

タイトル： mito-Keima を用いたマイトファジーモニタリングシステムの検討

英文タイトル： Monitoring of Mitophagy using mito-Keima system

著者： Chernyshova Kseniia<sup>1,2</sup>

所属：<sup>1</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科視覚病態学分野、<sup>2</sup>機能制御学分野  
(指導教授：福地健郎教授)

1, Division of Ophthalmology and Visual Science, 2, Department of Cellular Physiology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University  
(Supervisor: Prof. Fukuchi Takeo)

951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757

e-mail:chernykseniya@med.niigata-u.ac.jp

### 要旨

マイトファジーは、不要となったミトコンドリアをオートファジーを介して分解除去することで、ミトコンドリアの恒常性維持に寄与している。これまでの研究から、マイトファジーには Parkin 依存的経路と Parkin 非依存的経路が知られているが、簡便で高感度の検出法はなかった。近年 pH 感受性蛍光タンパク質 Keima を用いたマイトファジー検出システム (mito-Keima) が報告された。本研究では、mito-Keima システムの Parkin 依存的経路・非依存的経路それぞれに対する感受性・特異性について、mito-Keima 安定発現細胞株を用いて検討した。その結果、mito-Keima 細胞株を用いた検出システムは、従来法に比べ高感度であり、特異性も高いことが明らかとなった。

キーワード：マイトファジー、Parkin、mito-Keima、ミトコンドリア

### 序文

オートファジーは、細胞内のタンパク質やオルガネラの分解システムのひとつである<sup>1</sup>。オートファジーが誘導されると、まず細胞質に隔離膜が出現する。引き続き隔離膜が伸長しオートファゴソームとなる過程で、細胞質のタンパク質やオルガネラを包み込み、最終的にはオートファゴソームとリソソームが融合し、内容物は分解される。この現象は酵母から高等動物まで広く見られ、さまざまな生理現象や疾患の発症に関与している。

オートファジーの一種であるマイトファジーは、不要になったミトコンドリアを選択的にオートファゴソームに取り込み分解する<sup>2,3</sup>。ミトコンドリアは ATP の産生やアポトーシスの制御など細胞にとって重要な役割を担っているが、一方でその活動にともなう活性酸素種の発生は、ミトコンドリアの機能低下を引き起こす。マイトファジーは、機能低下したミトコンドリアをオー

トファジーを介して分解除去することで、ミトコンドリアの恒常性維持に寄与していると考えられている（図 1 A）。

これまでマイトファジーの実行経路については数多く研究されているが、大きく分けると（1）Parkin 依存的経路と（2）Parkin 非依存的経路、の 2 種類に分類することができる<sup>2,3</sup>。（1）Parkin 依存的経路は、ユビキチン化酵素である Parkin を中心とした経路である（ユビキチン介在性経路）。実験的に Parkin 依存的マイトファジーは、ミトコンドリア脱共役剤である carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) などを作用させミトコンドリア膜電位を低下させたときに誘導できる。PINK1 (PTEN-induced kinase 1) はミトコンドリア移行シグナルを持っており、細胞質で翻訳された PINK1 の N 末端はミトコンドリアの外膜を通過するが、膜電位が正常なミトコンドリアでは、ミトコンドリア内のプロテアーゼにより PINK1 の N 末部分が切断され、最終的に、PINK1 はミトコンドリアから放出されユビキチン-プロテアソームにより分解される。一方で、ミトコンドリア膜電位が低下すると、PINK1 の N 末端が十分にミトコンドリアに挿入できずにミトコンドリア外膜でとどまり、PINK1 はミトコンドリア外膜タンパク質として蓄積される。PINK1 がミトコンドリア外膜に蓄積すると、Parkin がミトコンドリアに局在化ようになる。Parkin はミトコンドリア外膜タンパク質に次々とユビキチンを付加し、付加されたユビキチン鎖にアダプタータンパク質 (OPTN や NDP52 など) が結合する。アダプタータンパク質は、さらに隔離膜上の LC3 ファミリー分子が結合することで、ミトコンドリアは選択的にオートファゴソームに取り込まれ、リソソームで分解される。（2）一方 Parkin 非依存的経路は、細胞を低酸素や鉄欠乏状態に暴露した時に誘導されるマイトファジーである。その分子機構の詳細は未だに不明な点が多いが、ミトコンドリア外膜に存在するレセプタータンパク質 (NIX、BNIP3、FUNDCl、BCL2L13 など) が、Parkin によるユビキチン化を介さず、直接 LC3 ファミリー分子と結合することによる。

