

## 老化性疾患におけるミトコンドリアとリソソームのクロストーク

八木 美佳子, 内海 健

### 1. はじめに

ミトコンドリアは独自のDNAを有し、酸化リン酸化 (OXPHOS) によってATPを産生するオルガネラである。分裂と融合 (fission and fusion) を繰り返し損傷したミトコンドリアを排除することで機能維持と考えられている。このようなミトコンドリア品質管理機構として、損傷ミトコンドリアを選択的にオートファジーにより分解し細胞内恒常性を保つマイトファジーも知られている。さらにアポトーシス、カルシウム貯蔵、ERストレス応答、免疫応答、などさまざまな細胞内応答の制御に関わるため、ミトコンドリア機能障害が疾患の原因となる場合も多い。実際、ミトコンドリア病の病態解明を複雑にしているのはミトコンドリア自身の障害だけでなく、他のオルガネラとのクロストークの破綻も病因となるためである。特にミトコンドリア機能障害は、転写因子を介した多彩な遺伝子発現を抑制しリソソーム機能低下も誘発する (図1)。つまりミトコンドリア病においてもリソソームとのクロストークの破綻が病因となることが示唆されている。本稿ではミトコンドリア障害がどのようにリソソーム障害を引き起こすのか、特にNAD<sup>+</sup>を介した新しい機構について述べる<sup>1)</sup>。

### 2. ミトコンドリアと病態

#### 1) ミトコンドリア病

ミトコンドリア病は遺伝性疾患であり、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の変異、欠失が最も一般的な原因である。mtDNAは細胞あたり数十から数千コピーあり通常はホモプラスミー (homoplasmy) であるが、老化とともに変異型mtDNAが混在するヘテロプラスミー (heteroplasmy) と

なり両者が共存していく。一般にヘテロプラスミーが70~80%を超えると症状を呈し、変異率は個人や臓器ごとに異なるためにミトコンドリア病は多様性に富んでいる。また、ミトコンドリアタンパク質の多くは核コードであり、これら遺伝子もミトコンドリア病の病因となる。そのためミトコンドリア病の症状は多岐にわたり、疾患の分子メカニズムは複雑であり治療をより困難なものにしている。

#### 2) 治療方法の現状

ミトコンドリア病の多くはOXPHOS活性の低下を呈すると考えられているため、補充療法としてコエンザイムQ10、カルニチン、クレアチン、ジクロロアセテート、ビタミン、が投与されているがどれも効果的とはいえないのが現状である。

### 3. リソソーム病と病態

#### 1) リソソーム蓄積症

リソソーム蓄積症 (lysosomal storage disease) はリソソーム機能障害を引き起こす遺伝性疾患が大部分を占める (ムコ多糖症、ボンベ病、ゴーシェ病、ファブリー病、ニーマンピック病、神経セロイドリポフスチン症)<sup>2)</sup>。主な原因は、リソソーム酵素の機能障害、リソソームタンパク質の異常などで、リソソーム内に異常高分子が蓄積し輸送障害や細胞損傷を引き起こし症状を呈する。リソソームは高分子の分解、アミノ酸リサイクル、シグナル応答の重要なハブであり、異種オルガネラとも相互作用するため疾患の病因は複雑であり完全に理解するのは難しい。さらにリソソームはオートファジーによる分解過程の最終段階に関与し細胞生存には不可欠である。

#### 2) リソソーム病とパーキンソン病

リソソーム病は多くの疾患に関与するが、特に進行性の神経性疾患が多い。その中でも異常タンパク質の蓄積が病因となるパーキンソン病はリソソーム分解異常と関連する報告が多数ある。さらにリソソームタンパク質をコードする遺伝子変異glucocerebrosidase (GBA) とlysosomal type 5 P-type ATPase (ATP13A2) がパーキンソン病のリスク因子として同定されている<sup>3)</sup>。

