

ミトコンドリアの機能維持と疾患

康, 東天
香椎丘リハビリテーション病院

<https://doi.org/10.15017/5208863>

出版情報：福岡醫學雑誌. 113 (2), pp.25-37, 2022-06-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：

総 説

ミトコンドリアの機能維持と疾患

香椎丘リハビリテーション病院 九州大学名誉教授

康 東 天

はじめに

赤血球を除くほとんどすべての細胞は90%前後のATP産生をミトコンドリアにおける酸化的リン酸化による好氣的ATP合成に依存している。ミトコンドリアは進化論的には独立した細菌が共生進化の結果細胞内小器官となったもので、現在でも核とは独立したゲノムを保持している。ヒトのミトコンドリアゲノム(mtDNA)は電子伝達系の13個のサブユニット、22種のtRNAと2つのrRNAをコードする約16kbpの環状DNAで(図1)、細胞あたり数十から数千コピー存在する。コピー数は組織によって異なり、おおよそ細胞のエネルギー需要に相関している。mtDNAの全ての遺伝子は電子伝達系の正常な構築に必須であり、mtDNA異常は細胞の生存と機能に重大な支障を来す。実際これまで、300を超えるmtDNA変異に起因する、先天的ないわゆるミトコンドリア脳筋症が報告されている(WebHome < MITOMAP < Foswiki 参照)。

ミトコンドリア電子伝達系は細胞内酸素消費の90%以上を占め、その1~5%は生理的に活性酸素に転換していると考えられている。このようにミトコンドリアは細胞内最大の生理的活性酸素の産生源で、そのただなかにあるmtDNAは強い酸化損傷をうけていると考えられている。そのため、最近では先天的な特

ヒトミトコンドリアDNA (mtDNA)

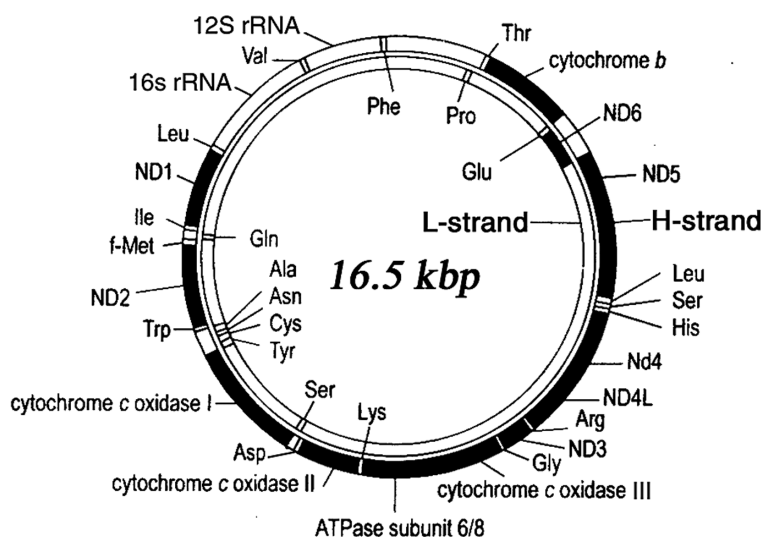


図1 ヒトミトコンドリアDNA (mtDNA) の構造

殊な脳筋症疾患群だけでなく、一般的な疾患の発症と進行においても加齢に伴う mtDNA の障害との関連が認識されてきている¹⁾。

ミトコンドリアは酸化リン酸化だけでなく、糖質、脂質、アミノ酸など生体代謝経路のハブとしての役割を果たしている。がん細胞や免疫細胞含む多くの細胞で分化、増殖、細胞死そして機能的変換におけるミトコンドリアの役割が注目を集めている。

本総説では、九州大学での著者と共同研究者によるミトコンドリア研究の成果を取り上げて解説したい。

1. ミトコンドリア機能維持・品質管理

前述のように、mtDNA を含むミトコンドリアの機能の維持は様々な細胞の様々な細胞機能維持にきわめて重要である。

1) mtDNA 修復

ミトコンドリアゲノムは強い活性酸素障害を受けていることが予想されている。実際、代表的活性酸素修飾塩基である酸化型グアニン塩基 8-オキソグアニン(8-oxoG)が、ミトコンドリア DNA では核に比べ十数倍多いと報告されている²⁾。これに加え、ミトコンドリアは脂溶性陽イオンを蓄積しやすい性質から、細胞がアルキル化剤等の抗がん剤にさらされた際にも、ミトコンドリア DNA は核に比べ数十倍強く化学的修飾を受ける。

このように核に比べ DNA 障害を受けやすいことを考えても、ミトコンドリアゲノムでは核ゲノムに比べ変異の発生率が高いことが容易に想像される。このことはミトコンドリア遺伝子の進化的な変異速度が核遺伝子より 10 倍以上速いことや、酵母のミトコンドリア呼吸欠損株の出現頻度の高さから間接的に支持される。測定法の進歩により核に比べ 100 倍も突然変異発生率が高いことが報告されている³⁾⁴⁾。

一般に DNA 修復系は大きく 4 つに分類できる。①ヌクレオチド除去修復系、②ミスマッチ修復系、③塩基除去修復系、④組換え修復系である。1974 年に Clayton らが紫外線 DNA 障害であるピリミジンダイマーがミトコンドリアでは修復されないと報告した⁵⁾。紫外線障害 DNA は核では主にヌクレオチド除去修復系で修復されるが、当時ヌクレオチド除去修復系以外に DNA 修復系が知られていなかったため、ミトコンドリアには DNA 修復系全般がないと長く誤解される結果となった。

