

## 研究の分類・属性

基礎系

## 研究の概要

不良なミトコンドリアの蓄積は、ミトコンドリアの機能不全を引き起こし、老化、がん、様々な脳神経領域をはじめとした変性疾患の原因となり得る。また、がん領域における Warburg effect の原因の一端は不良なミトコンドリアの蓄積である可能性がある。しかしながら、不良なミトコンドリアの蓄積を予防するミトコンドリア品質管理 (Mitochondrial quality control: 以下 MQC) 機構がどのようなメカニズムで行われているかは、現在のところ不明のままである。我々は従来から、p53 標的遺伝子の同定とその機能解析研究を行ってきた経緯から、p53 誘導性タンパク質として Mieap を同定し、Mieap が全く新しいメカニズムによってミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たしている事実を発見した。この研究課題は、我々の発見した Mieap タンパク質によって制御される全く新しい MQC 機構のメカニズムの解析やヒトがん組織における異常の有無とその破綻の意義、個体における役割を明らかとすることを目的に行う。それによって、永らく不明であった動物細胞における MQC 機構を明らかとし、その異常と個体における変化やがん発生浸潤転移との関係を解き明かし、異常ミトコンドリアを標的としたミトコンドリア品質維持による新しいがん治療・がん診断・予防戦略の基盤を作り出し、これらの成果をもって人類の健康福祉に貢献するものである。

## 研究経費

5,000 千円

## 研究班の組織

荒川博文

腫瘍生物学分野長

研究全体の遂行と総括

## 研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

① Mieap による MQC 機構のメカニズムの解明 :

新規 MQC 機構のメカニズムの解明のために、Mieap 結合タンパク質を同定し、その役割を明らかとする。

② Mieap による MQC 機構の臨床がんにおける意義 :

がんにおける役割の解明のために、ヒトがん組織における Mieap による MQC 機構の異常の有無を明らかとする。

③ Mieap による MQC 機構の個体レベルでの解析 :

個体における Mieap による MQC 機構の役割を明らかとするために、Mieap ノックアウトマウスの作成と、解析にあたっての十分な数のマウスの繁殖、及び発がん実験やがん進展実験を行う。

## 第1年次

(年次評価時点の実績要点)

### ① MieapによるMQC機構のメカニズムの解明:

Mieap結合タンパク質としてミトコンドリア外膜タンパク質であるNIXとBNIP3を同定し、MieapによるMQC機構において、リソソームタンパク質のミトコンドリア内への集積に、必須の因子であることを証明した。

### ② MieapによるMQC機構の臨床がんにおける意義:

大腸がん57症例におけるMieap及びNIX, BNIP3, p53の異常を調べたところ、約80%の症例において、いずれかの遺伝子の異常を認めた。

### ③ MieapによるMQC機構の個体レベルでの解析:

Mieapノックアウトマウスの作成に成功した。マウスの繁殖を繰り返し、Mieapヘテロマウスの交配によって、未だ少数ではあるが、完全にMieapを欠失したホモマウスを取得した。

## 研究成果と考察

我々はこれまでの解析から、不良なミトコンドリアより生成される活性酸素種(ROS)に反応して、(1)ミトコンドリア内へリソソームタンパク質を集積させ(MALM: Mieap-induced Accumulation of Lysosome-like organella within Mitochondria)、ミトコンドリアの酸化蛋白質を特異的に分解し、不良なミトコンドリアを修復するか、あるいは(2)Mieapが液胞形成を誘導し(MIV: Mieap-Induced Vacuole)、不良なミトコンドリアを液胞内へ丸ごと飲み込み分解し排除するという二つの機能を制御することでMQCに重要な役割を果たす事実を確認した。この機能は、Mieapを介してp53によって制御されていた。

これまでの実験結果から、(1)様々なヒトがん細胞において、Mieapのプロモーターは高頻度にメチル化されており、Mieapの発現が消失すること、(2)p53あるいはMieapが不活性化されたがん細胞では、MieapによるMQC機能が完全に失われ、ATP合成活性の低下とROSの産生が増加した不良なミトコンドリアが蓄積すること、(3)低酸素ストレスによって、p53及びMieapの機能が保持されたあらゆる細胞においてMALMが誘導されること、(4)低酸素状態においては、p53あるいはMieapの不活性化によって蓄積した不良なミトコンドリアから、高いレベルのROSが産生され、細胞増殖の促進と細胞死抑制活性の上昇することが観察された。