このGBAをコードする遺伝子変異は、最も一般的な

九州大学大学院医学研究院保健学部門 (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

Mitochondrial and lysosomal crosstalk in aging diseases

Mikako Yagi and Takeshi Uchiyumi (Department of Health Sciences Graduate School of Medical Sciences Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940882

© 2022 公益社団法人日本生化学会

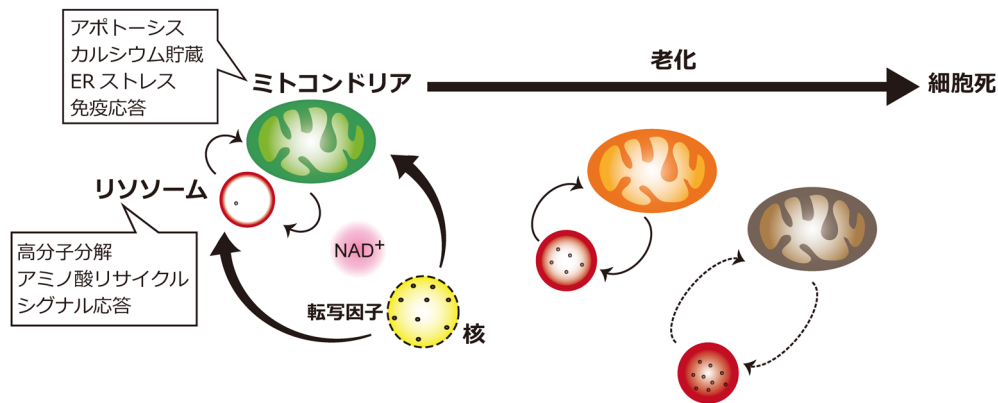


図1 ミトコンドリアとリソソームの関連性

ミトコンドリアとリソソームは核からの転写因子によって制御され相互作用し、NAD<sup>+</sup>を介して細胞内恒常性を保つ。しかし、老化とともにミトコンドリア機能が低下するとリソソームとの機能連関が破綻し、細胞死へとつながる。

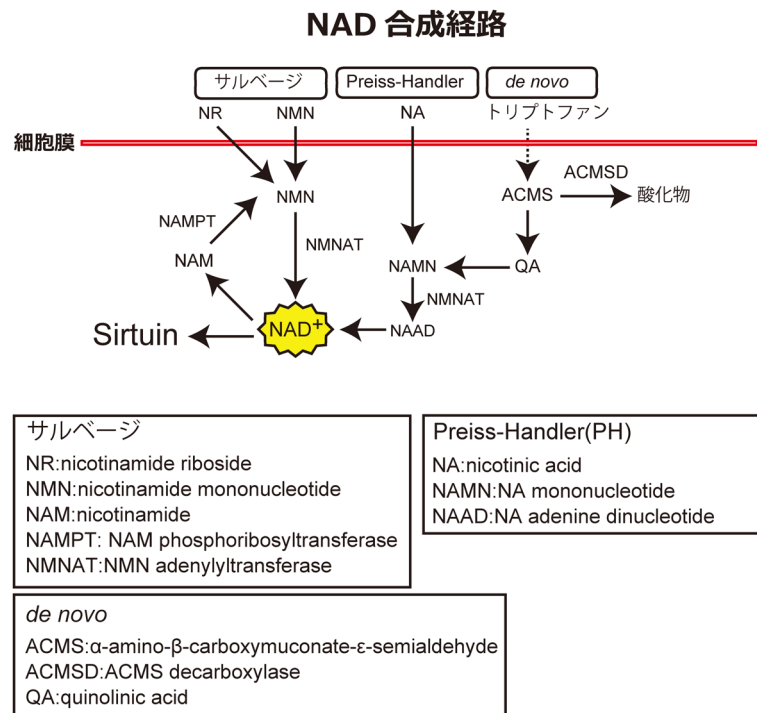


図2 NAD合成経路

NAD合成にはサルベージ、PH、de novoの3経路がある。ACMSDを阻害、またはNR、NMN、NAMは添加することで低下したNAD<sup>+</sup>を補う機能がある。