グアニン塩基の 8 位が酸化された酸化型グアニン塩基 (8-oxoG) は代表的活性酸素修飾塩基である。DNA 鎖中の 8-oxoG は DNA 複製の際、正常なペアであるシトシンとほぼ同じ頻度でアデニンとも対合するために、C:G から A:T あるいは A:T から C:G といったトランスポージョン変異 (ピリミジン塩基からプリン塩基あるいはプリン塩基からピリミジン塩基への変異) を起こす。ちなみにピリミジン塩基間あるいはプリン塩基間の変異はトランジション変異という。この 8-oxoG による変異を予防するための MutM, MutY, MutT という 3 つの酵素が塩基除去修復系の基本酵素として大腸菌でまず同定された。MutM は 8-oxoG DNA glycosylase (C:8-oxoG ペアから 8-oxoG を切り出す)、MutY は adenine DNA glycosylase (A:8-oxoG ペアから A を切り出す)、MutT は 8-oxodGTPase 活性を持ち、dGTP が活性酸素で酸化された 8-oxodGTP を加水分解する。8-oxodGTP は DNA 複製の際アデニンの対合相手としてチミンのかわりに取り込まれることから、同様にトランスポージョン変異を引き起こす。これら 3 つの大腸菌酵素のヒトホモログとして最初に同定されたのは九州大学の関口研でクローニングされた MutT ホモログで、hMTH1 (human MutT homolog 1) である⁶⁾。

塩基除去修復は活性酸素障害 DNA の修復に主たる役割を果たしているため、強い活性酸素発生源であるミトコンドリアにこの修復系が残っていることは合理性があるように思われる。核 DNA 複製のためのヌクレオチドプールは細胞質に存在する。一方、ミトコンドリアはミトコンドリア DNA 複製のためのヌクレオチドプールをマトリックス内に独自に持っている。筆者らは関口研との共同研究で hMTH1 は細胞質と同程度のレベルでミトコンドリアマトリックスに存在することを報告した⁷⁾。この頃にはミトコンドリアにも DNA 修復活性が存在することが報告されだしていたが、この報告は、活性、タンパク質、遺伝

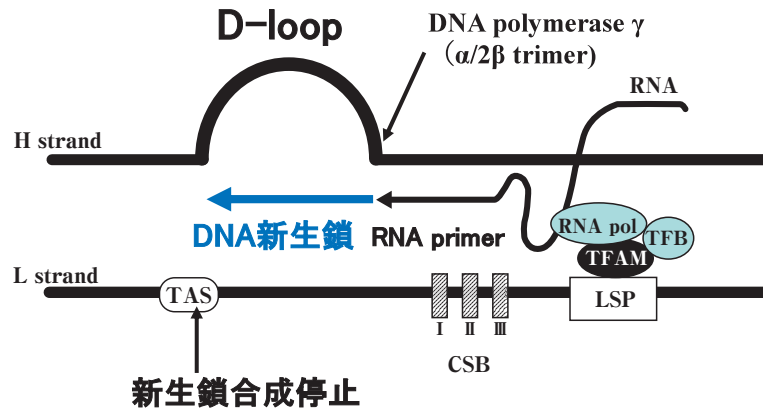


図2 SARモードのヒト mtDNA 複製開始機構

L strand 上の転写プロモータ領域 (LSP) に TFAM, TFB, RNA polymerase 転写開始複合体が形成されると転写が開始し、転写の大部分はそのまま mtDNA を一周するが、一部は Conserved Sequence Block (CSB) を過ぎたところで DNA 複製のプライマーとして働き DNA polymerase γ により新生 H strand の合成が始まる。新生鎖合成は L 鎖の合成を伴わず、元の H strand をループアウトしながら進む。その新生鎖合成の大部分は Termination Associated Sequence (TAS) 付近で合成が止まり 3 本鎖構造 (D-loop) を形成する。一部だけが DNA 複製へと進行する。

子の全てのレベルで DNA 修復系酵素がミトコンドリアにも存在することを示した最初の例となった。その後、MutM と MutY のヒトホモログとして hOGG1 と hMYH の cDNA がクローニングされた。両酵素とも核だけでなくミトコンドリアにも存在することが確認されている⁸⁾⁹⁾。

紫外線障害ミトコンドリア DNA が修復されないとの Clayton の最初の報告通り、ミトコンドリアにはヌクレオチド除去修復系は確認されていない。

2) mtDNA 複製

mtDNA は神経細胞や筋細胞のような細胞分裂しない（つまり核 DNA は複製しない）終末分化細胞においても活発に DNA 複製が起こっている。これがミトコンドリア異常症が神経や筋肉に表れやすい原因の一つである。これまでの研究から、ヒトを含む哺乳動物ミトコンドリアには、リーディング鎖 (H 鎖) が連続的に合成されていくときにラギング鎖は同時に合成されない strand-asynchronous replication (SAR) と、リーディング鎖が合成されていくときラギング鎖が協調的 (coupled) に合成される strand-coupled replication (SCR) という 2 つの θ 型 DNA 複製メカニズムが存在することが多くの人に受け入れられている¹⁰⁾。mtDNA 複製メカニズムの研究の歴史は長く、まず 1970 年代前半に strand-displacement mechanism (SDM) とよばれるモデルが Clayton らによって提案された。この SDM (現在の SAR) が哺乳動物 mtDNA の唯一の複製メカニズムであると長く考えられてきていた。しかし 2000 年に SDM では説明することのできないヒト mtDNA の複製中間体が Holt らによって報告された¹¹⁾。SAR の特徴の一つは転写と複製が共役していることである。転写が開始されると、大部分は転写が継続するが、一部は転写産物がプライマーとなり複製に切り替わる (図 2)。この転写から複製のスイッチングのメカニズムは現在もほとんどわかっていない。

筆者はまだ SCR が知られていない時期に、*in vivo* で mtDNA 修復過程の DNA 切断点を探す過程で HeLa 細胞 mtDNA 中に SDM (SAR) の複製開始領域に 5' 自由端をもつポイントを 1 塩基レベルで多数同定した¹²⁾。これは、*in vivo* で mtDNA の複製開始点を 1 塩基レベルで同定した最初の報告となった。

その後、私の研究室に加わった安川が mitochondrial transcription factor B2 (TFB2M), mitochondrial RNA polymerase, mtDNA の複製酵素である Polymerase gamma (PolG) のアクセサリサブユニット β