マイトファジーは、ミトコンドリアを分解する現象であり、ウエスタンブロッティング法でミトコンドリアタンパク質の増減を解析することで研究されてきた<sup>4</sup>。実際、Parkin 依存的マイトファジーでは、CCCP 処理後 24 時間から 48 時間で細胞内のほとんどのミトコンドリアが分解され、ミトコンドリアタンパク質 Tom20 や Tim23 の量は大幅に減少する<sup>4</sup>。しかしながら、CCCP 投与 12 時間程度からアポトーシスも誘導されており、この影響を排した解析は困難であった。また、Parkin 非依存的マイトファジーで誘導されるミトコンドリア分解は、細胞内のミトコンドリアのごく一部であるため、ウエスタンブロッティング法によるマイトファジーの検出には限界があった。

Keima は pH 感受性蛍光タンパク質で、中性環境では 440 nm 波長で、酸性環境では 586 nm 波長で励起される特性を持つ<sup>5</sup>。片山らは、Keima にミトコンドリア移行シグナルを付加し (mito-Keima)、ミトコンドリアマトリックスに発現させることで、ミトコンドリアを 440 nm の励起光で、マイトファジーによりリソソームに運ばれ酸性化されたものを 586 nm の励起光で観察できることを報告している（図 1 B）<sup>6</sup>。廣田や山下らは、この手法を用いて Parkin 非依存的マイトファジーを感度良く検出することに成功している<sup>7</sup>。このように、mito-Keima を用いたマイトファジー観察は、高感度で有用であると考えられるが、Parkin 依存的マイトファジーから Parkin 非依存的マイトファジーまで幅広い有用性は検討されていない。本研究では、mito-Keima を用いて、Parkin 依存的マイトファジーから Parkin 非依存的マイトファジーまで、幅広い条件に

おけるミトファジーの観察を試みた。その結果、Parkin 依存的ミトファジーにおいては CCCP 投与後の非常に初期の時点からミトファジーが観察されること、ivermectin による非常に弱く誘導されるミトファジーまで観察できることを明らかにした。

## 材料と方法

### 1.細胞培養

細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS,#10270,Life Technologies) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM,#043-30085,和光純薬) 中で、5 %CO<sub>2</sub> 存在下、37°Cで培養した。Parkin 依存性ミトファジーの誘導には、10μM CCCP を含む培地中で、または 10μM oligomycin (#O4533、和光純薬) と 4μM antimycin A (#514-55521,和光純薬) を含む培地中で、それぞれ数時間培養した。ivermectin は、10mM で 24 時間処理した (I8898,Sigma-Aldrich)。Parkin 非依存性ミトファジーの誘導には、1mM deferoxamine (DFO, D9533, Sigma- Aldrich) を含む培地中、もしくは低酸素環境 (1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) で 24 時間培養した。

### 2.細胞株

mito-Keima 発現 HeLa 細胞 (mtKeima\_HeLa) および、mito-Keima と HA-Parkin 発現 HeLa 細胞 (mtKeima/Parkin\_HeLa) は、それぞれ山下ら、赤羽らの論文を参照<sup>8,9</sup>。OPTN および NDP52 破壊細胞、ATG14 破壊細胞、FIP200 破壊細胞は、新潟大学山下らより供与いただいた (一部未発表)<sup>10</sup>。

### 4. 抗体

本研究では一次抗体には、抗 OPTN 抗体 (ab23666、abcam)、抗 NDP52 抗体 (# 9036、Cell Signaling Technologies)、抗 FIP200 抗体 (# 12436、Cell Signaling Technologies)、抗 ATG14 抗体 (M184-3、MBL)、抗 HA-Tag 抗体 (M180-3、MBL)、抗 Keima 抗体 (M126-3、MBL)、および抗 Actin 抗体 (sc-8432、SantaCruz) を用いた。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体および HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いた。