リソソーム障害であるゴーシェ病を引き起こす。一方、ATP13A2は、リソソーム活性に必要なATPaseをコードしているが、ATP13A2の遺伝子変異によってリソソームによる分解能が低下し $\alpha$ -シヌクレインが蓄積する。またマイトファジー障害が発生しミトコンドリア機能低下の原因となる報告もあり、リソソーム障害は老化に伴う神経変性疾患の重要な病因となりうる。Bafilomycin Aでリソソーム機能を低下させるとミトコンドリア障害を誘発するとの報告もあり、ミトコンドリアとリソソームの機能連関は疾患の重要な分子機構となりうる。

#### 4. NAD<sup>+</sup>について

NAD<sup>+</sup>(ニコチンアミドモノヌクレオチド)はSirtuin(脱アセチル化酵素)とともに転写調節、エネルギー代謝、DNA修復、炎症反応、など細胞生存に必須な経路に深く関わっていて、老化とともに減少することが知られている。NAD<sup>+</sup>は、動脈硬化症、内皮機能障害、心筋症、不整脈、高血圧、メタボリックシンドローム、肝臓病、糖尿病、および脂質異常症などの老化とともに発症するさまざまな疾患に関係している報告がある。したがって、老化性

疾患の治療戦略としてNAD<sup>+</sup>レベルを上げSirtuinを活性化し細胞内代謝物を増やす方法や、老化抑制方向に働く因子がターゲットになると考えられている<sup>4)</sup>。この治療戦略において重要なのがミトコンドリアである。NAD<sup>+</sup>上昇時には、多くの場合ミトコンドリア機能の上昇が確認されている。つまりミトコンドリア機能の向上が老化性疾患の鍵になると考えられるが詳細な分子機構は不明である。NAD<sup>+</sup>は直接添加しても細胞膜を通らないため、NAD<sup>+</sup>を合成するサルベージ経路や*de novo*経路に関与するさまざまな基質を添加する研究が行われている(図2)。この場合、投与しても消化されずNAD<sup>+</sup>まで代謝されることが重要となる。

## 5. NAD<sup>+</sup>を介した治療戦略

### 1) *de novo*経路

*de novo*経路ではアミノ酸であるトリプトファンからNAD<sup>+</sup>を合成する。その経路の分岐点にあたる $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -カルボキシムコン酸- $\epsilon$ -セミアルデヒドデカルボキシラーゼ(ACMSD)(図2)を阻害するとNAD<sup>+</sup>量が増加しミトコンドリア呼吸鎖活性が増加した<sup>5)</sup>。また、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)モデルマウスではACMSD阻害剤の経口投与によって、NAD<sup>+</sup>増加、ROS減少、 $\beta$ 酸化改善、炎症反応改善、ミトコンドリア機能改善、などの改善傾向があった。

### 2) サルベージ経路

サルベージ経路のNR(nicotinamide riboside)(図2)を利用して病態改善を図る報告がある。このNRは食品にも含まれるため副作用は少ないとされている。NR添加によってNAD<sup>+</sup>レベルが上昇、Sirtuinが活性化しミトコンドリア機能も改善され加齢に伴う代謝変化が改善された。マウスを用いたNR経口投与実験により、エネルギー消費量が増加し脂肪量減少、そしてインスリン抵抗性を改善し糖尿病改善効果がみられた<sup>6)</sup>。

以上のように老化に伴う疾患においてはNAD<sup>+</sup>を上昇させる治療法は効果があるとの報告がみとめられるが、詳細な分子機序については解明されていない。