以上の結果から、これまで全く知られることのなかったMieapによる新しいMQC機構は、がん微小環境において生じる低酸素状態においては、通常p53-Mieap経路によるMQC機構により、健全なミトコンドリアを維持することにより、がん抑制機能を発揮している可能性がある。言い換えれば、ヒトがんにおいてp53の変異や、Mieapのメチル化による不活性化で、このMQC機構が破綻することは、がん細胞に不良なミトコンドリアの蓄積を生じ、そこから産生されるROSによるゲノムDNAへの傷害や酸化ストレスシグナルによる細胞増殖亢進、細胞死抑制などのがんの発生・浸潤・転移に有利な状況を作っている可能性がある。

今回の研究課題は、このような経緯から発案され、(1)MieapによるMQC機構のメカニズムの解明、(2)MieapによるMQC機構の臨床がんにおける意義、(3)MieapによるMQC機構について個体レベルでの解析、の3つのテーマについて研究を行い、永らく不明であった動物細胞におけるMQC機構を明らかとし、その異常と個体における変化やがん発生浸潤転移との関係を解き明かし、異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん治療・がん診断・予防戦略の基盤を作り出すことを目的として行われている。以下これまでの成果と、その意義について考察する。

### 【第1年次評価時点】

#### ① MieapによるMQC機構のメカニズムの解明:

創薬臨床研究分野の尾野らとの共同研究によって開発した、免疫沈降物に対する網羅的プロテオーム解析(IP-2DICAL)を用いて解析した。MieapによるMQC機構が活性化した細胞において、ミトコンドリア分画から細胞抽出液を精製して、抗Mieap抗体による免疫沈降を行い、IP-2DICAL法によって網羅的な結合タンパク質の解析を行ったところ、20分子程度の候補Mieap結合タンパク質を同定した。その中から、まずミトコンドリア外膜タンパク質であるBNIP3とNIXを選び出し、Mieapとの物理的及び機能的相互作用の有無について確認したところ、これら分子はMieapによるMALM誘導に

必須の因子であることを見いだした。

BNIP3 及び NIX は、元々 Bcl2 結合タンパク質として発見され、BH3 ドメインを有する Bcl2 ファミリータンパク質である。Bcl2 ファミリータンパク質の中でも、Puma や Noxa のような BH3-only タンパク質に属する。一般的に BH3-only タンパク質は、BH3 ドメインを機能ドメインとして、ミトコンドリアからのシトクローム c の放出を促進することによるアポトーシス誘導に重要な働きを有する事が知られている。しかし、BNIP3 と NIX は、それらの機能とは異なり、従来から (1) ネクローシス様の細胞死が誘導されること、(2) 細胞死誘導には膜貫通ドメインが重要であること、(3) ミトコンドリアの二重膜を貫通する Permeability transition pore (PTP) を開口することで、プロトンの流入を促進して、膜電位の消失を誘導することで細胞死を誘導すること、(4) 細胞死の誘導能は、他 BH3-only タンパク質よりかなり弱い、などの特徴が知られていた。これらの特徴は、BNIP3 及び NIX が、ミトコンドリアに穴を開けると言う機能と、細胞死とは別の機能を有する可能性を示唆すると思われる。

今回の、我々の研究から、調べた 3 種のがん細胞株において、BNIP3 及び NIX の過剰発現によって、いずれも細胞死は誘導されなかった。また、単独の過剰発現においては、PTP の開口に伴うミトコンドリア膜電位の低下も観察されず、これまでの報告に大きく矛盾する結果を得た。一方で、Mieap, BNIP3, NIX の 3 つのタンパク質を同時に過剰発現したときのみにおいて、顕著なミトコンドリア膜電位の低下を観察した。しかし、その場合においても、細胞死は全く誘導されなかった。興味深い点は、このミトコンドリア膜電位の低下は、PTP 阻害剤で抑制されなかった。このことは、Mieap, BNIP3, NIX の 3 者のミトコンドリア外膜における結合は、PTP とは異なる、これまでに知られていない Pore (孔) を、ミトコンドリア二重膜に開口させる可能性があり、我々は Mieap による MQC 機構に重要な働きをする MAM におけるミトコンドリア内へのリソソームタンパク質の集積のメカニズムの一端を明らかにすることが出来たのではないかと考えている。

