

cAMP/PKA シグナル経路を介したミトコンドリア品質管理の制御と MICOS 複合体の関与

赤羽 しおり

障害が蓄積したミトコンドリアは、ユビキチンキナーゼ PINK1 とユビキチンリガーゼ Parkin の協同的な働きによりポリユビキチン鎖が付加され、選択的オートファジーを介して分解に導かれる。最近、PINK1 と Parkin の機能が細胞質の cAMP/PKA シグナル経路によって調節されていることが明らかになった。PKA はミトコンドリアタンパク質の MIC60 と MIC19 をリン酸化し、このリン酸化は PINK1 と Parkin の活性化を抑制することが示された。本稿では、この cAMP/PKA シグナル経路を介した制御に着目して、細胞内環境に応じたミトコンドリア品質管理の制御機構について紹介する。

1. 細胞内環境とミトコンドリア機能

ミトコンドリアは、生体内のエネルギー産生の大部分を担っている重要な細胞小器官（オルガネラ）である。ミトコンドリア内膜の電子伝達系を介してエネルギーとしての ATP を産生するが、電子伝達の過程において活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）が発生するため、ミトコンドリアは絶えず ROS による酸化ストレスにさらされている。このため、ミトコンドリアには ROS を除去するための抗酸化酵素が備わっており、酸化ストレスに適応してミトコンドリアの品質が維持されている。しかし、ROS の過剰発生や抗酸化能の低下により酸化ストレスに対して適応できなくなると、ミトコンドリアは ROS をさらに発生しやすくなり、他のミトコンドリアや細胞自体へ悪影響を及ぼす。このため細胞には、このような障害が蓄積したミトコンドリアをオルガネラごと分解し、細胞から除去する仕組みが備わっており、ミトコンドリア品質管理と呼ばれている。このミトコンドリア品質管理において、若年性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK1（PTEN-

induced putative kinase 1）と Parkin が関与しており、これまで複数のグループによる研究を通して、PINK1 と Parkin を介したミトコンドリアの選択的分解機構が明らかにされてきた¹⁾。

ミトコンドリアは、 α プロテオバクテリアが宿主細胞へ共生することによってでき上がったと考えられており、ミトコンドリアの獲得により真核生物は酸素を用いてエネルギー生産ができるようになった。一方で、ミトコンドリア自身も細胞に共生することで、その機能の多くを細胞に移行した。ヒトでは1500種以上あるミトコンドリアタンパク質の約99%は核ゲノムにコードされており、これらは細胞質の転写・翻訳系によって合成される。また、細胞質においてリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けることで、タンパク質の発現量や局在、機能が調節される。そのため、細胞内の環境はミトコンドリアの機能に大きな影響を及ぼしており、細胞環境に応じて機能を変化させることでミトコンドリアもさまざまな適応を示す。たとえば、ストレスにさらされた細胞のミトコンドリアでは、ROS の過剰生産に加えて、マトリックスにおける凝集タンパク質の蓄積やミトコンドリア DNA の損傷などさまざまな障害が生じるが、これに対してミトコンドリアストレス応答経路が働き、ミトコンドリア特有のシャペロンやプロテアーゼの発現が増加する²⁾。またミトコンドリアの形態も細胞環境に応じて変化し、通常はネットワーク構造をとるミトコンドリアは、ストレス環境下では断片化が進む³⁾。

細胞内の環境に応じてミトコンドリアの機能は大きく変化するため、ミトコンドリアの機能を理解するにあたり細

立教大学理学部生命理学科（〒171-8501 東京都豊島区西池袋 3-34-1）

Mitochondrial quality control regulated by cAMP/PKA signaling pathway through the MICOS complex

Shiori Akabane (Department of Life Science, Rikkyo University, 3-34-1 Nishiikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-8501, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940188

© 2022 公益社団法人日本生化学会

胞環境が与える影響を考慮することは非常に重要である。本稿では、ミトコンドリア品質管理が細胞内の環境に応じてどのように調節され適応しているのか、筆者らの研究を中心に最近の研究動向を踏まえて紹介する。

2. PINK1とParkinを介したミトコンドリア品質管理

1) 膜電位が維持されたミトコンドリアにおけるPINK1の分解

PINK1は、N末端側にミトコンドリア移行シグナルと膜貫通領域を持ち、C末端側にキナーゼドメインを持つセリン・トレオニンキナーゼである。細胞質で合成された後、PINK1のN末端側は、外膜と内膜の膜透過装置（TOM40複合体・TIM23複合体）を介してミトコンドリアマトリックスまで到達する。内膜のTIM23複合体を介したタンパク質輸送は内膜の膜電位とミトコンドリア移行シグナルによって駆動されており、PINK1についても同様に、膜電位とミトコンドリア移行シグナル依存的に内膜透過される。PINK1はC末端側を細胞質に残した状態でN末端側がマトリックスまで到達すると、マトリックスペプチダーゼのMPP（mitochondrial processing peptidase）によりN末端が切断され、さらに内膜プロテアーゼのPARLにより膜内切断を受ける。N末端側が切断されたPINK1は細胞質へと逆行輸送され、最終的にプロテアソームによって分解される。このため、膜電位が維持された正常なミトコンドリアでは、PINK1は常に分解を受けており、ミトコンドリア上でキナーゼ活性を発揮することはない（図1A）⁴⁾。