## 6. ミトコンドリア病マウスモデルとNAD<sup>+</sup>

脳特異的Ndufs4ノックアウトマウスはミトコンドリア病の病型であるリー脳症モデルマウスとして研究されている<sup>7)</sup>。Ndufs4はミトコンドリア呼吸鎖複合体complex I構成因子の一つであるため、このモデルマウスではcomplex I活性低下により細胞内NAD<sup>+</sup>レベルが減少する。その治療としてNAD<sup>+</sup>前駆体であるNMN(nicotinamide mononucleotide)を腹腔内注射により投与すると乳酸アシドーシ

スを改善し寿命が約2倍延びた。脳での病態改善効果は確認されたが、NMN投与しても脳内NAD<sup>+</sup>量は改善しなかった。その代わり心臓や肝臓のNAD<sup>+</sup>レベルは上昇したため、NMNは末梢組織に影響を及ぼし、脳機能を改善したと考えられる。また、リー脳症モデルマウスの脳で転写因子HIF1 $\alpha$ が上昇しているのも特徴の一つであり、解糖系酵素の働きを抑制する原因と考えられているが、HIF1 $\alpha$ とNAD<sup>+</sup>合成の直接的な関係性については言及されていない。ミトコンドリア病由来ではないが、中大脳動脈閉塞モデルマウスの脳機能をNMNが改善するという報告もある<sup>8)</sup>。これらの報告よりNMNは治療方法として効果的かもしれないが、その詳細な分子機序は解明されていない。

## 7. ミトコンドリアとリソソームの機能関連

### 1) ミトコンドリアとリソソームの接合

ミトコンドリアはさまざまなオルガネラとクロストークし細胞内ストレス応答を制御している。ミトコンドリアとERの接合はMAM(mitochondria-associated membrane)としてよく知られている。最近注目されているのはミトコンドリアとリソソーム間のクロストークである。酵母においてはミトコンドリアとリソソーム間に接合点(vCLAMP: vacuole and mitochondria patch)が存在し、アミノ酸や脂質の貯蔵と輸送に関与する。またメラノサイトのメラノソーム(リソソーム関連オルガネラ)とミトコンドリアの接合も確認されており、メラノソームの生合成と成熟にはミトコンドリアATPが必要である<sup>9)</sup>。さらにリソソームは鉄やカルシウムなどのイオンを貯蔵しており、ミトコンドリアと接合することで細胞内濃度を調節している<sup>10)</sup>。このように、ミトコンドリアとリソソームの間の接触部位が特定され、ミトコンドリアのダイナミクスを調節することもわかってきている。したがってミトコンドリアとリソソームの接合は細胞内恒常性を維持するために重要である。

### 2) ミトコンドリアとリソソームの機能相関

老化に伴いミトコンドリアは巨大化し分裂融合が障害を受け活性酸素が増えると考えられている。リソソームは老化とともに分解能が低下しリポフスチン(lipofuscin)という自家蛍光を発する消化不能物質が蓄積する。不良ミトコンドリアはマイトファジーによって排除されるが老化とともに分解されにくくなるのは、ミトコンドリアとリソソームの機能低下が一因である。ミトコンドリアがマイトファジーを制御する機構や、ミトコンドリアがオートファゴソーム膜形成を調節している報告もある<sup>11)</sup>。AMPK(AMP-dependent protein kinase)は細胞内エネルギーや代謝の調整に関与する経路として知られているが、ミトコンドリアとリソソームの相互作用も調節している<sup>12)</sup>。したがってミ

