

ミトコンドリアの保護的分裂を導く新たな制御因子 GJA1-20k

志村 大輔^{1,2}

1. はじめに

ミトコンドリアはストレスやエネルギー需要といった細胞内外の環境変化に応答し、分裂と融合を動的に繰り返すオルガネラである。その形態と機能の間には相関があるといわれており、多くの病態時にはその形態や機能に異常が生じることから、治療の標的や疾患の理解を深めるための重要な要因として注目を集めている。しかしその一方で、形態制御の一連のプロセスを説明できるメカニズムは未解明で、分裂と融合のどちらが有益あるいは有害な機能を示すのか結論に至っていない。また、その形態変化は非常にダイナミックで、それゆえに、ミトコンドリア動態を安定的に制御し、ストレスや病態から保護することは困難であった。

筆者らは近年、「GJA1-20k」と呼ばれるコネキシン43 (Cx43, ギャップ結合構成タンパク質の一つ) のN末端領域欠損アイソフォームがミトコンドリアに局在し、独自の経路でミトコンドリアを保護的に分裂させることを発見した¹⁾。本稿では、筆者が着目するGJA1-20kの発現と多機能性について、ミトコンドリア動態との関連性を中心に紹介する。

2. GJA1-20kとは?

細胞間コミュニケーションの要となるギャップ結合は、

コネキシン (Connexin: Cx) と呼ばれるタンパク質の複合体であり、中でもCx43は心室筋で最も多く発現するサブタイプである。Cx43のC末端領域欠損マウスモデル (K258stop) では、ギャップ結合形成の低下や虚血ストレスによる梗塞サイズの増大と不整脈誘発率の増加がみられることが、Delmarらのグループにより報告されてきた^{2,3)}。このことから、Cx43のC末端領域が機能調節や心保護に重要な役割を担うことが示唆され、key regulatory domainとして着目されてきたが、その詳細な作用機序には不明な点が多い。

Cx43は *Gjal* 遺伝子の単一エクソン上にコードされ、スプライシングを受けないため、一見単純な発現様式をとるように見える。しかしながら、興味深いことに、*Gjal* mRNA上には七つの開始コドン (メチオニン) が存在しており、Cx43の翻訳以外に各メチオニンからの内部翻訳が起こり、N末端領域欠損アイソフォームが生じる (図1a)⁴⁾。中でも、20kDaのアイソフォーム「GJA1-20k」は、213番目のメチオニンから内部翻訳される、最も発現量の多いアイソフォームであり、種々の細胞系譜や臓器で発現が確認されている。その構造はCx43の膜貫通領域の一部と、上述のkey regulatory domainとされているC末端領域すべてを含んでいる。

そこで、この小さなN末端領域欠損アイソフォームGJA1-20k自体が機能性ペプチドであると考え、GJA1-20kの発現を阻害した変異マウスを独自開発し、その表現型を解析してきた^{5,6)}。GJA1-20kが発現しない変異マウスの心臓では、ギャップ結合の形成が著しく低下し、生後2~4週間で不整脈性の突然死に至る。このようなGJA1-20kの発現抑制によるギャップ結合の形成不全は *in vitro* の実験系でも確認され、GJA1-20kがタンパク質輸送サブユニットとして働き、Cx43の細胞膜への輸送とギャップ結合の形成に欠かせない機能を担うことが明らかとなった^{4,5)}。

近年、この輸送機能に加え、筆者らはGJA1-20kがミトコンドリアにも局在していることを発見し、ミトコンドリアに対する機能解析に着手した。以下の節では、その成果について紹介する。

3. GJA1-20kを介したミトコンドリア形態制御

GFPで標識したGJA1-20kを発現するプラスミドをさま

¹The University of Utah School of Medicine, Department of Surgery and Nora Eccles Harrison Cardiovascular Research and Training Institute (CVRTI) (95 S 2000 E, Salt Lake City, Utah, 84112 U.S.A.)