2) 障害ミトコンドリアにおけるPINK1とParkinの活性化 障害が蓄積しミトコンドリア内膜の膜電位が低下する

と、内膜のTIM23複合体によるタンパク質輸送が阻害される。このため、PINK1のN末端側はTOM40複合体を介して外膜を通過した後には内膜へ挿入されることができず、MPPやPARLによる切断も受けない。代わりにPINK1はミトコンドリア外膜上で二量体を形成して安定化し、TOM40複合体を含む巨大複合体を作る⁵⁾。複合体形成と同時に、PINK1は自己リン酸化によって活性型のPINK1となり、ミトコンドリア外膜上のユビキチンやParkinのユビキチン様ドメインをリン酸化する^{1,6,7)}。Parkinは通常は細胞質に蓄積しているが、ミトコンドリア外膜上のリン酸化ユビキチンとの親和性によりミトコンドリア外膜に移行し、同時にParkin自身もリン酸化されることで活性化する。活性型Parkinの働きによりミトコンドリア外膜上にポリユビキチン鎖が付加され、このポリユビキチン鎖が目印となってオートファジーによる分解が引き起こされる。この過程において、PINK1の蓄積によって生じるリン酸化ユビキチンの量は非常にわずかなのであるが、これに続くParkinの活性化やPINK1とParkinによるさらなるリン酸化ユビキチンの付加によって、Parkinのミトコンドリア移行とポリユビキチン鎖の付加はポジティブフィードバック効果で進行する（図1B）⁸⁾。

言い換えれば、PINK1がほんのわずかな量でも外膜上で活性化すれば、Parkinのミトコンドリアへの移行とオートファジーが引き起こされることになる。正常なミトコンドリアにおいて、ポリユビキチン鎖の付加によるポジティブフィードバック効果が誤って引き起こされることのないようにするためには、PINK1の活性化は厳密に制御されている必要があると考えられる。筋肉組織や神経細胞などエネルギーを多く消費する組織はミトコンドリアの機能に大きく依存しており、ミトコンドリアの膜電位は増減しや

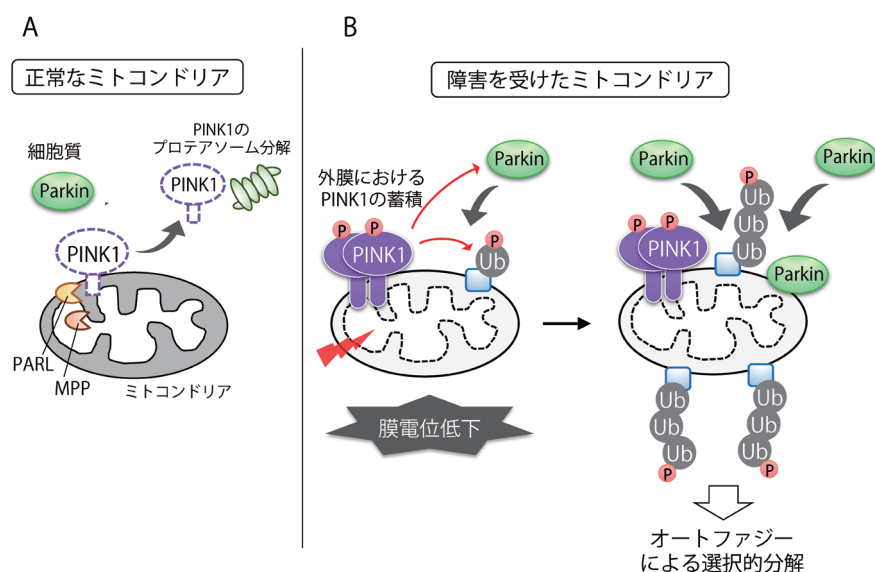


図1 PINK1とParkinを介したミトコンドリア品質管理機構

(A)膜電位が維持された正常なミトコンドリアではPINK1は常に分解されている。(B)障害を受けたミトコンドリアでは、PINK1とParkinが外膜上で活性化することで、オートファジーによる選択的分解が引き起こされる。Ub：ユビキチン，P：リン酸。

すい。こういった組織においてPINK1とParkinが容易に活性化してしまわないためには、PINK1の外膜上での活性化に対して、膜電位とは別の多くの調節機構が働いていると推測される。ミトコンドリア品質管理の制御機構については、いまだ不明な点が多く残っており、筆者らは、細胞内環境に着目してミトコンドリア品質管理の制御機構の解析を行った。