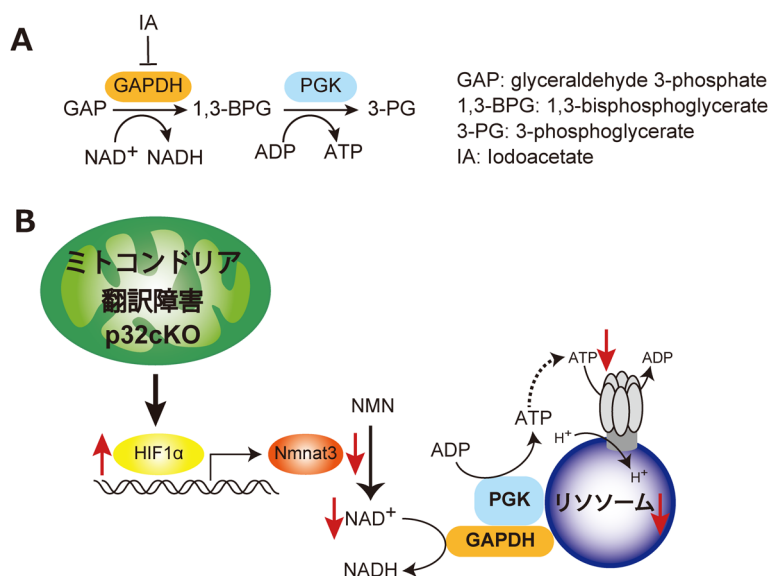


図3 ミトコンドリアとリソソームとNAD<sup>+</sup>の関係性

(A)抽出したリソソーム画分にGAP, NAD<sup>+</sup>, ADPを添加するとATPが産生された。この反応はGAPDH阻害剤(IA)を加えると抑制された。リソソーム近傍に解糖系酵素であるGAPDHとPGKが局在しリソソーム活性に必須なATPを産生できる。(B)ミトコンドリア翻訳障害(p32cKO)によって転写因子HIF1αがNmnat3発現を減少させたため細胞内NAD<sup>+</sup>量が減少した。リソソーム近傍では、NAD<sup>+</sup>の供給が減少しGAPDHとPGKを介したATP産生量が減少しリソソーム機能が低下した。

トコンドリアとリソソーム間のクロストークは老化とともに機能低下し細胞生存が難しくなり細胞死を誘導する(図1)。

## 8. ミトコンドリア病モデルマウスにおけるリソソーム機能解析

### 1) TFAMノックアウトマウスにおけるリソソーム機能

実際にミトコンドリア病モデルマウスにおいてもリソソーム機能低下の報告がある。TFAM (mitochondria transcription factor A) はミトコンドリアDNAに結合し構造維持や転写促進に必須なタンパク質である。CD4<sup>+</sup> Tリンパ球においてTFAM欠損させたミトコンドリア病モデルマウスではミトコンドリア機能障害とともに、リソソーム機能低下も引き起こしていた<sup>13)</sup>。その分子機序は、ミトコンドリア呼吸鎖活性complex Iが減少するためミトコンドリア内のNADHがNAD<sup>+</sup>に変換されず細胞質内のNAD<sup>+</sup>レベルが減少しリソソーム機能が低下するというものであった。結果としてTFAM欠損T細胞のリソソーム機能障害は、T細胞の分化を抑制し炎症反応を悪化させた。そこでNAM (nicotinamide) 添加によってNAD<sup>+</sup>レベルを回復させると、リソソーム機能が改善しTFAM欠損T細胞の炎症性欠陥も改善した。このようにミトコンドリア機能障害により発生するリソソーム機能障害にはNAD<sup>+</sup>が関与しNAMによって改善されたが、リソソームとNAD<sup>+</sup>の関係性は不明