(合成触媒機能はない) が SAR と SCR の両方の複製に必須であることを遺伝子ノックアウトの結果から明瞭に示した¹³⁾¹⁴⁾。SAR と SCR の使い分けの機構は全くと言っていいほどまだ解明されていない。SCR の存在を否定的に考えているグループも根強くいる。

長年の論争の対象になっている mtDNA のメチル化によるエピゲノム修飾の有無について、非常に高度なミトコンドリア精製と精度の高いメチル化定量により、少なくとも生理的機能を持つレベルのメチル化が存在しないことを決定的に示した¹⁵⁾。この論文はこの論争にピリオドを打ったと考えている。

3) ミトコンドリアプロテアーゼ

ミトコンドリアマトリックス内の不良タンパク質の分解に関わっているプロテアーゼは、Lon, ClpXP and m-AAA の3種しかない。そのうちヒトの Lon である LONP1 は ATP 分解活性を持つシャペロンドメインとタンパク質分解活性を持つプロテアーゼドメインからなる。私の研究室に参加した松島は RNAi による LONP1 のノックダウンにより、ミトコンドリア内にタンパク質の凝集が起こることを見出した。そしてこの凝集がプロテアーゼ活性の低下ではなく、シャペロン活性の低下が原因であることを示した¹⁶⁾。さらに、この凝集がミトコンドリア内にインポートされたばかりのタンパク質に起こることから、LONP1 が新規インポートタンパク質の gatekeeper であるという新規概念を提出した。

4) マイトファジー

ミトコンドリアの機能維持には前述のような分子レベルの機構だけでなく、不良ミトコンドリアを丸ごと分解する系も存在する。オートファジーは大別すると非特異的オートファジー（オートファゴソームが周辺に存在するものを区別なく包み込むタイプ）と特異的オートファジー（ある特定の標的だけを包み込むタイプ）があり、後者のうちミトコンドリアだけ包み込み分解するものをマイトファジーと呼ぶ。当研究室の大学院生でもあった神吉はアメリカ留学中に酵母においてマイトファジーのためにミトコンドリアを認識するアダプタータンパク質として ATG32 をクローニングした。これはその後続々と同定されるマイトファジーアダプタータンパク質の第一号であった。帰国後もマイトファジーの研究を続け、ATG32 の活性化に至るシグナル伝達経路を明らかにした¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。

ミトコンドリア品質管理と関連した研究の一つ挙げる。酵母で ATG32 遺伝子をノックアウトすると、5日後にはプチコロニーと呼ばれる酸化的リン酸化能を喪失した酵母が形成するコロニーが全コロニーの約50%を占める。つまり半数の酵母が ATG32 を失うと酸化的リン酸化による ATP 合成能を失うことを意味する。その原因は mtDNA の消失であり、さらに mtDNA 消失の原因は活性酸素であった²⁰⁾。これらの結果は二つの重要な生物学的な事象を示している。一つはマイトファジーによるオルガネラレベルの品質管理がなくなると、不良ミトコンドリアが蓄積し活性酸素産生が増加することであり、2つめは、mtDNA は活性酸素に対して非常に脆弱で容易に分解されてしまうということである。

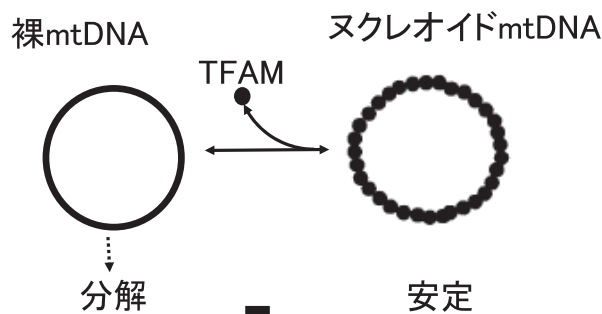
2. mtDNA ヌクレオイドと TFAM の機能

ミトコンドリアにはヒストンが存在しないため、mtDNA はヌクレオソーム構造をとらず、プラスミドのように裸で存在すると長く信じられてきた。このことはミトコンドリア DNA が核に比べ障害を受けやすい大きな原因のひとつとして挙げられていた。ミトコンドリア転写因子 A (TFAM) は Clayton らによって初めての mtDNA 転写因子としてクローニングされた²¹⁾。彼らはその報告の中で TFAM は LSP と呼ばれる転写領域に特異的に結合すること、mtDNA1 分子当たり 15 分子程度存在することを示している。

1) ヌクレオイド

我々は mtDNA 複製 (SAR) の制御の研究の過程で、TFAM が分子数でミトコンドリア DNA の約 1000 倍以上も存在すること、およびほとんどの TFAM が mtDNA と配列非特異的結合して存在していること

ヌクレオイド構造mtDNAのみが ミトコンドリア内で安定的に存在できる



TFAMはヌクレオイド形成を通してmtDNAを安定化

図3 mtDNAのTFAMを主要タンパク質とする高次構造形成と安定化

TFAMはmtDNAの全周を覆うだけの量存在し、mtDNA高次構造（ヌクレオイド）を形成する。TFAMに覆われていないmtDNAは速やかに分解され、一方mtDNAに結合していない遊離TFAMも速やかに分解される。

を見いだした²²⁾²³⁾。1分子のTFAMは約20塩基を占拠するので、約16kbのmtDNAはTFAMで覆われていて決して裸でないことを示している。TFAMはHigh Mobility Group (HMG) タンパク質ファミリーに属すが、多くのHMGタンパク質群はヒストンと並んで核DNAの高次構造形成に一翼を担うタンパク質として働いている。mtDNAにおいても構造タンパク質として、ヌクレオソーム様構造（ヌクレオイド）形成にヒストンに代わり主要な構造タンパク質としての役割を果たしていると思われる。TFAMノックアウトマウスは胎生致死であり²⁴⁾、またTFAMの過剰発現はミトコンドリアDNAコピー数を増加させ、その発現抑制はミトコンドリアDNAコピー数を減少させることから、ミトコンドリア内の*in vivo*環境ではmtDNAの安定的存在に必須である（図3）²⁵⁾。言い換えればTFAMは*in vivo*でmtDNAを安定化していると言える。