3. ミトコンドリア品質管理におけるcAMP/PKAシグナル経路の関与

1) フォルスコリンの処理はParkinのミトコンドリア移行を阻害する

緑色蛍光タンパク質融合Parkin (GFP-Parkin) を安定的に発現するHeLa細胞において、脱共役剤であるCCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) を処理するとミトコンドリア膜電位が低下し、GFP-Parkinがミトコンドリアに局在する。筆者らは、細胞内の情報伝達物質であるcAMPに着目して、アデニル酸シクラーゼのアゴニストであるフォルスコリンを用いて細胞内のcAMP濃度を上昇させた。その結果、フォルスコリンの処理によってGFP-Parkinのミトコンドリアへの移行が著しく阻害されることを見いだした (図2A)。このことは、細胞質におけるcAMP濃度が上昇すると、膜電位が低下してもParkinがミトコンドリアに移行できなくなることを示している。

2) PKAの活性化はParkinのミトコンドリア移行を阻害する

cAMP濃度の上昇は、細胞内のさまざまなシグナル伝達に関与するが、その主な機能としてPKA (protein kinase A) の活性化があげられる。これまで、障害を受けたミトコン

ドリアの選択的分解機構においてcAMP濃度の影響やPKAシグナル経路の関与は知られておらず、筆者らのグループは、ミトコンドリア品質管理機構におけるcAMP/PKAシグナル経路の関与について解析を進めた。フォルスコリンの処理によるParkinのミトコンドリア移行の阻害が、PKAの活性化に起因するものかどうかを確認するために、PKAの阻害剤であるH89をGFP-Parkinを発現するHeLa細胞に処理した。通常、低濃度5 μ Mで30分のCCCP処理では膜電位の低下が不十分なために、Parkinはミトコンドリアに局在することはできず、細胞質に蓄積する。これに対して、H89を処理するとParkinのミトコンドリアへの移行がみられ、PKAを阻害することによりParkinのミトコンドリア移行が促進されることがわかった。PKAは調節サブユニットと触媒サブユニットから構成されており、cAMP濃度の上昇に伴い触媒サブユニットが解離し活性化する。そこで、PKAの触媒サブユニットを細胞で過剰発現させると、膜電位が低下したミトコンドリアへParkinが移行できなくなった。これらの結果から、cAMP濃度の上昇に伴ってPKAが活性化すると、ミトコンドリア膜電位が低下してもParkinがミトコンドリアへ移行できなくなることがわかった。

3) cAMP/PKA経路の活性化はPINK1の安定性を低下させる

PINK1の外膜上での活性化についてcAMP/PKAシグナル経路の関与を調べるため、PINK1の発現量をウェスタンブロットによって解析した。CCCPの処理によってミトコンドリア膜電位を低下させると、PINK1は分解されずに外膜上に蓄積するため、ウェスタンブロットでPINK1が検出できる。これに対してフォルスコリンを処理した細胞では、外膜に蓄積するPINK1の量が減少していた。逆

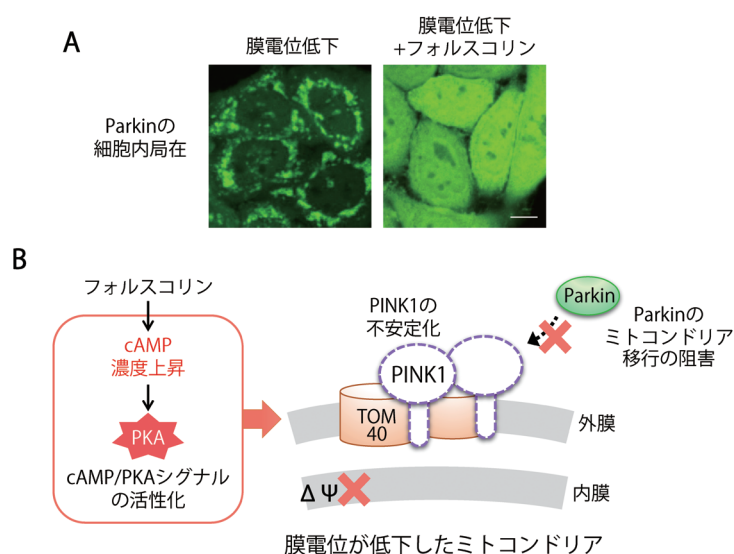


図2 cAMP/PKAシグナル経路の活性化によるPINK1とParkinの機能抑制

(A)フォルスコリン処理によりParkinのミトコンドリア移行が阻害される。スケールバー: 10 μ m. (B)フォルスコリン処理によるcAMP/PKAシグナル経路の活性化は、PINK1の安定性を低下させParkinのミトコンドリア移行を阻害する。

