

# 研究報告書

## 「ミトコンドリアのストレス受容・応答機構と炎症制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年3月～平成26年3月

研究者: 武田 弘資

### 1. 研究のねらい

さまざまな外的環境要因や内的環境要因に対する生体の防御反応である炎症は、免疫系を中心とする多くの組織において機能する各種細胞によって精緻に制御されている。しかし精緻なシステムがゆえに、わずかな調節機構の狂いであっても的確な制御が失われ、炎症の慢性化に結びつく。そのため、炎症の制御に携わるすべての細胞が、外的・内的環境を常に感知してその変動に対応する機能を備えており、多段階での炎症応答のファインチューニングを可能にしていると考えられる。

本研究では、そのような外的・内的環境の細胞内感知システムとしてミトコンドリアに着目した。ミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生のみならず、 $\text{Ca}^{2+}$ のバッファーとして細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルに積極的に関わったり、細胞死の誘導に関わったりと多彩な機能をもつ。その一方で、さまざまなストレスに対して非常に感受性の高いオルガネラで、ストレスによるさまざまな障害を受け、内膜を隔てたプロトン勾配によって維持される膜電位の低下に至る。それに対してミトコンドリアには、自身の膜電位低下を感知し、その情報をミトコンドリアの品質管理マシナリーや他のオルガネラに向けてシグナルとして発信することで適切な細胞応答を誘導する機構が備わっていると考えられている。本研究では、そのようなミトコンドリアに加わったストレスに対する受容・応答機構が、細胞傷害性ストレスに対する防御に働くだけでなく、炎症の制御にも積極的に働くことを示すとともに、ミトコンドリアという一つのオルガネラが、炎症の制御にどのように関わっているかを解明することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、ミトコンドリアにおけるストレス受容に働く分子として、PGAM5 に着目した。この分子は、解糖系において機能するホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM)と高い相同性を示すものの、PGAM 活性は示さず、セリン/スレオニン特異的プロテインホスファターゼとして機能する。PGAM5 欠損ショウジョウバエの解析からは、PGAM5 がホスファターゼ活性依存的に個体レベルでの熱ショックストレス耐性に寄与していることが示された。一方で、PGAM5 がおもにミトコンドリアの内膜に局在し、ミトコンドリアの膜電位低下にともなって膜内切断を受けることが分かった。よって PGAM5 は、ミトコンドリアの損傷や機能低下の程度を感知し、その情報を他の分子にシグナルとして伝達する役割を担っていると考えられる。

この分子の炎症における役割を解析する上で、最近その制御にミトコンドリアが深く関わっていることが注目されている NLRP3 インフラマソームに着目した。NLRP3 インフラマソームは、さまざまな Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や Damage-associated molecular pattern(DAMPs) に応答して形成される細胞内タンパク質複合体で、IL-1 $\beta$  や IL-18

などの炎症性サイトカインの産生・分泌を担っている。PGAM5 ノックアウトマウス由来のマクロファージや樹状細胞を用いて解析を行ったところ、数多く知られている NLRP3 インフラマソームの活性化刺激のうち、ごく一部に対する応答にのみ PGAM5 が関与することを示唆する結果が得られた。それをふまえて、NLRP3 インフラマソームの各種活性化刺激に対するミトコンドリアの応答や、インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの機能の必要性を詳細に調べてみると、刺激の種類に応じて非常に多様なミトコンドリアの関わり方があることが分かってきた。このような多様性から、ミトコンドリアの状態に応じてインフラマソームの活性化が質的あるいは量的に変わること、さらには炎症の慢性化機構にミトコンドリアが深く関わっていることが予想される。

## (2) 詳細

### 1. PGAM5 の分子機能解析

以前我々は、PGAM5 がミトコンドリアに局在し、新しいタイプのセリン／スレオニン特異的プロテインホスファターゼとしてストレス応答性 MAP キナーゼ経路の制御に関わることを示していた。その後の解析により、さまざまな細胞傷害性ストレスに応答して PGAM5 が自身の N 末端側に存在する膜貫通ドメイン内で切断されることを見出したことから、本研究ではその機構の解析から進めた。

まず PGAM5 が、膜貫通ドメインを介してミトコンドリアの内膜に、酵素活性を担う PGAM ドメインを膜間腔側に向けて局在していることを明らかにした。また、切断型分子のみを特異的に認識する抗体を作製して解析を進めたところ、PGAM5 の膜内切断が、ミトコンドリアの内膜を隔てて維持されている膜電位の低下に依存していることが分かった。さらに、その切断を担う酵素として、PGAM5 と同じく内膜に局在するロンボイド型セリンプロテアーゼ PARL を同定した。興味深いことに PARL は、若年性パーキンソン病の原因遺伝子産物として知られている PINK1 というプロテインキナーゼの切断に働くことが最近報告され、PINK1 はマイトファジーと呼ばれるミトコンドリア選択的な分解・排除機構に働くことから、PARL-PINK1 系がミトコンドリアの品質管理に非常に重要な役割を担っていると考えられている。PINK1 との関連を検討したところ、PARL は定常状態では PINK1 を切断するのに対し、ミトコンドリアの膜電位低下に際しては基質を変えて PGAM5 の切断に働くことが明らかとなった (Sekine et al. J. Biol. Chem. 2012)。以上の結果から、PGAM5 は、ミトコンドリアの傷害や機能低下の程度を感知し、その程度に応じた適切な細胞応答を促すためのシグナル伝達を担っていると考えられる。

PGAM5 の生体における機能についてはショウジョウバエを用いて解析を進めた。PGAM5 欠損ショウジョウバエを作製し、さまざまなストレスに対する個体レベルでの応答を検討した結果、通常の飼育温度 25°C を 37°C に高めることで熱ショックを加えると、野生型個体と比較して早期に死亡することを見出した。さまざまな遺伝学的な解析の結果、キノコ体と呼ばれる昆虫の脳において高次機能を担う領域で、PGAM5 欠損個体では熱ショックによる神経細胞のアポトーシスが亢進しており、それが、PGAM5 欠損個体が熱ショックに対して脆弱になっている原因であることが分かった。すなわち、PGAM5 は、熱ショックによる神経細胞のアポトーシスを抑制する働きをもつことが明らかとなった (Ishida et al. PLoS ONE 2012)。逆に、ショウジョウバエの複眼に PGAM5 を過剰発現させると、ホスファターゼ活性依存的に rough eye と呼ばれ

る形態異常が誘導された。その際、幼虫期においてはアポトーシスが亢進していたことから、PGAM5 がアポトーシスを促進する活性も有することが分かった。以上の結果から、PGAM5 は、細胞の種類やストレスの種類、あるいはストレスを受ける状況などに応じてアポトーシスを促進も抑制もする、いわゆる context-dependent なアポトーシス制御因子ではないかと考えられる。

## 2. NLRP3 インフラマソームの制御におけるミトコンドリアの役割

ミトコンドリアにおいてストレスの受容・応答に働くPGAM5のような分子が、炎症にかかわる細胞においてどのような役割を担うかを明らかにすることが、炎症におけるミトコンドリアの機能を解明する一つの糸口になるのではないかと考えた。そこで注目したのが、NLRP3 インフラマソームである。これまでの多くの解析から、様々な NLRP3 インフラマソーム活性化刺激に対する共通の応答は、細胞外への  $K^+$  の流出と考えられている。その下流では、機能の低下したミトコンドリアからの活性酸素種の産生や、ミトコンドリア DNA、とくに酸化されたミトコンドリア DNA の細胞質への放出が、NLRP3 インフラマソーム活性化の引き金となることが報告されている。つまり現在のモデルでは、機能の低下したミトコンドリアが NLRP3 インフラマソーム活性化の共通のメディエーターと考えられている。しかし、PGAM5 ノックアウトマウスの骨髄由来マクロファージや樹状細胞においては、数多く知られている NLRP3 インフラマソームの活性化刺激のうち、ごく一部の刺激による活性化のみが低下していることが分かり、ミトコンドリアの機能不全が NLRP3 インフラマソーム活性化の共通の機構として働くという現在のモデルよりは、刺激に応じて、インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの関わり方が異なると見なす方が妥当と考えられた。

そこで、実験的な NLRP3 インフラマソーム活性化刺激としてよく用いられる細胞外 ATP、細菌性毒素 Nigericin、抗ウイルス薬 R837、3つの刺激に対する細胞およびミトコンドリアの応答を検討した。その結果、IL-1 $\beta$  産生へのミトコンドリアの膜電位や電子伝達系の活性の必要性は刺激によって異なり、NLRP3 インフラマソームの活性化に際してミトコンドリアの機能が維持されている必要がある場合もあることが分かった。また、刺激依存的なミトコンドリアの膜電位や形態の変化も、刺激によって互いに異なっていた。さらに、どちらもインフラマソーム解析に汎用されている骨髄由来マクロファージとヒト単球由来 THP-1 細胞の間においても、同一の NLRP3 インフラマソーム活性化刺激に対してミトコンドリアの膜電位の必要性が全く異なる場合があることも分かった。よって、NLRP3 インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの関わり方は、細胞の違いや活性化刺激の違いによって大きく異なること、そして、機能を保持したミトコンドリアが NLRP3 インフラマソームの活性化に必要とされる状況があることが分かってきた。この結果は、ミトコンドリアの状態に応じて、インフラマソームの活性化程度や持続時間が変わることを示唆していることから、ミトコンドリアの機能とインフラマソーム活性化との関連を解明することが、炎症の慢性化機構を明らかにする上での一つの重要な課題であると考えられる。

## 3. 今後の展開

本研究により、NLRP3 インフラマソームの活性制御におけるミトコンドリアの関わり方が予想以上に多様であることが明らかとなった。とくに、これまでに提唱されているミトコンドリアの機

能低下によるインフラマソーム活性化機構に加えて、機能を保持したミトコンドリアによる活性化機構も存在するという事は、細胞応答として、可逆的にインフラマソームの活性を制御できる相と、不可逆的、すなわち持続的に活性化させる相が存在することを示唆している。よって、正常なミトコンドリアの関わるインフラマソームの活性化において、ミトコンドリアのどのような機能がどのような理由で必要とされているかを明らかにし、新たな NLRP3 インフラマソーム活性化機構の解明を目指したい。