²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野 (〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45 10号館7階)

The novel inducer GJA1-20k for playing a role in mediating the protective fission of mitochondria

Daisuke Shimura^{1,2} (¹The University of Utah School of Medicine, Department of Surgery and Nora Eccles Harrison Cardiovascular Research and Training Institute (CVRTI), 95 S 2000 E, Salt Lake City, Utah, 84112 U.S.A., ²Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Department of Periodontology, 1-5-45, Bldg 10 Floor 7, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950823

© 2023 公益社団法人日本生化学会

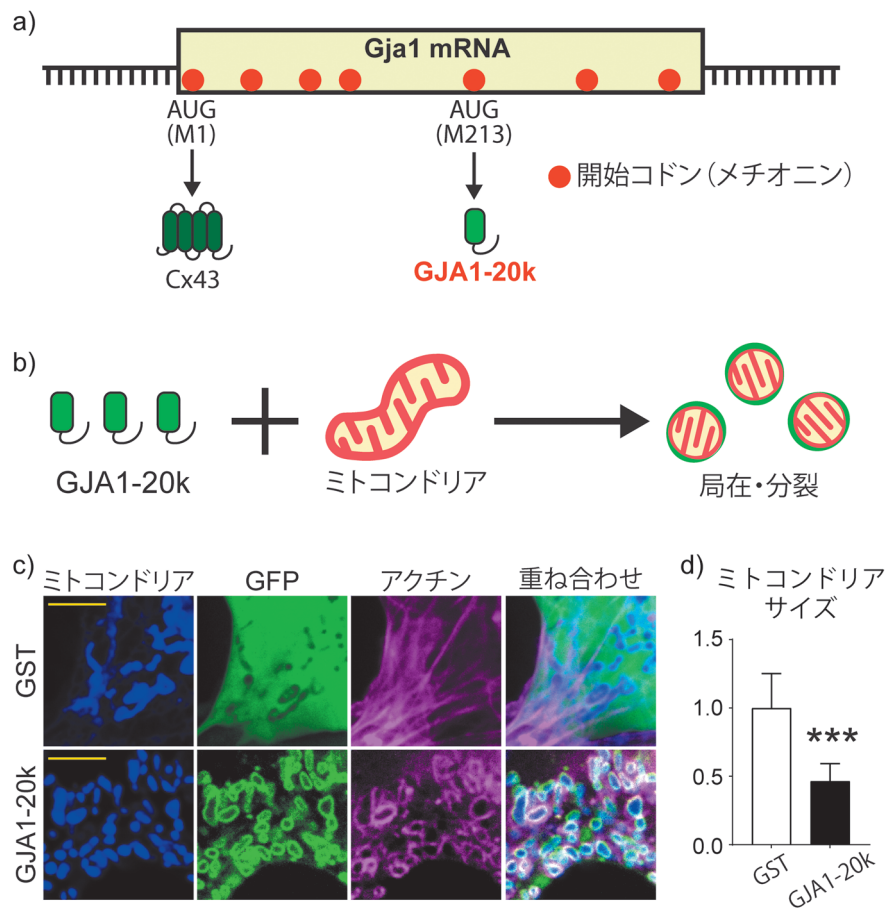


図1 GJA1-20kの発現様式とミトコンドリアへの局在と分裂
 (a) Cx43をコードする *Gja1* mRNA上の213番目のメチオニンからGJA1-20kが内部翻訳される。(b) GJA1-20kがミトコンドリアへ局在し分裂を誘導することを示す模式図。(c) GJA1-20k導入細胞で、GJA1-20kとアクチンがミトコンドリア外膜へ局在することを観察した実際のデータ。スケールバー、5 μ m。文献1より改変。(d) GJA1-20kの導入によりミトコンドリアのサイズが有意に減少している。*** $P < 0.001$ 。文献1より改変。(c, d) GSTは glutathione S-transferase を示し、GJA1-20kの導入に対するコントロール群として利用した。

ざまな細胞種にトランスフェクションし、その細胞内分布を顕微鏡下で観察したところ、驚くべきことに、その多くはミトコンドリアを囲むように局在していることがわかった(図1b, c)。このGJA1-20kのミトコンドリア局在はミトコンドリア画分のタンパク質発現量解析でも確認され、特にミトコンドリアの外膜に局在していることがわかった。ミトコンドリア外膜を囲うような局在と分布はCx43にはみられず、GJA1-20k特有の分布であり、Cx43の非存在下でも観察できる^{1,7)}。先行研究ではCx43がミトコンドリアの内膜に局在するという報告もある⁸⁾が、GJA1-20kがミトコンドリアへ及ぼす影響はCx43とは独立したものであると考えられる。

GJA1-20k導入細胞を用いたミトコンドリア形態解析から、GJA1-20kに囲まれたミトコンドリアのサイズはコントロール群と比べ小さく、またその一方で、1細胞内のミトコンドリア総数は増加していることがわかり、ミトコンドリアの分裂が誘導されていることが示された