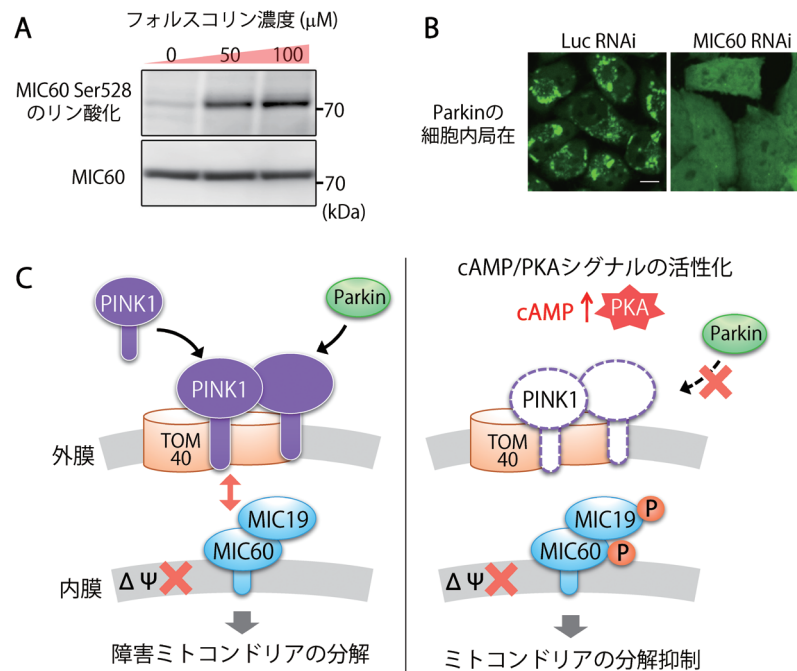


図3 MIC60/MIC19のリン酸化はミトコンドリア外膜上でのPINK1とParkinの活性化を抑制する

(A) フォルスコリンの処理によりMIC60の528番目のセリン残基がリン酸化される。(B) CCCP処理のもとで、luciferase (コントロール) の発現抑制ではParkinはミトコンドリアに移行する(左)。MIC60の発現抑制によりParkinのミトコンドリア移行が阻害される(右)。(C) 膜電位が低下したミトコンドリアにおいて、MIC60とMIC19は外膜上のPINK1の安定化を促進する(左)。cAMP/PKAシグナルの活性化によりMIC60とMIC19がリン酸化されるとPINK1の安定性が低下し、Parkinのミトコンドリア移行が阻害される(右)。

に、H89を処理するとPINK1の量が増加した。このことから、フォルスコリンの処理によりPKAが活性化すると、PINK1の外膜における安定性が低下し、外膜上で十分な量のPINK1が蓄積しないためにParkinがミトコンドリアに移行できなくなることが明らかになった(図2B)。

4. ミトコンドリア品質管理におけるMIC60とMIC19の役割

1) MIC60はPKAによりリン酸化される

これまで、cAMP/PKAシグナル経路を介したミトコンドリアの機能調節についてさまざまな報告がされている。内膜の呼吸鎖複合体サブユニットのNDUFS4はPKAによるリン酸化によってミトコンドリアへの輸送が制御されており⁹⁾、また、ミトコンドリア外膜のTOM70は、リン酸化を介してタンパク質の外膜透過機能を調節している¹⁰⁾。ミトコンドリアの分裂を担うDrp1は、PKAを介したリン酸化によりGTPase活性が制御されており、ミトコンドリア形態に影響を及ぼす¹¹⁾。ミトコンドリアに局在するAキナーゼアンカータンパク質(A-kinase anchoring protein: AKAP)の存在についても報告されており¹²⁾、ミトコンドリアタンパク質が効率的にPKAによるリン酸化を受けることがわかる。一方で、PKAによるリン酸化モチーフは保持しているがリン酸化の機能は未知の因子も多数存在する。また、ミトコンドリアマトリックス内のアデニル酸シクラーゼ活性の報告など、ミトコンドリア内でのPKA

によるリン酸化反応についても議論されており¹³⁾、cAMP/PKAシグナル経路を介したミトコンドリアの機能調節については、不明な点が多く残っている。

cAMP/PKA経路の活性化によってPINK1とParkinの機能が阻害されることから、筆者らは、ミトコンドリアタンパク質のPKAによるリン酸化がPINK1/Parkin経路の阻害につながるのではないかと推測した。そこで、PKAによるリン酸化修飾を受ける新規のミトコンドリアタンパク質を探索したところ、ミトコンドリア内膜タンパク質のMIC60にPKAによるリン酸化モチーフが保存されていた。MIC60はミトコンドリア内膜に局在するMICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system) 複合体の主要サブユニットであり、ミトコンドリア内膜のクリステ構造の維持に重要な役割を果たす^{14, 15)}。細胞内におけるMIC60のリン酸化について調べたところ、フォルスコリンの処理によってMIC60のリン酸化が検出された(図3A)。また、LC-MS解析により528番目のセリン残基のリン酸化を確認した。

2) MIC60はPINK1とParkinの活性化に重要である

これまで、ミトコンドリア外膜上で機能するPINK1やParkinの活性について、ミトコンドリア内膜因子の関与は知られておらず、MIC60についてもその主な機能はクリステ構造の維持であると考えられてきた¹⁴⁾。ミトコンドリア品質管理におけるMIC60の機能を調べるために、GFP-Parkinを発現するHeLa細胞において、MIC60の発現抑制