一方で、PGAM5 がミトコンドリアの傷害や機能低下の程度を感知する機構を介してインフラマソームの活性化に関わっているとすれば、その機構はインフラマソームの活性化を適正に保つ働きを担っている可能性がある。よってマクロファージ系細胞における PGAM5 の分子機能のさらなる解明も目指すことで、慢性炎症につながるインフラマソームの活性制御異常にミトコンドリアがどのように関わっているかも明らかにできるのではないかと考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

ストレス応答分子としての PGAM5 の分子機能解析については一定の成果が得られた一方で、PGAM5 の炎症における役割については、とくにノックアウトマウス個体を用いた病態モデル解析が思うように進まず、十分な成果が得られるには至らなかった。しかし、1つの分子の機能解析にとどまらず、ミトコンドリアの炎症における役割の解明をめざすことが当初のねらいであったため、NLRP3 インフラマソームの活性制御への新たな多様なミトコンドリアの関わり方を見出せたことは、まだ端緒をつかんだだけではあるが、今後の研究につながる重要な基盤となった。これまでに報告されているインフラマソームとミトコンドリアの関連を示した論文の中には、ミトコンドリアの機能的あるいは生化学的な解析が十分ではないものも見受けられるため、本研究で確立した技術や領域会議等でいただいたアドバイスを活かして、これまでは注目されていなかった現象を見逃さずに、ミトコンドリアの本質的な役割を追求していきたい。

##### (2) 研究総括評価(公開項目)

炎症反応は外的・内的環境要因に対する生体の防御反応であり、細胞ストレスに感受性の高いミトコンドリアが炎症反応を制御している可能性について、ミトコンドリアのストレス受容・応答に働く分子として見出した PGAM5 の分子機能解析を中心とした挑戦的な研究がなされた。その結果、PGAM5 はミトコンドリアの傷害や機能低下の程度を感知し、その程度に応じた細胞応答を促すためのシグナル伝達を担っており、ショウジョウバエを用いた個体レベルでの解析の結果、熱ショックによる神経細胞のアポトーシスを抑制する作用を示すのみならず、複眼特異的な PGAM5 の過剰発現がアポトーシスを促進することから、PGAM5 は context-dependent なアポトーシス制御因子であることを見出している。さらに、機能の低下したミトコンドリアが NLRP3 インフラマソームを活性化することが知られているため、その過程における PGAM5 の役割についても検討を加えている。以上、PGAM5 の分子機能や NLRP3 インフラマソーム活性化へのミトコンドリアの関与について、レベルの高い解析を行い一定の成果が得られたことは評価されるが、本人も述べているように、PGAM5 ノックアウトマウス個体を用いた病態モデルでの解析では期間内に十分な成果が得られるには至らなかった。炎症応答時におけるミトコンドリアの役割や PGAM5 の関与は当初の仮説よりも複雑であると思われ、研

研究者が見出した PGAM5 分子の研究の方向性について改めて吟味することも含めて、今後のさらなる成果を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Sekine, S., Kanamaru, Y., Koike, M., Nishihara, A., Okada, M., Kinoshita, H., Kamiyama, M., Maruyama, J., Uchiyama, Y., Ishihara, N., Takeda, K. and Ichijo, H. Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5. *J. Biol. Chem.* (2012) 287, 34635–34645.
2. Ishida, Y., Sekine, Y., Oguchi, H., Chihara, T., Miura, M., Ichijo, H. and Takeda, K. Prevention of apoptosis by mitochondrial phosphatase PGAM5 in the mushroom body is crucial for heat shock resistance in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* (2012) 7, e30265.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表

1. 武田弘資. ミトコンドリアのストレス受容・応答機構と炎症制御. 創薬シンポジウム:アカデミア創薬と探索医療. 長崎 2013/03/19
2. Sadatomi, D. and Takeda, K. Role of mitochondrial phosphatase PGAM5 in inflammation. 10th International Conference on Protein Phosphatases. Tokyo, 2013/02/08
3. Takeda, K. Regulation of cellular stress response by mitochondrial protein phosphatase PGAM5. 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Tokyo, 2013/02/01
4. Takeda, K. Role of mitochondrial phosphatase PGAM5 in inflammation. The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (IEIIS2012). Tokyo, 2012/10/24
5. 武田弘資. アティピカル・プロテインホスファターゼ PGAM5 によるストレス応答制御. 第 84 回日本生化学会大会. 京都 2011/9/23

#### 総説

1. Sadatomi, D., Tanimura, S., Ozaki, K. and Takeda, K. Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling. *Int. J. Mol. Sci.* (2013) 14, 4596–4612.
2. Kanamaru, Y., Sekine, S., Ichijo, H. and Takeda, K. The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. *J. Signal Transduct.* (2012) 2012, 931215.

#### 著作物

1. 武田弘資. がんと炎症. 「がん増殖と悪性化の分子機構」 化学同人(2012) pp191-205