(図1c, d)¹⁾。さらに、興味深いことに、細胞骨格の一つであるアクチンもGJA1-20kに沿うようにミトコンドリア外周に重合していることがわかった(図1c)。アクチンはミトコンドリアの分裂完了のための重要な役割を担うことが知られており^{9,10)}、また、すでにGJA1-20kとアクチンが相互作用することが報告されている¹¹⁾。このことから、ミトコンドリア周辺に局在したGJA1-20kがアクチンをリクルートし、分裂に導いたと考えられる。しかしながら、その他のミトコンドリアの形態制御や生合成に関与するタンパク質(DRP1, MFN, PGC-1 α , mtTFAなど)の発現量や、ミトコンドリア膜電位、ATP産生量には大きな変化はみられなかった。したがって、定常状態の培養細胞では「GJA1-20kがミトコンドリアに局在し、分裂を誘導した。」という現象の観察にとどまり、機能や関連タンパク質発現量への影響は認められなかった。そこで、過酸化水素(H₂O₂)を培地に添加し、酸化ストレス下でのGJA1-20kの影響を解析した。その結果、コントロール群

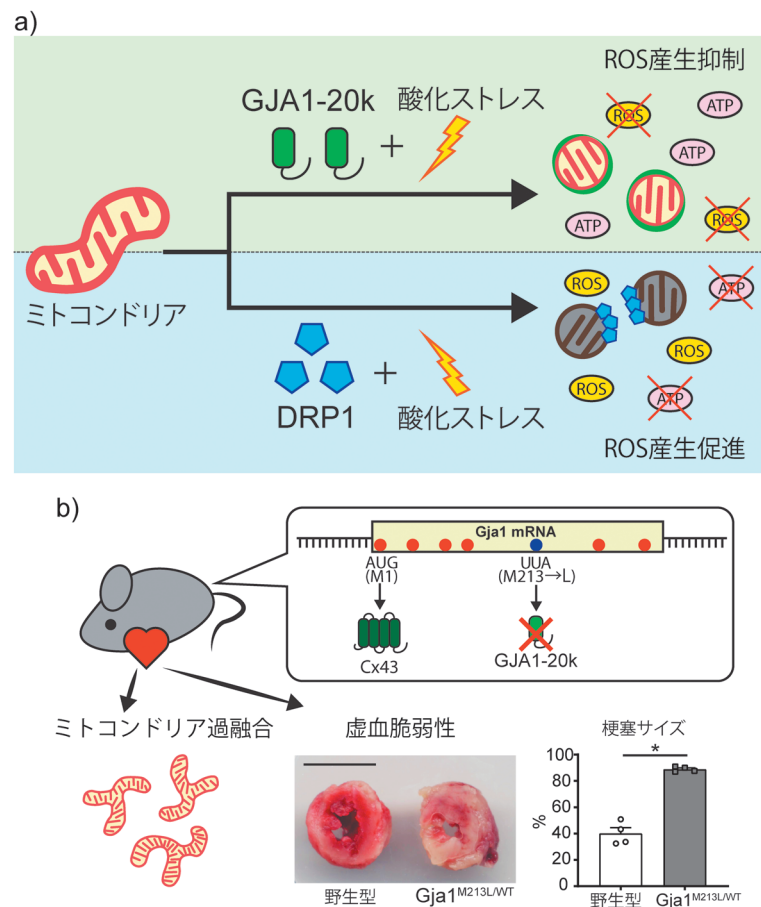


図2 GJA1-20kがミトコンドリアの機能に及ぼす影響

(a) GJA1-20kあるいはDRP1を介して分裂したミトコンドリアの酸化ストレスに対する応答の違いを示した模式図。
 (b) GJA1-20k変異マウスはミトコンドリアの過融合を引き起こし、虚血再灌流ストレスに対する脆弱性を示す。スケールバー、5mm。文献1より改変。

では、 H_2O_2 刺激によりミトコンドリアからの活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の産生が有意に上昇したが、GJA1-20k導入細胞ではROS産生が抑制されていることが判明した¹⁾。これは、GJA1-20kを介したミトコンドリアの分裂が酸化ストレスに対して保護的に作用していることを示している (図2a)。