2) TFAM過剰発現マウスと心機能

九州大学循環器内科の筒井助教授（当時、現教授）と井手助手（当時、現特任准教授）らの冠動脈の一本を結紮して作製するマウス心筋部分梗塞モデルでは、非梗塞部が代償的に肥大を起こすが、やがて、その代償は破綻し、拡張性心筋症と心不全を来す。拡張性心筋症心臓の非梗塞部では活性酸素の産生増大とミトコンドリアゲノムコピー数の低下が観察される²⁶⁾。このとき、ミトコンドリアゲノムでコードされるサブユニットを含む電子伝達系複合体I、III、IV活性のみが低下し、核ゲノムのみでコードされる複合体II活性は低下しなかった。タンパク質としての複合体IIはこのなかで最も活性酸素に感受性が高いことから、電子伝達系の活性の低下は少なくともこのモデルでは、活性酸素によるmtDNAのコピー数の低下が原因であると考えられる。つまり、肥大に伴う生理的レベルの活性酸素の増加はタンパク質の傷害のまゝにmtDNAを傷害することを強く示唆している。さらに、抗酸化剤がこの系での心不全進行を抑制することから、活性酸素産生増大がこの部分心筋梗塞モデルの心不全の主原因の1つであると推定される。培養心筋細胞にH₂O₂を添加すると、わずか15分でミトコンドリア量の著明な低下が観察されることから考えて²⁷⁾、活性酸素によるmtDNA量の低下は合成の低下ではなく、分解の亢進が主であると予想される。酵母のマイトファジー抑制実験の結果はこれらの結果に良くマッチする。

先に述べたように、mtDNAの安定的存在にはその高次構造が重要である。逆に考えると、TFAMを主

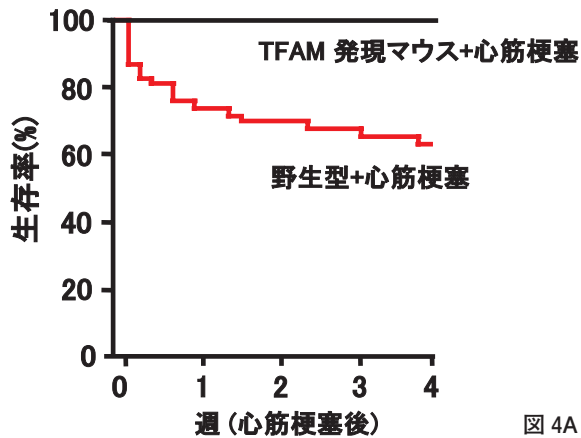


図 4A

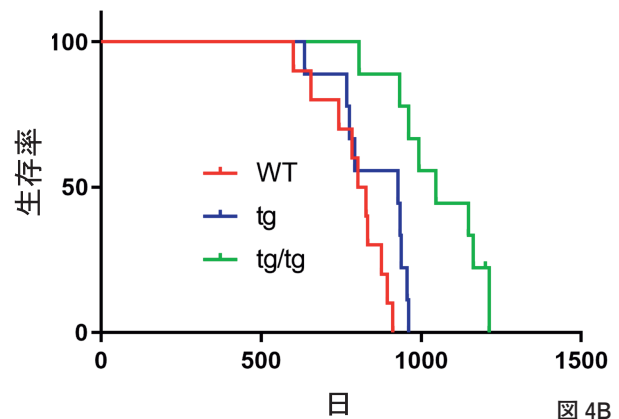


図 4B

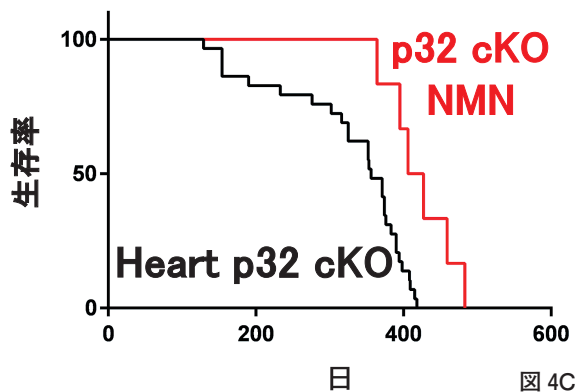


図 4C

図 4 TFAM マウス生存率

(A) TFAM の発現は心筋梗塞後の生存率を強く向上させる²⁸⁾。(B) TFAM マウスは自然寿命は野生型に比べて 30% 長い。未発表データ (後藤, 井手)。(C) p32cKO マウスの生存率は NAD⁺ の前駆体である NMN の投与で延長する (論文作成中)。

要構成成分とするこの mtDNA の高次構造は mtDNA に対して保護的に働いていると考えることができる。そこで、循環器内科の筒井グループと共同研究としてヒト TFAM 高発現マウス (以降 TFAM マウス) を作製し上述のマウス心筋部分梗塞実験を行ったところ、TFAM マウスでは部分梗塞レベルは変わらないが、mtDNA コピー数が少なくとも非心筋梗塞野生型マウスと同レベルが保たれ、非梗塞部の活性酸素の産生増大も抑制されていた。活性酸素による mtDNA のコピー数の低下が主要原因の 1 つであるとの先ほどの結論どおり、拡張性心筋症の進行は抑制され、生存率は著明に改善した (図 4A)²⁸⁾。このことは心不全の進行における酸化ストレスと mtDNA 維持の重要性をはっきり示している。

3) TFAM マウスと脳老化

前述のように、mtDNA は筋や神経のような終末分化細胞でも複製が継続し、老化に伴い変異が蓄積しやすい。加齢による mtDNA の変異の蓄積が加齢に伴う機能低下に一部貢献しているとの考えがある (mtDNA 老化仮説)。九大歯学部の上野教授らは、そこで高齢マウスとして 2 歳齢の TFAM マウスと野生型マウスを比較し、水迷路試験による記憶学習能力評価で、TFAM マウスのプラットフォームへの到着トライアルエラー数が野生型の約 3 分の 1 と強く減少することを示した²⁹⁾。mtDNA の保護が加齢に伴う神経機能低下の防止に重要な役割を果たしていることを示唆している。