## ② Mieap による MQC 機構の臨床がんにおける意義：

Mieap は、ヒトがん細胞株においては、様々ながん種で、プロモーターのメチル化によって、その発現が完全に消失している。このようながんにおける Mieap 及びその関連分子の不活性化が、臨床がん組織において、実際にどの程度の頻度で発生しているのかを明らかとするために、今年度は大腸がん 57 症例について、Mieap 及び Mieap 結合タンパク質で MAM に必須の因子として同定した BNIP3 と NIX のプロモーターメチル化の有無、さらには、Mieap の転写活性化によって Mieap による MQC 機構を制御する p53 の点変異の有無を調べた。結果として、人の大腸がん組織においては、少なくとも約 80% の症例において Mieap による MQC 機構が不活性化されている可能性が示唆された。

## ③ Mieap による MQC 機構に関する個体レベルでの解析：

当初は、発生過程での胎生致死も予想され、マウスはコンディショナルノックアウト可能な状態で作成したが、結果的に現在のところ、Mieap ヘテロ欠失マウスの交配によって、Mieap ホモ欠失マウスの取得が可能であることが確認できた。

## 倫理面への配慮

臨床がん組織の解析については、国立がん研究センター倫理審査委員会へ実験計画を申請し、研究の倫理的、科学的妥当性について審査を受け、審査委員会の承認を受ける。また、実験動物を使用した実験についても、国立がんセンター動物実験倫理委員会による実験の倫理的、科学的妥当性について審査を受け、委員会の承認を受ける。共同研究における臨床がん組織の解析については、共同研究先の施設における倫理審査委員会の承認を受けた研究計画へ共同研究者として参加し、国立がん研究センター倫理審査委員会において共同研究の承認を受けることを前提として進める。

## 本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

### 【2011 年度】

\*1. Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Futamura M, Miyamoto T, Yoshida M, Ono M, Ichinose S, Arakawa H. Possible existence of lysosome-like organella within mitochondria and its role in mitochondrial quality control. *PLoS ONE*. 6: e16054 (2011).

\*Evaluated by Rial E: 2011. F1000.com/8253956 (Faculty of 1000: Must Read, Rating 8)

2. Kitamura N, Nakamura Y, Miyamoto Y, Miyamoto T, Kabu K, Yoshida M, Futamura M, Ichinose S, Arakawa H. Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. *PLoS ONE* 6: e16060 (2011).

3. Nakamura Y, Kitamura N, Shinogi D, Yoshida M, Goda O, Murai R, Kamino H, Arakawa H. BNIP3 and NIX mediate Mieap-induced accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. *PLoS ONE* 7: e30767 (2012).

(学会発表)

【2011年度】

1. 荒川博文、シンポジウム・疾患に関与するミトコンドリア研究の新展開

演題「修復と排除：p53誘導性タンパク質Mieapによる新規ミトコンドリア品質管理機構」

平成23年9月24日、第84回日本生化学会大会（京都）

2. 荒川博文、2011JCA-Mauvernay Award受賞講演

演題「がんのアキレス腱を知る～p53標的遺伝子研究からのアプローチ」

平成23年10月4日、第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

3. 吉田将紀、喜多村憲章、中村康之、宮本嵩史、加美野宏樹、村井竜也、尾野雅哉、荒川博文

口演発表、演題「リソソーム様オルガネラがミトコンドリア内に存在する可能性とミトコンドリア品質管理におけるその役割について」、平成23年10月4日、第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

4. 中村康之、喜多村憲章、宮本嵩史、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文

ポスター発表、演題「修復と排除：p53誘導性タンパク質Mieapによる新規ミトコンドリア品質管理機構」

平成23年10月3日、第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

5. 中村康之、喜多村憲章、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文

口演発表、演題「Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria」、平成23年12月14日、第34回日本分子生物学会年会（横浜市）

6. 喜多村憲章、中村康之、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文

口演発表、演題「Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control」、平成23年12月15日、第34回日本分子生物学会年会（横浜市）

7. 吉田将紀、中村康之、喜多村憲章、村井竜也、加美野宏樹、荒川博文

口演発表、演題「BNIP3 and NIX mediate Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria」、平成23年12月15日、第34回日本分子生物学会年会（横浜市）