4. 既知のミトコンドリア制御経路との関係性

上述したように、GJA1-20kはミトコンドリアに局在して分裂を誘導し、酸化ストレスに対する保護作用を示すことがわかった。その分裂にはアクチン細胞骨格の関与が示唆されたが、これまで報告されてきたミトコンドリア形態制御関連タンパク質の発現量には変化がなかった。特に、Dynamine-Related Protein 1 (DRP1)は、ミトコンドリアの分裂を担う中心的な制御タンパク質の一つとしてよく知られているが、その発現量も活性・非活性の指標となるリン酸化レベルもGJA1-20kの導入によって変化する

ことはなかった。そこで、DRP1の非存在下 (siRNAによるノックダウン) およびドミナントネガティブフォーム (DRP1-K38A) の導入によるDRP1活性阻害下でもGJA1-20kがミトコンドリアの分裂を誘導するかテストした。その結果、コントロール群においては、DRP1の非存在下および活性阻害下ではミトコンドリアは分裂ができず、その形態は融合へとシフトしていくことが確認できた。それに対しGJA1-20k導入細胞では、DRP1の有無や活性に影響されることなく、依然としてミトコンドリアの分裂が起こることが確認できた¹⁾。

しかし上述したように、DRP1も元来ミトコンドリアの分裂を仲介する中心的な制御因子であり、数多くの先行研究がその機能を解析してきた。そこで、GJA1-20kとDRP1の機能的差異を明確にするため、DRP1を過剰発現させてミトコンドリアの分裂を外因的に誘導し、同様に H_2O_2 刺激による酸化ストレス下でのROS産生量を計測した。その結果、GJA1-20kとは対照的に、DRP1の導入により分裂したミトコンドリアでは H_2O_2 刺激によるROS産生が著し

く上昇し、その量はコントロール群よりも有意に高い値を示した¹⁾。これらの結果は、GJA1-20kとDRP1はいずれもミトコンドリアの分裂を誘導する因子であるが、分裂後のミトコンドリアは相反する機能を有することを示唆する(図2a)。

DRP1を介したミトコンドリアの分裂はマイトファジーに必要な機構で、ミトコンドリア内の障害部位を切り離し、ミトコンドリアのクオリティーコントロールに重要な役割を担う¹²⁾。さらに、DRP1の欠損マウスは胎生致死となり胚発生にも不可欠であると考えられている¹³⁾。現時点では、GJA1-20kにもマイトファジーや胚発生に対する機能があるかどうかはわかっていない。しかしアクチンは、分裂因子がGJA1-20kかDRP1かにかかわらず、不可欠であると考えられており、ミトコンドリアの分裂の最終ステップで、ミトコンドリアどうしを切り離す際に重要な機能を果たす^{9,10)}。

このように、ミトコンドリア分裂制御因子としてのGJA1-20kとDRP1の作用機序は、一部が共通しているものの、分裂後のミトコンドリアの機能の違いをもたらす仕組みは不明な点が多く、さらなる解析が求められている。

5. GJA-20k遺伝子改変マウスの表現型

本稿ではこれまで、培養細胞内でのGJA1-20kとミトコンドリア動態の関係性について述べてきた。最後の節では、GJA1-20kの遺伝子改変マウスを用いた*in vivo*実験での知見をまとめたい。

そもそも、GJA1-20kは内因性のペプチドであり、ヒトやマウスといった哺乳類のさまざまな組織(特に心臓)で発現が認められる。定常状態でも、全長のCx43の発現量に比べて低いものの、GJA1-20kの発現が認められる。これに加え、筆者らの研究グループは、虚血ストレスが加わったマウスおよびヒトの心臓サンプルではGJA1-20kの発現量が有意に上昇することを見だし、GJA1-20kがストレス応答性のペプチドであること報告した¹⁴⁾。そこで、アデノ随伴ウイルスベクター(adeno-associated virus vector type 9: AAV9)を用いて、マウス心臓のGJA1-20k発現量を外因的に上昇させたマウスを作製し、その表現型を解析した¹⁴⁾。その結果、培養細胞と比べてマウスの心臓では、GJA1-20kの発現上昇がミトコンドリアの分裂を誘導しただけでなく、ミトコンドリアの生合成も亢進することがわかった。これは、常に活発に増殖している培養細胞と生体内の組織との違いであると考えられる。また、GJA1-20kの発現を上昇させたマウスの心臓に虚血・再灌流ストレスを施すと、再灌流後の梗塞部位面積が野生型と比べて有意に減少し、ROS産生量も抑制されていることも判明した¹⁴⁾。このことから、GJA1-20kは虚血ストレスに応答し