ちなみに TFAM マウスでは寿命が約 30% 延長する (図 4B, 未発表データ)。これは mtDNA の保護の重要性をさらに示している。

4) TFAM マウスとアルツハイマー病

生体防御医学研究所の中別府教授らはアルツハイマーモデルマウスと TFAM マウスを交配し、アルツハイマー病の進行を比較した³⁰⁾。ヒト TFAM 遺伝子を併せ持つアルツハイマーモデルマウスは水迷路試

験による記憶学習能力評価で野生型のアルツハイマーモデルマウスに比べ優位に記憶学習能力は維持されていた。さらにアミロイド β の蓄積も抑制されていた。

5) TFAM マウスと肥満/耐糖能

TFAM マウスと野生型マウスに高脂肪食を8週間与えると、野生型では体重が増加し、白色脂肪細胞組織が増大していたのに対して、TFAM マウスではほとんど体重増加がなく、白色脂肪細胞組織の肥大も認められなかった。野生型に比べ耐糖能の低下もほとんどなかった。一方で、TFAM マウスでは白色脂肪細胞のミトコンドリア増加による著明なベージュ化が認められ、これもエネルギー消費の亢進に寄与し、肥満と耐糖能低下を予防していることが示唆された。褐色脂肪細胞はミトコンドリアが豊富でエネルギー消費増加と肥満抑制に大きく寄与していると考えられているため、TFAM マウスからプレ褐色脂肪細胞を採取し分化因子を加えて褐色脂肪細胞に分化させたのち野生型に移植したところ、肥満の抑制と白色脂肪細胞のベージュ化が再現できた。このことから褐色脂肪細胞での TFAM 過剰発現が肥満の抑制と耐糖能維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

野生型のプレ褐色脂肪細胞では褐色脂肪細胞への分化には分化因子の添加が必要であるが、TFAM マウスのプレ褐色脂肪細胞は分化因子を添加しなくても高率に褐色脂肪細胞に分化した。そこで、TFAM と野生型のプレ褐色脂肪細胞をフィルターを挟んで分化因子なしで共培養すると、野生型も自然に分化したことから、TFAM 発現プレ褐色脂肪細胞が液性の分化因子を分泌していることが示唆された。解析の結果、TFAM 発現プレ細胞から分泌されるエクソソームが分化因子であることが分かった。白色脂肪細胞のベージュ化能も確認された。つまり、TFAM 発現は(プレ)褐色脂肪細胞からエクソソームの分泌を亢進させ、パラクライン(あるいはオートクライン)的に褐色脂肪細胞の分化を促進し、個体マウスで褐色脂肪細胞を維持さらには増殖させるとともに、遠隔的に白色脂肪細胞をベージュ化することが強く示唆された(図5)。これらの結果は、褐色脂肪細胞からのエクソソーム分泌を増加させる薬物の開発が肥満の防止と糖尿病発症予防のあらたな魅力的な戦略になることを期待させる(Fujii et al. *iScience* in press)。

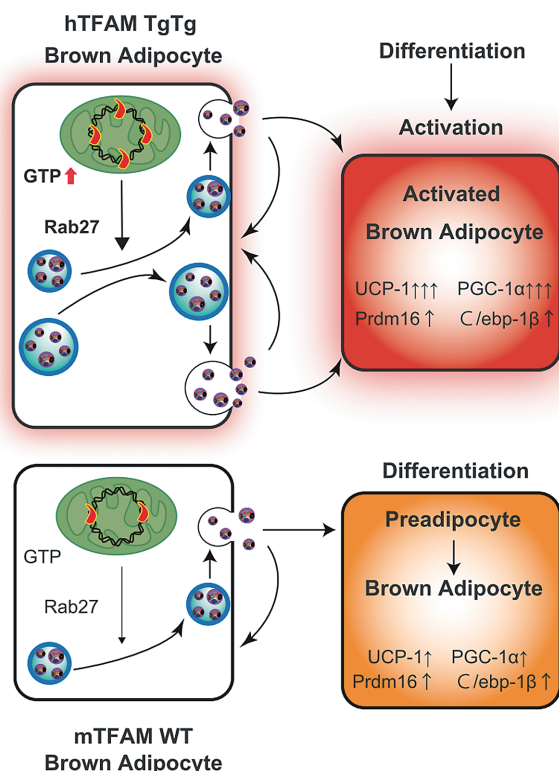


図5 TFAM は褐色脂肪細胞のエクソソーム分泌を促進(プレ)褐色脂肪細胞はエクソソームを分泌し、褐色脂肪細胞への分化と白色脂肪細胞のベージュ化を促進させる(下段)。TFAM はエクソソームの分泌を促進させて、エネルギー消費を亢進させる(上段)。(論文 in revision)

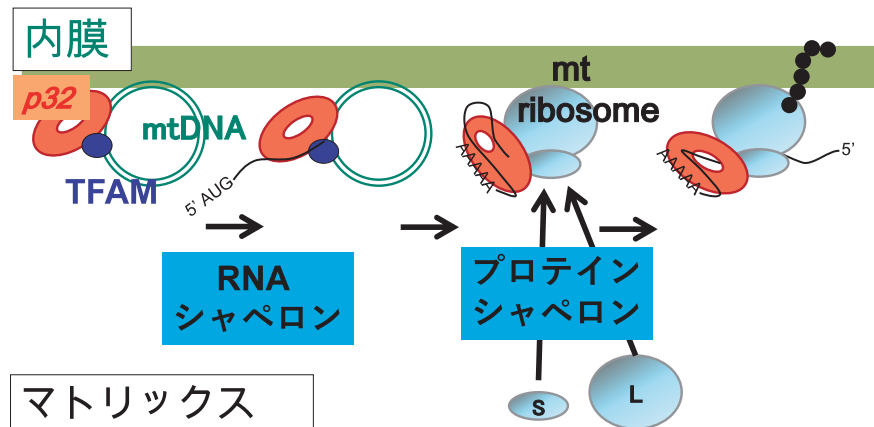


図6 ミトコンドリア内翻訳の新規メカニズムの提唱
p32はmRNAに結合(RNA シャペロン)し、ミトリボソームの大サブユニット、小サブユニットの会合を促進(プロテインシャペロン)することで、ミトコンドリア内翻訳を効率的に進行させる。