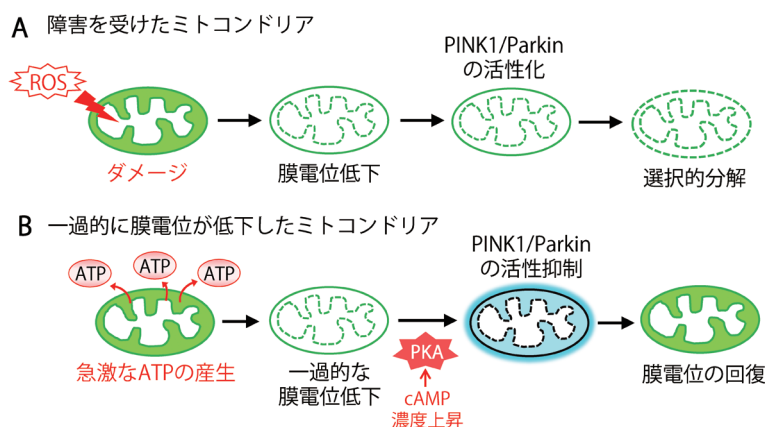


図4 cAMP/PKAシグナル経路を介したミトコンドリア品質管理の制御

(A)障害を受けたミトコンドリアは膜電位の低下をシグナルとして、PINK1とParkinにより選択的に分解される。
(B)一過的に膜電位が低下したミトコンドリアでは、cAMP/PKAシグナルの活性化によってPINK1とParkinの機能が抑制され、ミトコンドリアは分解されずに保護される。

を行ったところ、CCCP処理の下でもParkinはミトコンドリアに移行できず、細胞質に蓄積した(図3B)。また、ウェスタンブロットによりPINK1の安定性について調べると、CCCP処理下のPINK1の量はMIC60の発現抑制によって大きく減少していた。これらの結果は、膜電位が低下したミトコンドリアにおいてPINK1が蓄積する際にMIC60が必要であることを示しており、MIC60がPINK1とParkinを介したミトコンドリアの選択的分解に関与することが明らかになった。

3) MIC60のリン酸化はParkinのミトコンドリアへの移行を抑制する

上述したように、フォルスコリンの処理によってParkinのミトコンドリア移行が阻害されたが、これはMIC60のリン酸化を介して引き起こされるのではないかと推測した。そこで、MIC60のPKAによるリン酸化部位である528番目のセリン残基について、非リン酸化変異体(S528A)や擬似リン酸化変異体(S528D, S528E)を作製し、Parkinのミトコンドリア移行への影響を解析した。MIC60の欠損下では、Parkinはミトコンドリアへ移行できなくなるが、野生型のMIC60を発現させるとParkinのミトコンドリア移行が回復した。また非リン酸化変異体(S528A)を発現させると、野生型と同様にParkinのミトコンドリア移行がみられた。一方で、擬似リン酸化変異体(S528D, S528E)を発現させた場合にはParkinはミトコンドリアへ移行することはできず、細胞質に蓄積した。これらの結果は、Parkinのミトコンドリア移行にはMIC60が必要であり、MIC60がリン酸化されるとParkinがミトコンドリアに移行できなくなることを示している(図3C)。

4) MIC19もPINK1/Parkinの活性化に関与する

MICOS複合体のサブユニットの一つであるMIC19にもPKAによるリン酸化モチーフが報告されている^{16, 17)}。そこで筆者らもMIC19のリン酸化について調べたところ、

フォルスコリン処理により11番目のトレオニン残基のリン酸化が確認された。MIC60と同様、MIC19の機能はMICOS複合体のサブユニットとしての、クリステ構造の維持であると考えられており、PKAによるリン酸化の役割については不明であった。MIC19の発現抑制を行いParkinの細胞内局在について解析を行ったところ、MIC19の発現抑制の下では、Parkinのミトコンドリア移行が阻害され、細胞質に蓄積した。また、MIC19欠損下によるParkinのミトコンドリア移行の阻害は、野生型のMIC19の発現により回復したが、擬似リン酸化変異体(T11D, T11E)の発現では回復できなかった(図3C)。この結果は、MIC60に加えて、MIC19のPKAによるリン酸化もParkinの移行を制御していることを示している。

以上の結果から、MIC60とMIC19はミトコンドリア外膜におけるPINK1の蓄積に重要であり、MIC60やMIC19がPKAによってリン酸化されることで、PINK1の安定性が低下し、Parkinはミトコンドリアへ移行できなくなることが明らかになった(図3C)¹⁸⁾。このことは、MIC60とMIC19のPKAによるリン酸化はミトコンドリア品質管理を抑制することを示しており、言い換えれば、cAMP/PKAシグナルによるリン酸化は、膜電位が低下したミトコンドリアでも分解されることなく保護される方向に働くことを意味している(図4)。

5) MIC60やMIC19のリン酸化はいつ起きるのか

それでは、MIC60やMIC19はいつどのような生理的環境でPKAによるリン酸化を受けるのか、またそれは細胞機能に対してどんな意味を持つのか。この疑問に対して、筆者らはいくつかの知見を得ている。

神経細胞において、神経軸索でのミトコンドリア輸送は膜電位と相関関係があり、膜電位が維持されたミトコンドリアは細胞体からシナプスまで順行性に輸送され、逆に膜電位が低下したミトコンドリアはシナプスから細胞体まで逆行性に輸送される¹⁹⁾。また神経細胞におけるcAMP濃度