てその発現量を上昇させ、ミトコンドリアの分裂と生合成の促進を介して、組織を保護する機能を持つことが示された。

さらに、筆者らはCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を駆使して、GJA1-20kの翻訳開始コドン(213番メチオニン)をロイシンへと置換するアミノ酸点変異を施し、GJA1-20k発現変異マウス(Gjal^{M213L/M213L}マウス)を独自開発することに成功した^{5,6)}。この変異マウスモデルでは、全長のCx43の翻訳を保ったまま、GJA1-20kの発現が損なわれている(図2b)。本稿の冒頭でも簡潔に言及したが、GJA1-20kはCx43の輸送サブユニットとしてしての機能も有しており、GJA1-20kのホモ変異マウス(Gjal^{M213L/M213L}マウス)の心臓では、Cx43の細胞膜への輸送が著しく阻害される。その結果、ギャップ結合の形成が欠落し、生後2~4週間で不整脈性の突然死に至ってしまう。そのため、生後間もない幼若心筋を用いた実験に限られてしまうが、上述のGJA1-20kの発現上昇マウスモデルとは対照的に、Gjal^{M213L/M213L}マウスの心筋細胞のミトコンドリアの形態は伸長しており、サイズも大きくなっていることがわかった(図2b)。

一方で、ヘテロ変異マウス(Gjal^{M213L/WT}マウス)は、GJA1-20kの発現量は半減しているものの、野生型と同様の寿命を持ち、心機能やミトコンドリアサイズにも有意な変化は認められなかった。そこで、成熟したGjal^{M213L/WT}マウスの心臓に対し、同様に虚血・再灌流ストレスを施し、そのストレス応答を解析した。すると、健常時には野生型と同様の表現型であったミトコンドリアのサイズは再灌流後には有意に増大し、クリステ構造の崩壊や組織全体の梗塞部位面積、ROS産生量も野生型よりも上昇していることがわかった¹⁾。GJA1-20kの発現量の減少により、ミトコンドリアの保護が不十分となり、ストレスに対する脆弱性を示したと考えられる(図2b)。

以上の結果から、GJA1-20kは生体内でもミトコンドリア形態制御を介して、ストレスに対する保護作用を持つことが示された。

6. おわりに

ギャップ結合構成タンパク質の一つであるCx43をコードする遺伝子Gjalから内部翻訳によって生じるN末端領域欠損アイソフォームGJA1-20kは、Cx43タンパク質の輸送サブユニットとして働くだけでなく、ミトコンドリアの分裂と保護も担い、その機能は多岐にわたる。特に虚血や酸化ストレスに対する保護機能を発揮することから、GJA1-20kは新たな治療のターゲットにもなりうる。現在、虚血ストレスに対する興味深い保護法の一つに「プレコンディショニング」という手法がある。これは、事前に短期

間の虚血を繰り返すことで、のちに続く長期間の虚血に対する耐性を獲得できるという現象で、1986年にイヌの心臓で発見され¹⁵⁾、その後、種々の臓器でも確認された。虚血性疾患に対する治療や予防効果が期待され、多くの臨床治験も試みられたが、発見から35年以上経った今現在も根本的なメカニズムは未解明で、完全な臨床応用は果たせていない。5節で述べた筆者らの先行研究では、GJA1-20kによる心保護作用が上記のプレコンディショニングに酷似していることがわかっている¹⁴⁾。今後のさらなる解析により、GJA1-20kが積年の課題であったプレコンディショニングのメカニズム解明に大きく貢献することも期待されている。

謝辞

本稿の執筆の礎となった研究は、ユタ大学CVRTIの所長であるDr. Robin Shawの指導のもとで得られた成果であり、同大学所属のDr. TingTing HongとDr. Joseph Palatinusおよびハワード・ヒューズ医学研究所のDr. Jared Rutter、そして各ラボのメンバーたちの協力のもと遂行することができました。この場を借りて感謝申し上げます。ありがとうございました。