なままであった。

### 2) p32ノックアウトマウスにおけるNAD<sup>+</sup>とリソソームの機能連関

ミトコンドリア翻訳調節タンパク質であるp32の心筋特異的ノックアウトマウス(p32cKO)解析からNAD<sup>+</sup>レベル低下とリソソーム機能低下を見いだした。まずNAD<sup>+</sup>低下の原因はサルベージ経路のNAD<sup>+</sup>合成酵素であるNmnat3の発現低下であった。Nmnat酵素には、アイソザイムNmnat1~3まで存在する。Nmnat1は核、Nmnat2はサイトゾル、Nmnat3はミトコンドリアに局在するというのが一般的であった。しかし心臓組織においてNmnat3の局在を確認するとミトコンドリアとサイトゾルの両方に発現していた。Nmnat3にはスプライシングバリエーションが存在し、サイトゾルでも発現可能であった<sup>14)</sup>。サイトゾルでのNmnat3発現低下の理由は転写因子HIF1αの発現上昇にあった。実際にp32cKO心臓でもHIF1αの発現は上昇していて、培養細胞を用いてHIF1αとNmnat3の遺伝子発現が相関していることも確認した。Nmnat3について、ミトコンドリア発現型とサイトゾル発現型を作製すると、サイトゾル発現型Nmnat3のみリソソーム活性が増加した。サイトゾルでのNmnat3発現上昇によってNAD<sup>+</sup>レベルが上昇しリソソーム機能が向上したため、NAD<sup>+</sup>合成量とリソソーム機能は相関性があることがわかった。では、NAD<sup>+</sup>はリソソーム機能にどのように関与するのか検証した結



果、リソソーム膜近傍にGAPDHとPGKが局在しリソソーム活性に必須なATPを産生していることを証明した。まず、組織よりリソソームを分画しGAPDHとPGKが共局在することを確認した。両酵素は高塩濃度環境にするとリソソーム膜から解離したためイオン結合により強く結合することが示唆された。さらに抽出したリソソーム画分にGAPDHの基質であるGAPを加えると、 $\text{NAD}^+$ からATPを産生するGAPDHとPGKが媒介する酵素反応が行われた(図3A)。したがってリソソーム膜近傍では $\text{NAD}^+$ からATPを産生する経路を解糖系酵素であるGAPDHとPGKが媒介していることがわかった(図3B)。我々は必要に応じて局所的にリソソーム膜近傍に酵素が集結しATPを効率よく産生しリソソーム機能を維持するシステムがあると考えている。解糖系酵素は細胞内に多く存在し、必要に応じて必要なとき、必要な場所に集結し酵素反応を行うことで効率よくエネルギー産生を行うのだろう。実際、神経軸索上での小胞輸送には早急にエネルギーを供給する必要があるため神経終末ベジクル近傍に解糖系酵素であるGAPDHとPGKが局在しATPを産生するという報告がある<sup>15)</sup>。

## 9. おわりに

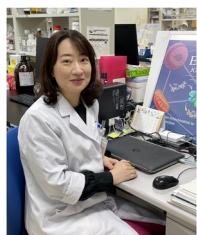
細胞内オルガネラは互いに相互作用し合うことで細胞内恒常性を保っているが、老化に伴いその相互作用は低下し恒常性を維持できなくなっていく。そのため老化性疾患の病因は単一のオルガネラとは限らず、複雑かつ多様性を秘めている。したがって根本的な原因の解決は困難であるため、ある特定のタンパク質をターゲットとするような従来の方法とは異なるアプローチが必要となる。老化とともに減少する $\text{NAD}^+$ 量を補うことはミトコンドリアとリソソームのオルガネラ間機能連携を向上させる可能性があり、今後の治療戦略として期待できると考えている。