3. p32 機能と疾患

TFAMの機能のさらなる研究のために、抗TFAM抗体で共免疫沈降されるタンパク質を質量分析で網羅的に同定しTFAMと結合するタンパク質を探索したところ、その中にp32/C1QBPが含まれていた。実はその同定とは関係なく、核のスプライシング因子であると予想されていたp32が、ほとんどがミトコンドリアマトリックスに存在すること(図6)、および酸化的リン酸化に重要であることを1993年に報告していたが³¹⁾、その分子機構を未解明のままに放置していたので、これを機に再度取り組むことにした。

1) ミトコンドリアマトリックスのシャペロンタンパク質

p32の分子機能解明を目的にCre遺伝子でコントロールできるノックアウト(KO)マウスを作製した。全身にCre recombinaseを発現するトランスジェニックと交配させ全身性にp32遺伝子が破壊された全身p32KOマウスは残念なことに胎生致死であったので、KOマウスからp32^{-/-}の胎児繊維芽細胞(MEF)株を樹立した。詳細なデータを省いて結論を述べると、p32はRNAシャペロンとしてmtDNAコードmRNA(おそらくはco-transcriptionally)に結合し、さらにミトコンドリアリボソームの小サブユニットと大サブユニットの会合を促進するプロテインシャペロンとして働き、ミトコンドリア内翻訳に非常に重要な役割を果たしていることが分かった³²⁾。この結果p32のKOはmtDNAコードの電子伝達系サブユニットの合成を大きく低下させ、酸化的リン酸化を強く阻害することを明らかにできた(図6)。

2) p32と敗血症

p32^{-/-}MEFに細菌感染を模倣する実験系としてエンドトキシンLPSを培養系に添加すると、代表的炎症性サイトカインであるIL6の産生が野生型に比べ10倍以上増加した³³⁾。p32KOによるミトコンドリア翻訳障害に起因するミトコンドリアストレスが小胞体(ER)ストレスを誘発し、ストレス関連遺伝子群の転写因子であるATF4の発現を誘導し、IL6の発現を増加させるという分子機構を明らかにできた。全身性のp32KOは胎生致死であるため、LysM-Creトランスジェニックマウスと交配させることでマクロファージ特異的cKOマウスを作製し、個体レベルでのエンドトキシンモデルの生存率を比較すると、野生型マウスに比べ生存率が有意に低かった。炎症性サイトカインの過剰発現はエンドトキシンショックの原因であることから、ミトコンドリアストレスは敗血症によるエンドトキシンショックの促進因子であることが明らかにできた。

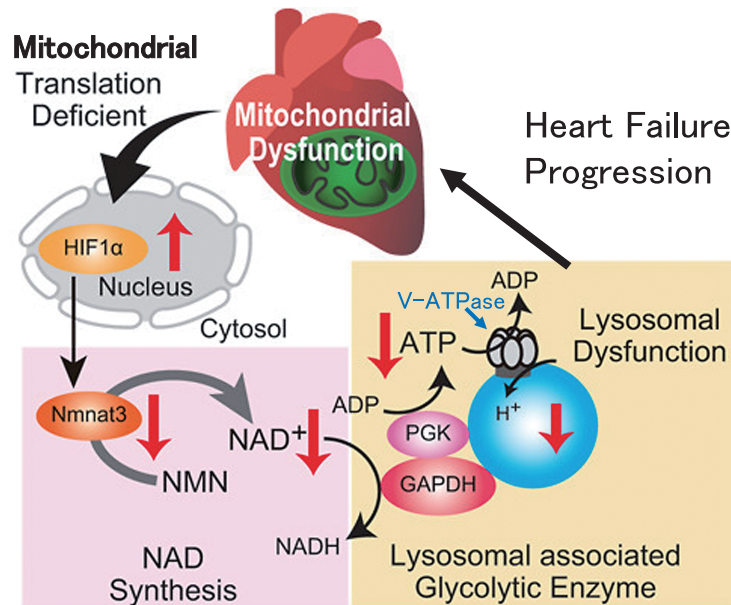


図7 NAD⁺はミトコンドリア品質管理に重要
p32のKOは転写因子Hif1αの発現亢進を通してNAD⁺産生を抑制。NAD⁺の低下はリソソーム膜上でのNAD⁺依存性ATP産生を低下させる。そのATPを利用するV-ATPaseの活性は低下し、リソソーム内の酸性化が低下する。その結果オートファジーによるミトコンドリア品質管理が阻害される。

3) p32と免疫樹状細胞の機能

樹状細胞は自然免疫と獲得免疫をつなぐ、免疫反応制御の鍵となる細胞である。Tie2-Cre トランスジェニックマウスはCreが造血幹細胞と血管内皮細胞特異的に発現している。このマウスと交配させることで血球細胞と血管内皮細胞特異的p32cKOマウスを作製し、その骨髄から得られたp32^{-/-}樹状細胞の機能を解析したところ、抗原提示能が強く低下していた。p32はプロテインシャペロンとしてピルビン酸脱水素酵素（PDH）の活性化に必須であること、p32^{-/-}樹状細胞におけるPDHの活性低下が抗原提示能を低下させていることを明らかにできた³⁴⁾。実際、個体レベルでオボアルブミン投与による抗オボアルブミン抗体産生量がp32cKOマウスで有意に低下していた。

