

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18508

研究課題名(和文)ミトコンドリアの動的特性が生み出すRNA顆粒-ncRNAの機能変化の解析

研究課題名(英文) Analysis of alternation for RNA granules-ncRNA function via mitochondrial dynamics

研究代表者

石原 孝也 (Ishihara, Takaya)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：70611862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリアの形態変化によって起こる細胞機能の変化が、どのように核に伝わり生理機能を維持しているかについて明らかにすることを目的とした。これまでの我々の研究成果からミトコンドリアの膜とmtDNAは一部で協調して働いていることが分かっている。そこでミトコンドリアの膜とミトコンドリアDNA(mtDNA)の動的な特性を詳細に理解するため、いくつかのスクリーニングを進めた。スクリーニングの結果から興味深い因子をいくつか同定することができ、分子レベルでミトコンドリアの膜とmtDNAの動的特性の変化による細胞機能の制御機構が明らかになりつつある。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to reveal the role of morphological changes of mitochondria in maintenance for physiological functions. From our recent research, we found that mitochondrial membranes and mitochondrial DNA (mtDNA) worked in part cooperatively. Therefore, in order to clarify the mechanistic insight between mitochondrial membrane and mtDNA dynamics, I performed several screening. Some factors could be identified in this screening, and the regulator of cellular function through the change of dynamics of mitochondrial membrane and mtDNA might be revealed at the molecular level.

研究分野：ミトコンドリア

キーワード：ミトコンドリアダイナミクス mtDNA

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返すダイナミックなオルガネラである。この形態変化には、GTPase 群が中心的な役割を担っており、近年これら因子の KO マウスの解析からミトコンドリアダイナミクスが生理的に重要である事が明らかになってきた。しかし、ミトコンドリアの形態の変化が核にどのように伝わり、細胞機能が制御されているかについてはあまり明らかになっていない。

ミトコンドリアの機能維持には、核ゲノムによりコードされたミトコンドリア前駆体タンパク質の転写・翻訳、さらにミトコンドリアへの輸送・成熟化と、ミトコンドリアが持つ独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) の転写・翻訳が協調的に起こり、それらの産物がミトコンドリア内でアセンブルする必要がある。mtDNA には 22 種類の tRNA、13 種類の呼吸鎖複合体サブユニットタンパク質、2 種類のリボソーム RNA がコードされており、すべてがミトコンドリアの呼吸機能の維持に重要である。この mtDNA の点変異や大規模欠失、tRNA の修飾異常等が引き起こすミトコンドリアの機能低下などは、ミトコンドリア病の原因となる。

また、ミトコンドリアの近傍及び内部には RNA 顆粒があり、ミトコンドリアや細胞機能制御に様々な働きをしていると考えられている。特に生殖細胞では inter-mitochondrial cement (IMC) が、ミトコンドリア上に局在することが知られており、piRNA はこの構造体で前駆体からプロセッシングを受け、エピジェネティックな制御に関与している。さらに、細胞当たり 1000 コピー存在すると言われる mDNA は、ミトコンドリアのマトリックス内で複製・翻訳複合体や RNA と結合し「核様体」と呼ばれる構造を形成している。この核様体の

適正な分布がミトコンドリアの機能発現に重要であることを近年我々は明らかにしている (PNAS 2013, MCB 2015)。また、筋特異的なミトコンドリア分裂不全マウスの解析から、個体においても核様体の異常な集積が観察された。心筋細胞における核様体の集積は、細胞内でミトコンドリアの活性に偏りを生じさせ、結果として心筋収縮能を低下させることも分かっている (MCB 2015)。これらの結果から、ミトコンドリアの機能低下が mtDNA の「質や量」の低下を伴わず、核様体の空間的配置の異常によっても引き起こされる事が分かった。

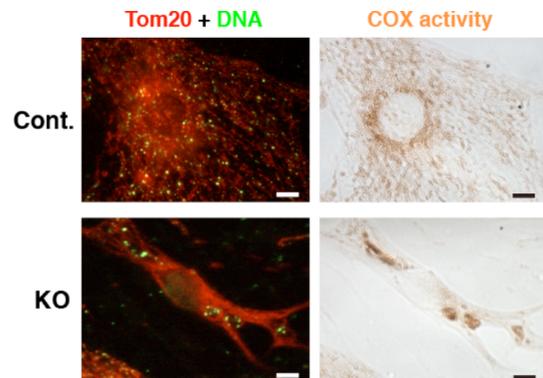


図 1 マウス心筋初代培養細胞における Cox 活性染色と抗体染色による呼吸鎖の活性と核様体の分布

### 2. 研究の目的

上記の状況を踏まえて、本研究では、RNA と DNA、さらにその結合タンパク質からなる細胞内微小構造に着目し、そのダイナミクスと細胞機能の解析を目的に研究を行った。関連分子の探索から分子機構を理解すること、さらに核様体のダイナミクスが関わる細胞制御機構にも着目し、新たな視点からミトコンドリアが関わる生理機能を理解することを目指した。

### 3. 研究の方法

哺乳動物培養細胞 (HeLa 細胞, MEF 等) に siRNA をトランスフェクションし、細胞内構造を観察した。動的な特性を理解するために、ミトコンドリア膜は MitoTrackerRed で、核様体は SYBR Green I

によって染色し、顕微鏡観察を行った。また、タンパク質レベルの検出には、同様の方法で準備した細胞をバッファーで溶解し、ウェスタンブロットによって解析した。さらに mtDNA・RNA はリアルタイム PCR によって定量した。各遺伝子のノックダウンによって起こるミトコンドリア活性の変化は、細胞外フラックスアナライザーを使い、ミトコンドリア機能を解析した。