## 文 献

- 1) Yagi, M., Toshima, T., Amamoto, R., Do, Y., Hirai, H., Setoyama, D., Kang, D., & Uchiyama, T. (2021) Mitochondrial translation deficiency impairs  $\text{NAD}^+$ -mediated lysosomal acidification. *EMBO J.*, **40**, e105268.
- 2) Sun, A. (2018) Lysosomal storage disease overview. *Ann. Transl. Med.*, **6**, 476.
- 3) Dehay, B., Martinez-Vicente, M., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A., Yue, Z., Cookson, M.R., Klein, C., Vila, M., & Bezdard, E. (2013) Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, **28**, 725–732.
- 4) Kane, A.E. & Sinclair, D.A. (2018) Sirtuins and  $\text{NAD}^+$  in the development and treatment of metabolic and cardiovascular diseases. *Circ. Res.*, **123**, 868–885.
- 5) Katsyuba, E., Mottis, A., Zietak, M., De Franco, F., van der Velpen, V., Gariani, K., Ryu, D., Cialabrini, L., Matilainen, O., Liscio, P., et al. (2018) De novo  $\text{NAD}^+$  synthesis enhances mitochondrial function and improves health. *Nature*, **563**, 354–359.
- 6) Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P.A., Cettour-Rose, P., et al. (2012) The  $\text{NAD}^+$  precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.*, **15**, 838–847.
- 7) Lee, C.F., Caudal, A., Abell, L., Nagana Gowda, G., & Tian, R. (2019) Targeting  $\text{NAD}^+$  metabolism as interventions for mitochondrial disease. *Sci. Rep.*, **9**, 3073.
- 8) Wei, C.C., Kong, Y.Y., Hua, X., Li, G.Q., Zheng, S.L., Cheng, M.H., Wang, P., & Miao, C.Y. (2017)  $\text{NAD}^+$  replenishment with nicotinamide mononucleotide protects blood–brain barrier integrity and attenuates delayed tissue plasminogen activator-induced haemorrhagic transformation after cerebral ischaemia. *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 3823–3836.
- 9) Daniele, T., Hurbain, I., Vago, R., Casari, G., Raposo, G., Tacchetti, C., & Schiaffino, M.V. (2014) Mitochondria and melanosomes establish physical contacts modulated by Mfn2 and involved in organelle biogenesis. *Curr. Biol.*, **24**, 393–403.
- 10) Peng, W., Wong, Y.C., & Krainc, D. (2020) Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics via lysosomal TRPML1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 19266–19275.
- 11) Brunk, U.T. & Terman, A. (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1996–2002.
- 12) Fernandez-Mosquera, L., Yambire, K.F., Couto, R., Pereyra, L., Pabis, K., Ponsford, A.H., Diogo, C.V., Stagi, M., Milosevic, I., & Raimundo, N. (2019) Mitochondrial respiratory chain deficiency inhibits lysosomal hydrolysis. *Autophagy*, **15**, 1572–1591.
- 13) Baixauli, F., Acín-Pérez, R., Villarroja-Beltrí, C., Mazzeo, C., Nuñez-Andrade, N., Gabandé-Rodríguez, E., Ledesma, M.D., Blázquez, A., Martín, M.A., Falcón-Pérez, J.M., et al. (2015) Mitochondrial respiration controls lysosomal function during inflammatory T cell responses. *Cell Metab.*, **22**, 485–498.
- 14) Felici, R., Lapucci, A., Ramazzotti, M., & Chiarugi, A. (2013) Insight into molecular and functional properties of NMNAT3 reveals new hints of  $\text{NAD}^+$  homeostasis within human mitochondria. *PLoS One*, **8**, e76938.
- 15) Zala, D., Hinckelmann, M.-V., Yu, H., Da Cunha, M.M.L., Liot, G., Cordelières, F.P., Marco, S., & Saudou, F. (2013) Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell*, **152**, 479–491.

## 著者寸描

## ●八木 美佳子（やぎ みかこ）



九州大学医学研究院保健学部門検査技術科学分野 助教。医学博士。

■略歴 2000年立命館大学理工学部生物工学科卒業。02年九州大学大学院生物資源環境科学府遺伝子資源工学修士課程修了。同年九州大学医学研究院臨床検査医学学術研究員。13年九州大学医学研究院博士号取得。19年より現職。

■研究テーマと抱負 ミトコンドリア翻訳機構の解明。さらにミトコンドリアと他のオルガネラとの相互作用、特にリソソームとの機能連関について研究している。老化性疾患に関与するミトコンドリアとリソソームの分子機序を解明し臨床応用を目指している。

■ウェブサイト <http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/organization/05060208/index.html>

<http://sites.google.com/view/cclm2/ホーム>

■趣味 食べ歩き。日々美味しいものを求めて探索。