4) p32と血球分化

このp32cKOマウスでは赤血球とリンパ球だけが著しく減少していた。造血幹細胞はまずリンパ系幹細胞と骨髄系幹細胞に分化すると考えられているので、この現象は正統的な分化経路からは説明が困難であった。詳しい解析の結果、CD45(-) Ter119(-) CD31(-) triple-negative細胞が赤血球系とBリンパ球系へ直接分化できる新しい前駆細胞であることを証明できた³⁵⁾。

5) p32と心機能

aMHC-cre (Myosin heavy chain6 promoter 下に Cre recombinase を発現) マウスと交配させ心筋特異的p32cKOマウスを作製した。このマウスは胎生期から心筋のp32が発現していないにも拘らず正常に生まれたが、出生後ゆっくり心不全が進行し、約1年で死亡する慢性心不全のモデルマウスとなった。p32KOによる翻訳不全がHif-1αの発現亢進を起し、一連のNAD⁺の合成酵素の遺伝子発現が抑制され、NAD⁺の産生が抑制されていた。NAD⁺依存性にATPを産生する解糖系酵素であるGAPDHとPGKがリソソーム膜上に局在しており、リソソーム内にプロトンを送り酸性化するプロトンポンプである

V-ATPase に効率的に ATP を供給していることを見出した。実際、 NAD^+ の前駆体の NMN の投与は生存日数を延長させた (図 4C)。つまり酸化リン酸化の低下だけでは心不全は起こらず、 NAD^+ の低下が V-ATPase 局所での ATP 産生を低下させ、リソソームの酸性化を阻害することでリソソームの分解能を低下させ、マイトファジーによるミトコンドリアの全般的な品質管理を低下させ、結果として長期的に心筋細胞の機能がゆっくり低下することが心不全がゆっくりと進行する原因であった (図 7)³⁶⁾。

おわりに

二十数年に及ぶ九州大学でのミトコンドリア研究を通じてミトコンドリア機能維持の重要性と多くの分子機構を明らかにすることができたことは望外の幸運であった。さらにミトコンドリアの好氣的 ATP 産生だけでなく様々な機能が多くの一般的な病態に広く寄与していることも明らかにすることができた。九大での私のミトコンドリア研究は学内外の多くの共同研究者の協力によるものであり、ここで紹介できなかった研究の多くの共同研究者を含めすべての共同研究者に心より謝意を表したい。臨床検査医学及び病院検査部スタッフによる多くの臨床検査に関する研究成果もあるが、本稿ではすべて省いたことを付け加えておきたい。

参 考 文 献

- 1) Kang D, Kim SH and Hamasaki N : *Mitochondrial transcription factor A (TFAM)* : roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*. 7 : 39-44, 2007.
- 2) Beckman KB and Ames BN : Detection and quantification of oxidative adducts of mitochondrial DNA. *Methods Enzymol*. 264 : 442-453, 1996.
- 3) Khrapko K, Kravtsov Y, de Grey AD, Vijg J and Schon EA : Does premature aging of the mtDNA mutator mouse prove that mtDNA mutations are involved in natural aging?. *Aging Cell*. 5 : 279-282, 2006.
- 4) Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, Gospel A, Chinnery PF, Samuels DC, Taylor GA, Plusa SM, Needham SJ, Greaves LC, Kirkwood TB and Turnbull DM : Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest*. 112 : 1351-1360, 2003.
- 5) Clayton DA, Doda JN and Friedberg EC : The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71 : 2777-2781, 1974.
- 6) Mo JY, Maki H and Sekiguchi M : Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein : sanitization of nucleotide pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89 : 11021-11025, 1992.
- 7) Kang D, Nishida J, Iyama A, Nakabeppu Y, Furuichi M, Fujiwara T, Sekiguchi M and Takeshige K : Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J Biol Chem*. 270 : 14659-14665, 1995.
- 8) Ichinoe A, Behmanesh M, Tominaga Y, Ushijima Y, Hirano S, Sakai Y, Tsuchimoto D, Sakumi K, Wake N and Nakabeppu Y : Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts. *Nucleic Acids Res*. 32 : 477-487, 2004.
- 9) Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, Fujiwara T, Kang D, Sugimachi K and Nakabeppu Y : Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell*. 10 : 1637-1652, 1999.
- 10) Yasukawa T and Kang D : An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms. *J Biochem*. 164 : 183-193, 2018.
- 11) Holt IJ, Lorimer HE and Jacobs HT : Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*. 100 : 515-524, 2000.
- 12) Kang D, Miyako K, Kai Y, Irie T and Takeshige K : In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem*. 272 : 15275-15279, 1997.
- 13) Inatomi T, Matsuda S, Ishiuchi T, Do Y, Nakayama M, Abe S, Kasho K, Wanrooij S, Nakada K, Ichiyangi K, Sasaki H, Yasukawa T and Kang D : TFB2M and POLRMT are essential for mammalian mitochondrial DNA replication. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1869 : 119167, 2022.
- 14) Do Y, Matsuda S, Inatomi T, Nakada K, Yasukawa T and Kang D : The accessory subunit of human DNA polymerase γ is required for mitochondrial DNA maintenance and is able to stabilize the catalytic subunit. *Mitochondrion*. 53 : 133-139, 2020.