#### 4. 研究成果

1) ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスによって制御されている。HeLa 細胞で Drp1 をノックダウンするとミトコンドリアが長く伸長するが、このときミトコンドリアの融合に関わる因子である Mfn1/2 のタンパク量の減少や OPA1 のプロセッシングがみられた。このような現象は CRISPR/Cas9 システムで作製した Drp1 KO HeLa 細胞や筋特異的 KO マウスの心臓などでも同様に観察されたことから、細胞内でミトコンドリアの形態制御に関わる共通の機構が存在することが示唆された。そこでその分子機構の詳細解析を行ったところ、Drp1 を抑制または欠損した際の mRNA の変動を解析すると多様な変動が見られたこと、さらに Mfn1/2 の減少はタンパク質レベルでも制御されており、細胞質のプロテアソームやミトコンドリア内の膜プロテアーゼ Oma1 など、複数のプロテアーゼによって制御されていることが分かった。これらの結果は、ミトコンドリア形態が多様な機構で恒常性を維持し応答していることを示している (Saita S. et al., *Genes Cells.*, 2015)。

2) ミトコンドリア形態制御の生理的意義を様々な組織において解析を進めた。ミトコンドリアの形態はエネルギー代謝にも重要な機能を果たしている。肝細胞特異的な Drp1 KO マウスでは、高脂肪食による肥満を改善することが分かった。この解析から、マウス肝臓での Drp1 欠損によるミトコン

ドリアダイナミクスの障害は、ER ストレスを誘導し、ATF4-FGF21 を介してエネルギー代謝を亢進させ、脂肪をより多く燃焼していることが考えられた (Wang L. et al., *Diabetologia.* 2015)。

3) 生細胞観察を行い、ミトコンドリアの膜と同時に様々な細胞内構造体のミトコンドリアとの関連を解析したところ、核様体はミトコンドリアのマトリックス内でダイナミックに動いていることが観察された。この動きには、ミトコンドリア膜の動的な制御に関わる因子が関与していることもわかった。そこで、mtDNA を含めた核様体の空間的配置に関わる機構を理解するために、関連因子の同定・解析を進めてきた。その結果、脂質の制御に関わる因子群が核様体等のミトコンドリア内構造の形態制御に関わること (BBA, in press)、内膜の ATPase タンパク質がその制御に関わること (未報告) を見出している。さらに siRNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行っており、関連因子の同定を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 計 4 件

1. Iihoshi H, **Ishihara T**, Kuroda S, Ishihara N, Saitoh H.

Aclarubicin, an anthracycline anti-cancer drug, fluorescently contrasts mitochondria and reduces the oxygen consumption rate in living human cells.

**Toxicol Lett.** Aug 5;277:109-114. (2017)

査読有

DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.06.006

2. Ban T, **Ishihara T**, Kohno H, Saita S, Ichimura A, Maenaka K, Oka T, Mihara K, Ishihara N.

Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin.

**Nat Cell Biol.** Jul;19(7):856-863 (2017)

査読有

DOI: 10.1038/ncb3560

3. Saita S, **Ishihara T**, Maeda M, Iemura S, Natsume T, Mihara K, Ishihara N.

Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission.

**Genes Cells.** May;21(5):408-24 (2016)

査読有

DOI: 10.1111/gtc.12351

4. Wang L, **Ishihara T**, Ibayashi Y, Tatsushima K, Setoyama D, Hanada Y, Takeichi Y, Sakamoto S, Yokota S, Mihara K, Kang D, Ishihara N, Takayanagi R, Nomura M.

Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced obesity and metabolic deterioration.

**Diabetologia.** Oct;58(10):2371-80 (2015)

査読有

DOI: 10.1007/s00125-015-3704-7

〔学会発表〕 計 9 件

石原 孝也、石原 直忠

ミトコンドリアの膜と mtDNA のダイナミクスを制御する因子の探索

ConBio2017 201712.6-12.9 神戸

太田あずさ、石原 孝也、石原 直忠

Drp1 欠損細胞において mtDNA からなる核様体の配置がミトコンドリア機能制御に関与する

ConBio2017 201712.6-12.9 神戸

石原 孝也、石原 直忠

ミトコンドリアの膜と mtDNA のダイナミクスを制御する因子の解析

平成 29 年度 日本生化学会九州支部例会

2017.5.13-14 宮崎

石原 孝也、石原 直忠

ミトコンドリアの膜と mtDNA のダイナミクスを制御する因子の探索

第 39 日本分子生物学会年会

2016.11.30-12.2 横浜

一村 紋佳、石原 孝也、石原 直忠

成長期の骨格筋における Drp1 の機能

第 39 日本分子生物学会年会

2016.11.30-12.2 横浜

飯星 悠、黒田 将吾、石原 孝也、石原 直忠、齊藤 寿仁

抗がん剤 aclarubicin の細胞毒性は SUMO・ユビキチン修飾と核およびミトコンドリアの制御破綻に由来する

第 39 日本分子生物学会年会

2016.11.30-12.2 横浜

石原 孝也、石原 直忠

ミトコンドリアの膜と DNA の協調的かつ動的な制御機構

BMB2015 2015.12.1-4 神戸

石原 孝也、石原 玲子、石原 直忠

ミトコンドリア DNA の動的制御機構と生理的意義

第 60 回日本人類遺伝学会 2015.10.14-17 新宿

石原 孝也

哺乳動物におけるミトコンドリアの膜と DNA のダイナミクス

YoungMito2015 2015.7.9-10 千葉

〔図書〕 0 件

〔産業財産権〕 0 件

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原 孝也 (ISHIHARA TAKAYA)

久留米大学・付置研究所・助教

研究者番号:70611862

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし