

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06141

研究課題名(和文) mtDNAからなる核様体構造の分散様式の変化が司るミトコンドリア機能制御

研究課題名(英文) Role of mtDNA dynamics in regulating mitochondrial function

研究代表者

石原 孝也 (Takaya, Ishihara)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：70611862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは細胞内のエネルギー生産の中心的な役割を担っているが、本申請研究ではミトコンドリアDNA (mtDNA) の動態変化が及ぼすミトコンドリア機能制御に着目して解析を進めた。今回の研究では、mtDNAの動態変化を効率的に解析するための新規プローブの作製と新たな関連因子を同定することができた。これらのツールは今後、この領域の基礎研究の進展に貢献するだけでなく、病態形成や老化などミトコンドリアが関わる多様な役割を分子レベルから理解することにつながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー生産に関わる細胞小器官である。その適正な機能発現にはミトコンドリアがもつ独自のゲノムであるミトコンドリアDNA (mtDNA) の品質維持が重要な要素となることが分かっている。近年の研究からmtDNAがダイナミックにその動態を変化させており、これがミトコンドリアの機能発現に重要であることも分かってきた。今回の申請研究では、mtDNAの動態が司るミトコンドリア機能の解析手法の開発と新たな関連する分子群の同定に成功した。今後、詳細なメカニズムの解明が進展し、ミトコンドリア機能低下と関連する病態や老化などを分子レベルで理解することに寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are indispensable for cellular energy production. Here, to ascertain how does mitochondrial DNA (mtDNA) dynamics govern mitochondrial function, we not only created a new probe to efficiently analyse mtDNA distribution but also identified factors which regulate its dynamics. Eventually, this will help us to understand the various functions that mitochondria have on a molecular level, including its role in diseases and ageing.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア mtDNA ダイナミクス 核様体構造

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、細胞内エネルギー生産に重要な二重膜構造の細胞小器官である。最近の研究から、ミトコンドリアは融合と分裂を頻繁に繰り返しながらダイナミックにその形態を変化させる『動的な細胞小器官』であり、この形態変化が、アポトーシスの進行、ミトコンドリア活性の維持、細胞内シグナルへの応答など多様な細胞機能制御に重要であることが分かってきた。また、ミトコンドリアは細菌の共生を由来とするオルガネラであり、その内部に独自のゲノム、mtDNA を保持している。mtDNA の異常はミトコンドリアの活性低下を引き起こし、ミトコンドリア病だけでなく、近年ではがんや糖尿病など多様な疾患との関連についても示唆されている。mtDNA は、ミトコンドリアのマトリックスで mtDNA 結合タンパク質と核様体と呼ばれる複合体を形成している。蛍光顕微鏡下で、ミトコンドリア核様体もまたダイナミックにその局在を変化させている様子を観察することができる。本申請研究の代表者らのこれまでの研究から、ミトコンドリアの膜と mtDNA は一部で協調的に働き、ミトコンドリア機能を制御することが分かっている。しかし、その分子メカニズム、特に mtDNA のダイナミクスに関わる関連分子の情報はほとんど報告されていなかった。

2. 研究の目的

ミトコンドリア分裂を抑制すると核様体が集積し、特徴的な膜構造(ミトバルブ)を形成する。本申請研究の代表者らの先行研究から培養細胞を用いた研究では、ミトバルブの形成によりアポトーシスの誘導が遅れること (*Ban-Ishihara R., Ishihara T. et al. PNAS 2013*) が分かっている。また心筋におけるミトコンドリア分裂欠損(筋組織特異的 Drp1 KO マウス)でもミトバルブが形成され、心筋初代培養細胞の解析からミトコンドリア呼吸鎖の活性が細胞内で偏ることが分かっている (*Ishihara T. et al. Mol. Cell. Biol. 2015*)。本申請研究では、核様体の分布や挙動に関わる分子を探索し、その分子メカニズムの解明からミトコンドリア機能制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

