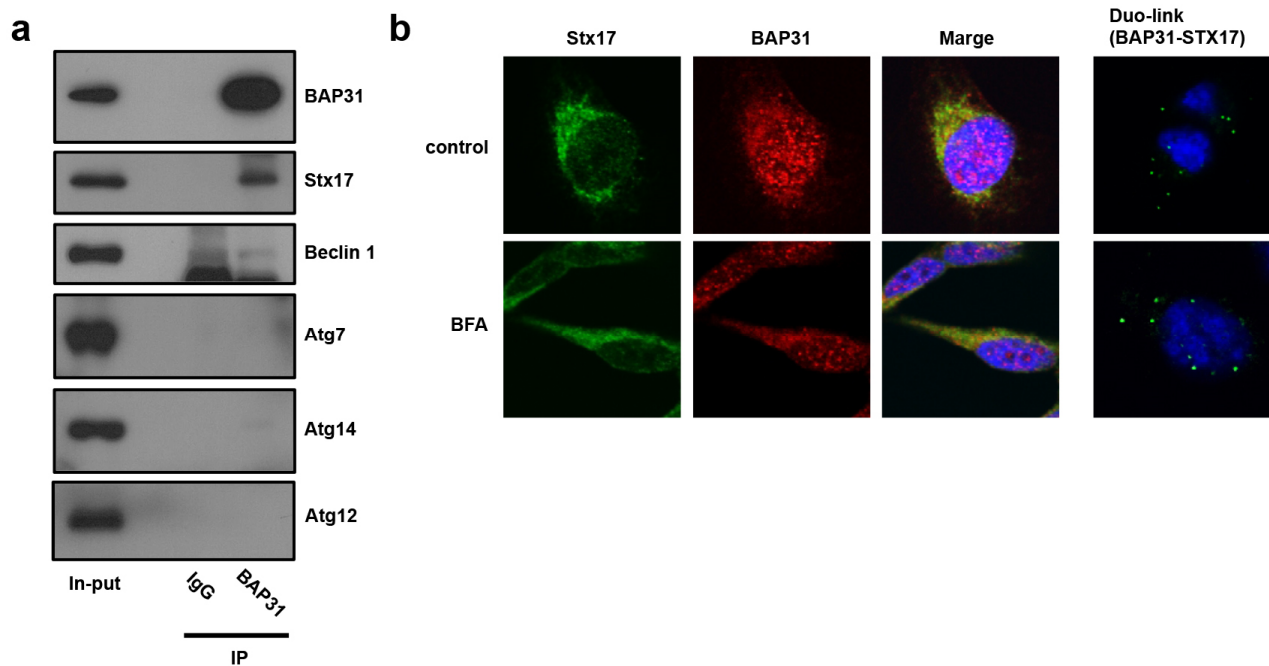


図 1. BAP31-Stx17 複合体の形成

(a) 免疫沈降法による BAP31 と相互作用するタンパク質の発見 (b) BFA 処理時と非処理時の BAP31(赤色)と Stx17(緑色)の細胞内局在。(DAPI(核)：青色)。Duo-link 法により BAP31-Stx17 複合体の形成を確認。緑色の点が BAP31-Stx17 複合体を示している。

さらに BAP31 がミトコンドリアの機能に与える影響を調べた。まず、siRNA により BAP31 を抑制して変化する細胞内シグナルを探索した。その結果、細胞内のエネルギー減少を感じし活性化する AMPK 経路が活性化することを見出した(未発表データ)。そこで、BAP31 の発現抑制によりミトコンドリアの呼吸活性が低下しているのかを培地中の酸素濃度のより蛍光を発する mito-Xpress を用いて検討したところ、BAP31 の発現を抑制することで、ミトコンドリアの酸素消費が減少していた。さらに BAP31 が生理学的条件下において呼吸鎖の電子伝達系に関連する Complex I の構成因子である NADH 脱水素酵素と相互作用し、その活性維持に重要であることも見出している(未発表データ)。これらは小胞体膜タンパク質である BAP31 がミト

コンドリアの機能を制御していることを示唆する興味深い結果である。また神経培養細胞では BAP31 の恒常的な発現抑制により細胞は徐々に細胞死を起し、その細胞数を減らしていくことも見出している(未発表データ)。

### 3. 考察

本研究結果より小胞体膜タンパク質BAP31はこれまでに知られている小胞体における機能以外にもオートファジーの誘導やミトコンドリアの酸素消費の制御を行っていることが示唆された。小胞体は細胞中に編み目のように張り巡らされているため様々な細胞小器官と物理的に接触しているがその役割はほとんど分かっていなかったが、本研究結果から小胞体のタンパク質BAP31がミトコンドリアの呼吸鎖の機能を制御することが示唆された。一方で呼吸鎖を構成するタンパク質複合体は小胞体とミトコンドリアの接触領域(MAM)にも局在していることが報告されている。このことからBAP31もMAMに局在し、この領域における小胞体タンパク質複合体がミトコンドリアの機能を制御している可能性が考えられる。今後の課題として、BAP31によりMAMの構造やそれを構成するタンパク質の機能にどのように影響を与えるかを検討することで新たな小胞体とミトコンドリアの情報交換機構が解明されることが期待される。一方、現在BAP31ノックアウトマウスの作成を行っており、このマウスにおいて神経障害の症状がみられるかを検討することで生体におけるBAP31の機能を明らかにすることが期待される。以上のような検討を行うことで、包括的なBAP31の機能解明とBAP31に関連する因子が神経障害の治療ターゲットの候補になるかが明らかになると考えている。

### 4. 発表論文、参考文献

Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. de Brito OM, Scorrano L. Nature. 2008 (7222):605-10.

CDIP1-BAP31 complex transduces apoptotic signals from endoplasmic reticulum to mitochondria under endoplasmic reticulum stress. **Namba, T.** Tian, F. Chu, K. Hwang, S. Y. Yoon, K. W. Byun, S. Hiraki, M. Mandinova, A. Lee, S. W. Cell reports. 2013 (2):331-9

Mutations in BCAP31 cause a severe X-linked phenotype with deafness, dystonia, and central hypomyelination and disorganize the Golgi apparatus. Cacciagli, P. Sutera-Sardo, J. Borges-Correia, A. Roux, J. C. Dorboz, I. Desvignes, J. P. Badens, C. Delepine, M. Lathrop, M. Cau, P. Levy, N. Girard, N. Sarda, P. Boespflug-Tanguy, O. Villard, L. Am J Hum Genet. 2013 (93) 579-86