の上昇は、PKAの活性化を介して軸索伸長を促す²⁰⁾。神経細胞の機能においてミトコンドリアの膜電位やcAMP濃度が大きく関わっていることから、筆者らは、神経細胞でcAMP/PKAシグナルを介したミトコンドリア分解の制御が起きているのではないかと考えた。そこで、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yにおいてレチノイン酸を作用させ分化を誘導すると、レチノイン酸の処理時間に伴ってMIC60のリン酸化が検出された。

この結果は、神経細胞においてMIC60やMIC19がPKAによるリン酸化を受けることで膜電位が低下したミトコンドリアの選択的分解を抑制し、神経軸索におけるミトコンドリアの効率的な輸送に貢献している可能性を示している。

神経や筋肉組織ではミトコンドリアにおけるエネルギー生産が活発に行われており、ミトコンドリアの膜電位が大きく変化する¹⁹⁾。このような組織においてMIC60やMIC19がリン酸化されることで、一過的に膜電位が低下したミトコンドリアが分解されずに保護されている可能性が考えられる。MIC60やMIC19に加えて、ミトコンドリア品質管理に関与する新たなPKAの基質の存在も推測され、これらの因子が細胞内環境に応じてミトコンドリアの積極的な保護を行っているかもしれない。ミトコンドリア品質管理におけるPKAによるリン酸化の生理的意義の解明は、今後明らかにするべき重要な課題である。

5. MICOS複合体とミトコンドリア品質管理

1) MICOS複合体

ミトコンドリア内膜は内側に陥入してクリステ構造を形成することで、内膜の表面積を増加させており、電子伝達系を介した効率的なエネルギー生産が行われている。MICOS複合体は、内膜のクリステジャンクションに位置する高分子複合体であり、哺乳類ではMICOS複合体の八つのサブユニット（MIC10, MIC13, MIC14, MIC19, MIC23, MIC25, MIC27, MIC60）が同定されている（図5）^{14, 21, 22)}。MICOS複合体は、native PAGEによる解析において約700kDaの高分子複合体として検出されるが、この700kDaからなるMICOS複合体は二つのサブコンプレックスから構成されており、MIC60を中心とした約450kDaのコアコンプレックス（MIC60/MIC19/MIC25）と、MIC10を中心としたサブコンプレックス（MIC10/MIC13/MIC23/MIC27）に分けられる^{23, 24)}。

MIC60は、酵母からヒトまで広く保存されているサブユニットであり、N末端側に1回膜貫通領域を持つが、C末端側の大部分が膜間部に位置している。このC末端領域を介して、MIC60は外膜タンパク質のSAM複合体やTOM複合体と相互作用すると考えられている。MIC60を欠損させるとnative PAGEにおけるMICOS複合体のバンドは検出できなくなり、細胞においてはクリステ構造が消失しオニオン様の異常な内膜構造をとる²⁵⁾。また、MIC60は

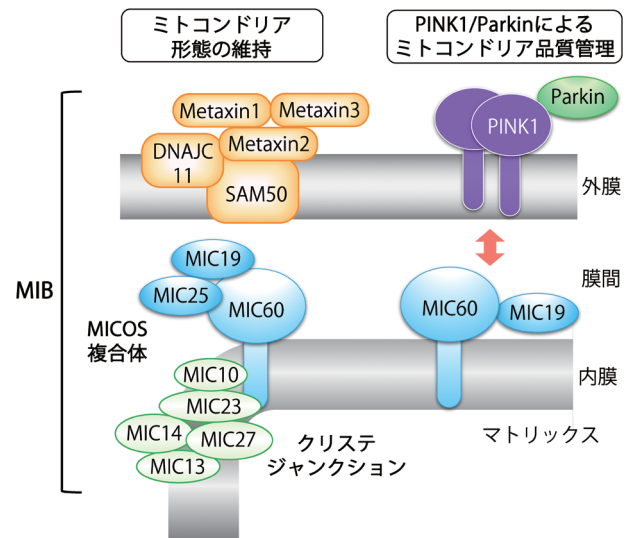


図5 ヒトMICOS複合体の概要とPINK1/Parkin経路への関与。MICOS複合体によるミトコンドリアクリステ形態の維持機能とは別に、MIC60とMIC19はPINK1/Parkin経路に関与する。

MICOS複合体のほぼすべてのサブユニットと相互作用しており、MIC60の欠損はすべてのサブユニットの発現量を著しく低下させることから、MIC60はMICOS複合体において中心的な役割を果たすと考えられている²⁴⁾。

MIC19は、膜貫通領域を持たず膜間部に局在するサブユニットであり、外膜のSAM50や内膜のMIC60と相互作用する。MIC60やMIC19の働きにより、MICOS複合体は常に外膜の因子（SAM50/Metaxin1/Metaxin2/Metaxin3/DNAJC11）と相互作用することで、2200~2800kDaに及ぶ巨大複合体のMIB complex（mitochondrial intermembrane bridging complex）を形成し、外膜と内膜を近接させている^{21, 26)}。