### 5. ウェスタンブロット法

培養細胞は、1×プロテアーゼ阻害剤カクテルを含んだ RIPA Buffer (25 mM Tris-HCl [pH7.6], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) で回収後、数秒間超音波破碎し、30 分間氷上に置いたのち、14,000 rpm で 15 分遠心した。上清液を等量の 2× SDS サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl [pH6.8], 2% SDS, 6% β-mercaptoethanol, 10% glycerol) と混合し、95°Cで 5 分間加熱後、定法に従い SDS-PAGE とウェスタンブロットを行なった。

### 6. ミトファジーアッセイ

Mito-Keima を用いたミトファジーアッセイは、過去の論文に従いおこなった<sup>7,8,11</sup>。蛍光タンパク質 Keima は、pH により励起スペクトルが変化する。中性条件下では 440 nm 波長で主に励起され、酸性条件下では 586 nm 波長で主に励起される。ともに蛍光波長 620 nm で観察を行った (図 1 B)。MetaMorph 7 ソフトウェアを用いて、586 nm の波長で励起したときに観察されたドット構造の数を数えることで、ミトファジー活性を計測した。

## 結果

### Parkin 依存性ミトファジーの観察

HeLa 細胞では染色体異常により内在性 Parkin 遺伝子が失われており<sup>12,13</sup>、Parkin 依存的マイトファジーを誘導するには、Parkin を外来性に発現させる必要がある。本研究では、mito-Keima と HA-Parkin 発現 HeLa 細胞 (mtKeima/Parkin\_HeLa) を用い、10 $\mu$ M CCCP の 3~12 時間処理およびその対照実験として 3 時間の DMSO 処理を行った。DMSO 処理ではミトコンドリアを示す 440 nm 励起では典型的な管状のミトコンドリアが観察されたが、マイトファジーを示す 586 nm 励起ではほとんどシグナルは観察されなかった (図 3 A)。一方、CCCP 処理後は、わずか 3 時間でミトコンドリアが断片化し、マイトファジーを示す 586 nm 励起でシグナルが観察された (図 3 A)。6 時間、12 時間の CCCP 処理でも同様のシグナルが観察された (data not shown)。CCCP 処理で観察されるマイトファジーシグナルが、Parkin 依存的シグナルであるかどうかを検討するため、HA-Parkin 未発現 mtKeima\_HeLa 細胞、ならびに Parkin 依存的マイトファジーのアダプター因子 OPTN と NDP52 の二重破壊 mtKeima/Parkin\_HeLa 細胞株で 3 時間の CCCP 処理を行なったところ、マイトファジーシグナルはほぼ完全に消失した (図 3 B、C)。6 時間、12 時間でも同様にマイトファジーシグナルは消失した。以上の解析から、mtKeima/Parkin 発現 HeLa 細胞では、CCCP 処理後 3 時間でマイトファジーが検出可能であることが解った。

### CCCP 以外の刺激で誘導される Parkin 依存性マイトファジー

Parkin 依存的マイトファジーは、CCCP 以外に、oligomycin と antimycin A の併用処理 (O/A) や ivermectin 処理でも誘導される<sup>14</sup>。図 3 A に示すように、6 時間の O/A 処理でも mtKeima/Parkin 発現 HeLa 細胞では、マイトファジーが検出されることが明らかになった。また、O/A 処理で誘導されるマイトファジーも、CCCP 処理の場合と同様に、OPTN と NDP52 の二重破壊株 (図 3 B) や Parkin 未発現株 (図 3 C) では、ほぼ完全に抑制されていた。一方で、ivermectin 処理で誘導されるマイトファジーは、CCCP 処理や O/A 処理に比べて弱く、mtKeima 発現 HeLa 細胞を用いても、24 時間程度の処理が必要であった (図 3 A)。この ivermectin 処理によるマイトファジーは、Parkin 未発現株ではほぼ完全に抑制されたため、Parkin 依存的ではあるが (図 3 C)、OPTN と NDP52 の二重破壊株 (図 3 B) では完全には抑制されず、多少の誘導が認められた。