- 15) Matsuda S, Yasukawa T, Sakaguchi Y, Ichianagi K, Unoki M, Gotoh K, Fukuda K, Sasaki H, Suzuki T and Kang D : Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA. *Sci Rep.* 8 : 5801, 2018.
- 16) Matsushima Y, Takahashi K, Yue S, Fujiyoshi Y, Yoshioka H, Aihara M, Setoyama D, Uchiumi T, Fukuchi S and Kang D : Mitochondrial Lon protease is a gatekeeper for proteins newly imported into the matrix. *Commun Biol.* 4 : 974, 2021.
- 17) Kanki T, Kurihara Y, Jin X, Goda T, Ono Y, Aihara M, Hirota Y, Saigusa T, Aoki Y, Uchiumi T and Kang D : Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO Rep.* 14 : 788-794, 2013.
- 18) Hirota Y, Yamashita S, Kurihara Y, Jin X, Aihara M, Saigusa T, Kang D and Kanki T : Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways. *Autophagy.* 11 : 332-343, 2015.
- 19) Aoki Y, Kanki T, Hirota Y, Kurihara Y, Saigusa T, Uchiumi T and Kang D : Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol Biol Cell.* 22 : 3206-3217, 2011.
- 20) Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T and Kang D : Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem.* 287 : 3265-3272, 2012.
- 21) Fisher RP and Clayton DA : Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol.* 8 : 3496-3509, 1988.
- 22) Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N and Kang D : Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* 31 : 1640-1645, 2003.
- 23) Takamatsu C, Umeda S, Ohsato T, Ohno T, Abe Y, Fukuoh A, Shinagawa H, Hamasaki N and Kang D : Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep.* 3 : 451-456, 2002.
- 24) Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS and Clayton DA : Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet.* 18 : 231-236, 1998.
- 25) Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N and Kang D : Architectural role of TFAM in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol.* 24 : 9823-9834, 2004.
- 26) Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu S, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N and Takeshita A : Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts following myocardial infarction. *Circ Res.* 88 : 529-535, 2001.
- 27) Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N and Takeshita A : Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α -induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation.* 107 : 1418-1423, 2003.
- 28) Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, Hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K and Tsutsui H : Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. *Circulation.* 112 : 683-690, 2005.
- 29) Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H and Nakanishi H : Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neurosci.* 28 : 8624-8634, 2008.
- 30) Oka S, Leon J, Sakumi K, Ide T, Kang D, LaFerla FM and Nakabeppu Y : Human mitochondrial transcriptional factor A breaks the mitochondria-mediated vicious cycle in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 6 : 37889, 2016.
- 31) Muta T, Kang D, Kitajima S, Fujiwara T and Hamasaki N : p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation. *J Biol Chem.* 272 : 24363-24370, 1997.
- 32) Yagi M, Uchiumi T, Takazaki S, Okuno B, Nomura M, Yoshida S, Kanki T and Kang D : p32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation : importance of its RNA-binding ability. *Nucleic Acids Res.* 40 : 9717-9737, 2012.
- 33) Sasaki K, Gotoh K, Miake S, Setoyama D, Yagi M, Igami K, Uchiumi T and Kang D : p32 is Required for Appropriate Interleukin-6 Production Upon LPS Stimulation and Protects Mice from Endotoxin Shock. *EBioMedicine.* 20 : 161-172, 2017.
- 34) Gotoh K, Morisaki T, Setoyama D, Sasaki K, Yagi M, Igami K, Mizuguchi S, Uchiumi T, Fukui Y and Kang D : Mitochondrial p32/C1qbp Is a Critical Regulator of Dendritic Cell Metabolism and Maturation. *Cell Rep.* 25 :

1800–1815 e4, 2018.

- 35) Gotoh K, Kunisaki Y, Mizuguchi S, Setoyama D, Hosokawa K, Yao H, Nakashima Y, Yagi M, Uchiumi T, Semba Y, Nogami J, Akashi K, Arai F and Kang D : Mitochondrial Protein Synthesis Is Essential for Terminal Differentiation of CD45(-) TER119(-) Erythroid and Lymphoid Progenitors. *iScience*. 23 : 101654, 2020.
- 36) Yagi M, Toshima T, Amamoto R, Do Y, Hirai H, Setoyama D, Kang D and Uchiumi T : Mitochondrial translation deficiency impairs NAD(+) -mediated lysosomal acidification. *EMBO J*. 40 : e105268, 2021.

(特に重要な文献については、番号をゴシック体で表記している.)

著者プロフィール

康 東天 (かん どんちゃん)

香椎丘リハビリテーション病院, 九州大学名誉教授 (大学院医学研究科臨床検査医学部分野). 医学博士.

◆**略歴** 1956年大阪市に生まれる。1982年九州大学医学部卒業。1988年同大 大学院医学系研究科博士課程修了。1989年福岡大学医学部臨床検査医学助手。1992年 Max-Planck 研究所研究員。1993年九州大学医学部第2生化学講座助手。1996年九州大学医学部臨床検査医学助教授。2006年より同大学院臨床検査医学教授。2022年3月定年退職。4月より現職。

◆**研究テーマと抱負** ミトコンドリア機能維持の分子メカニズムと疾患との関連をさまざまな視点から研究。特にミトコンドリア産生活性酸素のミトコンドリア自身への影響と細胞代謝機能への影響には研究初期から興味を持って取り組んでいる。臨床検査医学に所属するようになってからは、臨床検査の標準化、医療情報データベース化、新規検査法の開発などにも力を入れている。

◆**趣味** 特になし。強いて言えば一人旅。

Maintaining of Mitochondria has Key Roles in Common Diseases

Dongchon KANG

*Kashiogaoka Rehabilitation Hospital
Professor Emeritus, Kyushu University*

Abstract

Mitochondria are responsible for about 90% of ATP synthesis in most aerobic cells, which inevitably accompanies production of huge reactive oxygen species. Therefore, mitochondrial genome (mtDNA) is under far more oxidative stress than nuclear genome. Resultantly, mtDNA as well as the organelle itself suffers higher damage over age. As mitochondria are a central hub for many cellular metabolisms including sugars, lipids, proteins, and nucleic acids in addition to energy production, the damage of mitochondria seriously affects the cellular overall processes leading to various common diseases.

We have found Mitochondrial transcription factor A (TFAM) is a main component forming mtDNA higher structure, so called nucleoid. We also have shown TFAM is essential for its stability in mitochondrial matrix, in other words, protects mtDNA *in vivo*. Accordingly, overexpression of TFAM increases mtDNA and has beneficial effects for many pathologic situations such as heart failure, aging, neurodegenerative disease, diabetes, and so on.

We found p32 protein among the TFAM-binding proteins. p32 is already reported by us to be in mitochondrial matrix and critical for oxidative phosphorylation. Through several p32 conditional knockout mice, we have shown p32 plays critical roles in efficient mitochondrial translation, regulation of IL6 production, antigen presentation, and differentiation to erythrocyte and B lymphocyte.

Key words : mtDNA, oxidative stress, TFAM, p32