MIC60やMIC19とは異なり、MIC10はそのほとんどが膜貫通領域から構成されており、内膜に埋め込まれたトポロジーをとる。MIC10の過剰発現がクリステ構造の劇的な変化を引き起こすことや、*in vitro*におけるMIC10を加えた膜再構成実験などから、MIC10が多量体を形成することでクリステジャンクションにおけるカーブを引き起こすことがわかっており、MIC60に加えてMIC10も、MICOS複合体で中心的な働きをすることがわかってきた^{27, 28)}。

MICOS複合体は、クリステ形成に加えて、タンパク質輸送やカルジオリピンの生合成、ミトコンドリアDNA（mtDNA）の維持など、その機能は広範囲に及ぶ^{29, 30)}。最近、小胞体との近接部位でMICOS複合体の生合成が行われることや、その生合成にはERMES（ER-mitochondria encounter structure）複合体が必要なことなどが報告されており、MICOS複合体の外膜や細胞質との関係性について着目されつつある²³⁾。

2) ミトコンドリア品質管理におけるMICOS複合体の役割

上述したように、MIC60とMIC19がPINK1とParkinの機能において重要な役割を果たすことがわかったが、ミトコンドリア品質管理におけるMICOS複合体の役割はこれ

まで知られていなかった。そこで筆者らは、MICOS複合体の他のサブユニットについても、ミトコンドリア品質管理における機能を検討した。予想外の結果に、MIC10, MIC23, MIC25, MIC27の発現抑制はParkinのミトコンドリアへの移行に影響を及ぼさず、Parkinはミトコンドリアに局在し、PINK1/Parkin経路に関与しないことがわかった。クリステジャンクションの形成に必須のMIC10でさえParkinの移行に関与しないという結果から、MICOS複合体を介したミトコンドリア形態維持とはまったく別の経路で、MIC60とMIC19は単独にPINK1の機能に関わっていることが示唆される。これと一致して、MIC60の擬似リン酸化変異体(S528D, S528E)を発現した細胞では、クリステ構造が維持されており、MIC60のSer528のリン酸化は、ミトコンドリアクリステ形態に影響を及ぼさないことがわかった。さらに、フォスコリンを処理した細胞でもクリステ構造は維持されていた。これらの結果から、ミトコンドリア品質管理におけるMIC60とMIC19の機能は、MICOS複合体によるクリステ構造の維持とは別の、MIC60とMIC19固有の機能であると考えられる(図5)。

6. おわりに

これまで、障害ミトコンドリアの選択的分解はミトコンドリア膜電位の低下がシグナルとなって引き起こされると考えられており、膜電位の低下に伴うPINK1とParkinの機能解析が行われてきた。一方で、ミトコンドリアの機能は細胞内環境に大きく依存していることから、膜電位の低下に加えて、ミトコンドリア品質管理は細胞側からもさまざまな調節を受けると考えられる。本稿で述べたように、ミトコンドリア品質管理が細胞質のcAMP/PKAシグナル経路によって制御されていることが示され、膜電位が低下したミトコンドリアでも積極的に保護される機構が明らかになった。cAMP/PKAシグナル経路に加えて、他にもさまざまな細胞側からの制御機構の存在が推測され、ミトコンドリア品質管理における細胞内環境を介した制御機構の解明について、今後さらなる研究を推進したい。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、立教大学理学部生命理学科において岡敏彦教授のご指導の下で進めてきたものです。ここに深く感謝いたします。また宇野碧大学院生をはじめ研究室のすべての方のサポートによりなしたことであり、厚く御礼申し上げます。