文 献

- Shimura, D., Nuebel, E., Baum, R., Valdez, S.E., Xiao, S., Warren, J.S., Palatinus, J.A., Hong, T., Rutter, J., & Shaw, R.M. (2021) Protective mitochondrial fission induced by stress-responsive protein GJA1-20k. *eLife*, **10**, e69207.
- Maass, K., Chase, S.E., Lin, X., & Delmar, M. (2009) Cx43 CT domain influences infarct size and susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, **84**, 361–367.
- Maass, K., Shibayama, J., Chase, S.E., Willecke, K., & Delmar, M. (2007) C-terminal truncation of connexin43 changes number, size, and localization of cardiac gap junction plaques. *Circ. Res.*, **101**, 1283–1291.
- Smyth, J.W. & Shaw, R.M. (2013) Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms. *Cell Rep.*, **5**, 611–618.
- Xiao, S., Shimura, D., Baum, R., Hernandez, D.M., Agvanian, S., Nagaoka, Y., Katsumata, M., Lampe, P.D., Kleber, A.G., Hong, T., et al. (2020) Auxiliary trafficking subunit GJA1-20k protects connexin-43 from degradation and limits ventricular arrhythmias. *J. Clin. Invest.*, **130**, 4858–4870.
- Shimura, D., Hunter, J., Katsumata, M., & Shaw, R.M. (2022) Removal of an internal translational start site from mRNA while retaining expression of the full-length protein. *J. Vis. Exp.*
- Fu, Y., Zhang, S.S., Xiao, S., Basheer, W.A., Baum, R., Epifantseva, I., Hong, T., & Shaw, R.M. (2017) Cx43 isoform GJA1-20k promotes microtubule dependent mitochondrial transport. *Front. Physiol.*, **8**, 905.
- Rodriguez-Sinovas, A., Ruiz-Meana, M., Denuc, A., & Garcia-Dorado, D. (2018) Mitochondrial Cx43, an important component of cardiac preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1860**, 174–181.
- Moore, A.S., Wong, Y.C., Simpson, C.L., & Holzbaur, E.L. (2016) Dynamic actin cycling through mitochondrial subpopulations locally regulates the fission-fusion balance within mitochondrial networks. *Nat. Commun.*, **7**, 12886.
- Li, G.B., Zhang, H.W., Fu, R.Q., Hu, X.Y., Liu, L., Li, Y.N., Liu, Y.X., Liu, X., Hu, J.J., Deng, Q., et al. (2018) Mitochondrial fission and mitophagy depend on cofilin-mediated actin depolymerization activity at the mitochondrial fission site. *Oncogene*, **37**, 1485–1502.
- Basheer, W.A., Xiao, S., Epifantseva, I., Fu, Y., Kleber, A.G., Hong, T., & Shaw, R.M. (2017) GJA1-20k arranges actin to guide Cx43 delivery to cardiac intercalated discs. *Circ. Res.*, **121**, 1069–1080.
- Burman, J.L., Pickles, S., Wang, C., Sekine, S., Vargas, J.N.S., Zhang, Z., Youle, A.M., Nezich, C.L., Wu, X., Hammer, J.A., et al. (2017) Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J. Cell Biol.*, **216**, 3231–3247.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W., Mooyer, P.A., Wanders, R.J., & Leonard, J.V. (2007) A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.*, **356**, 1736–1741.
- Basheer, W.A., Fu, Y., Shimura, D., Xiao, S., Agvanian, S., Hernandez, D.M., Hitzeman, T.C., Hong, T., & Shaw, R.M. (2018) Stress response protein GJA1-20k promotes mitochondrial biogenesis, metabolic quiescence, and cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *JCI Insight*, **3**, e121900.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., & Reimer, K.A. (1986) Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, **74**, 1124–1136.

著者寸描

●志村 大輔 (しむら だいすけ)



The University of Utah, Assistant Professor, 東京医科歯科大学 特任講師。博士 (理学)。

■略歴 1988年東京都生まれ。2011年早稲田大学先進理工学部生命医科学科卒業。16年同大学院先進理工学研究科生命医科学専攻にて博士号取得 (日本学術振興会特別研究員DC1)。東京女子医科大学博士主任研究員, Cedars-Sinai Medical

Centerおよびユタ大学でPostdocを経て、22年より現職。23年

よりクロスアポイントメントで東京医科歯科大学へ着任。

■研究テーマと抱負 様々な細胞種が共通して持つミトコンドリアや関連オルガネラに着目し、その形態・機能制御メカニズムを解明することで、幅広い疾患の治療法開発に貢献したい。

■ウェブサイト https://researchmap.jp/daisuke_shimura
<https://shawlab.cvrtri.utah.edu/>
<https://tmdu-periodontology.com/>

■趣味 水泳, 空手。