### Parkin 非依存的マイトファジーの観察

次に Parkin 非依存的マイトファジーの観察を検討した。鉄キレート剤 deferoxamine (DFO) 処理による鉄欠乏状態に mtKeima/Parkin\_HeLa 細胞をさらすと、マイトファジーシグナルが観察された (図 3 A) OPTN と NDP52 の二重破壊株 (図 3 B) や Parkin 未発現株 (図 3 C) でも、DFO 処理により同様にマイトファジーシグナルが観察されたことから、OPTN と NDP52 は Parkin 依存的マイトファジーに特異的な因子であることが確認された。

最後に HA-Parkin 未発現 mtKeima\_HeLa 細胞を用いて、Parkin 非依存的マイトファジーの観察を検討した。CCCP 処理や O/A 処理ではマイトファジーが誘導できなかったが、24 時間の低酸素処理や DFO 処理では、Parkin 非依存的にマイトファジーが誘導された (図 4 A)。ネガティブコントロールとして、オートファジーの必須因子である ATG14 や FIP200 破壊 mtKeima\_HeLa 細胞では、マイトファジーは完全に抑制された (図 4 B、C)。

## 考察

本研究では、pH 感受性蛍光タンパク質 Keima 発現 HeLa 細胞を用いて、Parkin 依存的・非依存的マイトファジーを観察し、その有用性を検討した。Parkin 依存的マイトファジーの観察では、Parkin 遺伝子を安定的に発現する Keima 発現 HeLa 細胞を用いて、CCCP 処理ならびに oligomycin/antimycin A 併用処理により誘導されるマイトファジーを観察した。その結果、CCCP 処理後 3 時間または O/A 処理後 6 時間という短い時間でマイトファジーを観察することができた。しかしながら同じ Parkin 依存的マイトファジーの誘導であっても、ivermectin 処理はマイトファジーの誘導には約 24 時間必要であった。従来、Parkin 依存的マイトファジーの検出には、12 時間や 24 時間といった長時間の CCCP 処理後、Tom20 などのミトコンドリアタンパク質の減少をウエスタンブロッティング等で定量する方法が取られてきた<sup>4</sup>。わずか 3 時間の CCCP 処理で誘導されるマイトファジーをも検出できる mito-Keima システムは、従来の方法に比べて大幅な感度の向上が見られた。

ivermectin 処理によるマイトファジーは、Parkin 未発現株ではほぼ完全に抑制されたが（図 3 C）、OPTN と NDP52 の二重破壊株（図 3 B）では少ないながら誘導が認められた。オートファジーのアダプター因子としては、OPTN と NDP52 以外に p62、NBR1、TAX1BP1 など複数報告されている<sup>15</sup>。そのなかで OPTN と NDP52 の 2 つが Parkin 依存的マイトファジーの過程で最も機能しているが、TAX1BP1 も小さいながらも有意にその過程に貢献していることが報告されている<sup>15</sup>。今回の ivermectin 処理の実験では、24 時間という処理時間中に TAX1BP1 が代償的に機能したのではないかと考えられる。

## 文献

1. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol.* 2018;20(5):521-527.
2. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol.* 2018;20(9):1013-1022.
3. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol.* 2018;28(4):R142-R143.
4. Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2011;286(22):19630-19640.
5. Kogure T, Karasawa S, Araki T, Saito K, Kinjo M, Miyawaki A. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol.* 2006;24(5):577-581.
6. Katayama H, Kogure T, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. *Chem Biol.* 2011;18(8):1042-1052.
7. Hirota Y, Yamashita S-I, Kurihara Y, et al. Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways. *Autophagy.* 2015;11(2):332-343.
8. Yamashita S-I, Jin X, Furukawa K, et al. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol.*

2016;215(5):649-665.