文 献

- Narendra, D.P. & Youle, R.J. (2011) Targeting mitochondrial dysfunction: Role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control. *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 1929–1938.
- Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I.V., Stasinopoulos, S., Ryan, M.T., & Hoogenraad, N.J. (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.*, **21**, 4411–4419.
- Shin, C.S., Meng, S., Garbis, S.D., Moradian, A., Taylor, R.W., Sweredoski, M.J., Lomenick, B., & Chan, D.C. (2021) LONP1 and mtHSP70 cooperate to promote mitochondrial protein folding. *Nat. Commun.*, **12**, 265.
- Yamano, K. & Youle, R.J. (2013) PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy*, **9**, 1758–1769.
- Okatsu, K., Uno, M., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2013) A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J. Biol. Chem.*, **288**, 36372–36384.
- Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., et al. (2012) PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat. Commun.*, **3**, 1016.
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., et al. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, **510**, 162–166.
- Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2015) Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *J. Cell Biol.*, **209**, 111–128.
- De Rasmo, D., Panelli, D., Sardanelli, A.M., & Papa, S. (2008) cAMP-dependent protein kinase regulates the mitochondrial import of the nuclear encoded NDUFS4 subunit of complex I. *Cell. Signal.*, **20**, 989–997.
- Schmidt, O., Harbauer, A.B., Rao, S., Eyrich, B., Zahedi, R.P., Stojanovski, D., Schönfisch, B., Guiard, B., Sickmann, A., Pfanner, N., et al. (2011) Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell*, **144**, 227–239.
- Chang, C.R. & Blackstone, C. (2007) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.*, **282**, 21583–21587.
- Means, C.K., Lygren, B., Langeberg, L.K., Jain, A., Dixon, R.E., Vega, A.L., Gold, M.G., Petrosyan, S., Taylor, S.S., Murphy, A.N., et al. (2011) An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, E1227–E1235.
- Valsecchi, F., Konrad, C., & Manfredi, G. (2014) Role of soluble adenylyl cyclase in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1842**, 2555–2560.
- Zerbes, R.M., van der Klei, I.J., Veenhuis, M., Pfanner, N., van der Laan, M., & Bohnert, M. (2012) Mitofilin complexes: Conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol. Chem.*, **393**, 1247–1261.
- Tarasenko, D., Barbot, M., Jans, D.C., Kroppen, B., Sadowski, B., Heim, G., Möbius, W., Jakobs, S., & Meinecke, M. (2017) The MICOS component Mic60 displays a conserved membrane-bending activity that is necessary for normal cristae morphology. *J. Cell Biol.*, **216**, 889–899.
- Schauble, S., King, C.C., Darshi, M., Koller, A., Shah, K., & Taylor, S.S. (2007) Identification of ChChd3 as a novel substrate of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) using an analog-sensitive catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, **282**, 14952–14959.
- Darshi, M., Mendiola, V.L., Mackey, M.R., Murphy, A.N., Koller, A., Perkins, G.A., Ellisman, M.H., & Taylor, S.S. (2011) ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J. Biol. Chem.*, **286**, 2918–2932.
- Akabane, S., Uno, M., Tani, N., Shimazaki, S., Ebara, N., Kato, H., Kosako, H., & Oka, T. (2016) PKA regulates PINK1 stabil-

- ity and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60. *Mol. Cell*, **62**, 371–384.
- 19) Miller, K.E. & Sheetz, M.P. (2004) Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J. Cell Sci.*, **117**, 2791–2804.
 - 20) Aglah, C., Gordon, T., & Posse de Chaves, E.I. (2008) cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of Erk activation in cultured rat motoneurons. *Neuropharmacology*, **55**, 8–17.
 - 21) Kozjak-Pavlovic, V. (2017) The MICOS complex of human mitochondria. *Cell Tissue Res.*, **367**, 83–93.
 - 22) Pfanner, N., van der Laan, M., Amati, P., Capaldi, R.A., Caudy, A.A., Chacinska, A., Darshi, M., Deckers, M., Hoppins, S., Icho, T., et al. (2014) Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J. Cell Biol.*, **204**, 1083–1086.
 - 23) Tirrell, P.S., Nguyen, K.N., Luby-Phelps, K., & Friedman, J.R. (2020) MICOS subcomplexes assemble independently on the mitochondrial inner membrane in proximity to ER contact sites. *J. Cell Biol.*, **219**, e202003024.
 - 24) Ott, C., Dorsch, E., Fraunholz, M., Straub, S., & Kozjak-Pavlovic, V. (2015) Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits. *PLoS One*, **10**, e0120213.
 - 25) John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M., Rangell, L., Bennett, M.J., & Zha, J. (2005) The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 1543–1554.
 - 26) Huynen, M.A., Muhlmeister, M., Gotthardt, K., Guerrero-Castillo, S., & Brandt, U. (2016) Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 91–101.
 - 27) Bohnert, M., Zerbes, R.M., Davies, K.M., Mühleip, A.W., Rampelt, H., Horvath, S.E., Boenke, T., Kram, A., Perschil, I., Veenhuis, M., et al. (2015) Central role of Mic10 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Cell Metab.*, **21**, 747–755.
 - 28) Milenkovic, D. & Larsson, N.G. (2015) Mic10 oligomerization pinches off mitochondrial cristae. *Cell Metab.*, **21**, 660–661.
 - 29) Kondadi, A.K., Anand, R., & Reichert, A.S. (2020) Cristae membrane dynamics—A paradigm change. *Trends Cell Biol.*, **30**, 923–936.
 - 30) Li, H., Ruan, Y., Zhang, K., Jian, F., Hu, C., Miao, L., Gong, L., Sun, L., Zhang, X., Chen, S., et al. (2016) Mic60/Mitofilin determines MICOS assembly essential for mitochondrial dynamics and mtDNA nucleoid organization. *Cell Death Differ.*, **23**, 380–392.

著者寸描

●赤羽 しおり (あかばね しおり)

立教大学理学部生命理学科助教。博士 (生命科学)。

■略歴 2014年東京大学大学院新領域創成科学研究科博士課程修了。同年立教大学理学部生命理学科博士研究員。17年同大学助教。22年より京都産業大学生命科学部研究員。

■研究テーマと抱負 細胞環境に応じたミトコンドリア品質管理の制御機構。細胞レベルでのミトコンドリア機能研究を通じて、生命の仕組みについて理解したい。

■ウェブサイト https://www2.rikkyo.ac.jp/web/oka_lab/index.html

■趣味 ピアノ、旅行、息子達とピクニック。