9. Akabane S, Matsuzaki K, Yamashita SI, et al. Constitutive activation of PINK1 protein leads to proteasome-mediated and non-apoptotic cell death independently of mitochondrial autophagy. *J Biol Chem*. 2016;291(31):16162-16174.
10. Chernyshova K, Inoue K, Yamashita S-I, Fukuchi T, Kanki T. Glaucoma-associated mutations in the optineurin gene have limited impact on Parkin-dependent mitophagy. *Revision Submitted*.
11. Yamashita S-I, Kanki T. Detection of iron depletion- and hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1782. ; 2018:315-324.
12. Denison SR, Wang F, Becker NA, et al. Alterations in the common fragile site gene Parkin in ovarian and other cancers. *Oncogene*. 2003;22(51):8370-8378.
13. Pawlyk AC, Giasson BI, Sampathu DM, et al. Novel Monoclonal Antibodies Demonstrate Biochemical Variation of Brain Parkin with Age. *J Biol Chem*. 2003;278(48):48120-48128.
14. Zachari M, Gudmundsson S., Li Z, et al. Selective autophagy of mitochondria on a ubiquitin-endoplasmic reticulum platform. *Submitted*. 2018.
15. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015;524(7565):309-314.

## 図の説明

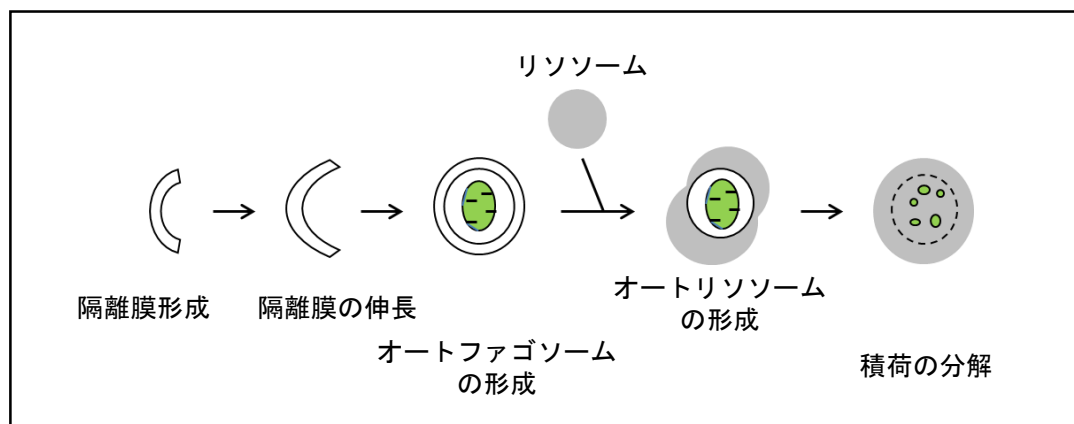
**図 1. pH 感受性蛍光タンパク質 Keima を利用したミトファジーモニタリング** (A) ミトファジーの概略. ミトファジーは、不要になったミトコンドリアを選択的にオートファゴソームに取り込み分解する。(B) mito-Keima システムの概略. 蛍光タンパク質 Keima は、pH により励起スペクトルが変化する。中性条件下では 440 nm 波長で励起され、酸性条件下では 586 nm 波長で励起される。

**図 2. ウェスタンブロット法による遺伝子破壊の確認** (A) OPTN/NDP52 二重破壊細胞における遺伝子欠損の確認。(B) FIP200 破壊細胞 (左) と ATG14 破壊細胞 (右) における遺伝子欠損の確認。

**図 3. mito-Keima シグナルの解析 1** (A-C) CCCP、oligomycin/antimycin A (O/ A)、DFO、ivermectin (IVE) 処理によるミトファジーシグナルの検出。(A) mito-Keima/Parkin 発現 HeLa 細胞、(B) OPTN/NDP52 二重破壊 mito-Keima/Parkin 発現 HeLa 細胞、(C) mito-Keima 発現 HeLa 細胞 (Parkin 未発現)。スケールバーは、10  $\mu$ m。

**図 4. mito-Keima シグナルの解析 2** (A-C) CCCP、oligomycin/antimycin A (O/ A)、低酸素処理によるミトファジーシグナルの検出。(A) mito-Keima 発現 HeLa 細胞、(B) FIP200 破壊 mito-Keima 発現 HeLa 細胞、(C) ATG14 破壊 mito-Keima 発現 HeLa 細胞。スケールバーは、10  $\mu$ m。

A



B