哺乳動物培養細胞を使って、本申請研究の解析対象となる核様体の制御に関わる遺伝子の発現を抑制、または CRISPR-Cas9 システムを用いて欠損させて研究を進めた。これら細胞のミトコンドリアの膜と核様体の動的な特性を理解するために、それぞれを MitoTracker と SYBR Green I によって染色し、顕微鏡観察を行った。タンパク質レベルでの変動はウエスタンブロッティング、mRNA の発現レベル、および mtDNA のコピー数の変動は qPCR を用いて定量を行った。ミトコンドリアの活性測定には、細胞外フラックスアナライザーを用いて、解析対象となった遺伝子の発現抑制・消失による影響を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母において、ミトコンドリア融合関連因子 (*Fzo1*) を欠損した株 ($\Delta Fzo1$) では、呼吸活性の低下がみられるが、分裂関連因子 ($\Delta Dnm1$) も欠損させた二重欠損株 ($\Delta Fzo1 \Delta Dnm1$) ではミトコンドリアの形態だけでなく、呼吸活性も回復することが報告されている。このように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ことが知られていた。私達は哺乳動物細胞を使って分裂関連因子 (*Drp1*) を CRISPR-Cas9 システムを用いて欠損させた細胞である *Drp1* KO HeLa を樹立している (*Saita S., Ishihara T. et al. Genes Cells. 2016*)。この細胞ではミトコンドリア呼吸機能が低下しており、呼吸鎖複合体のいくつかのサブユニットのタンパク質が減少している。今回、この細胞に融合関連因子である *Mitofusin1/2* (*Mfn1/2*) を発現抑制するとミトコンドリアの形態が戻るだけでなく、低下している呼吸能も回復させることができた (図 1)。これは出芽酵母と同様に哺乳動物培養細胞においても、ミトコンドリアの融合と分裂のバランスがその機能維持に重要であることを示唆している。さらに興味深いことに *Drp1* を欠損させることで生じる核様体の集積が解消されていた。これまで、核様体の分布・配置がミトコンドリア機能維持に重要であることは私達の研究からいくつかの現象を見出してきたが、本研究では核様体の異常な分布を解消することがミトコンドリア機能回復につながるシグナルであることを示しており、核様体のダイナミクスの細胞機能の一端を示す重要な研究となった (*Ota A., Ishihara T. et al. J Biochem. 2020*)。

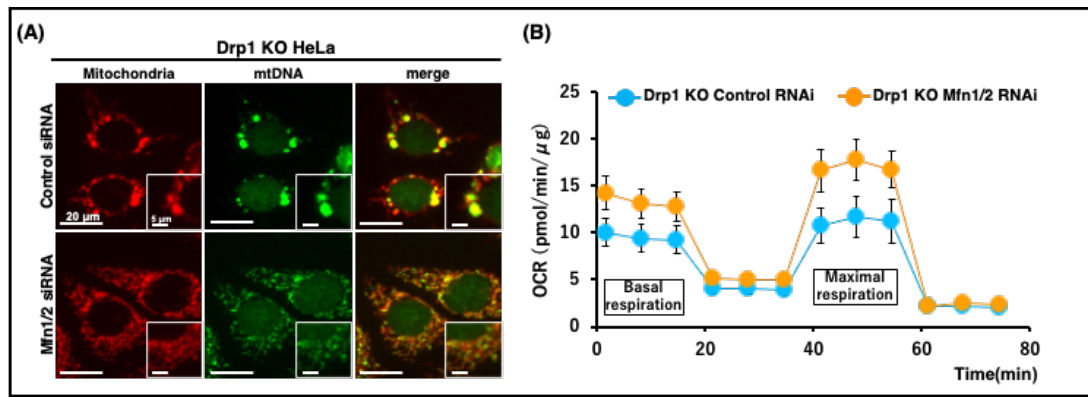


図1 (A)ミトコンドリア分裂と融合のバランス制御によるミトコンドリアと核様体の形態・分布変化 (B)ミトコンドリア機能の計測

(2)mtDNA が原因となるミトコンドリアの機能低下には、質（変異）や量（コピー数）の変化を伴うことが中心に議論されており、その分布や挙動に着目した研究はほとんど進められていない。その理由には、解析手法が確立されていないこと、そして関連因子の情報が乏しいことなどが挙げられる。本申請研究では、これらの問題を解決すべく、この課題に取り組んだ。まず、これまでの解析方法のひとつに、インターカーレーターを細胞に取り込ませて観察する方法がある。この方法は非常に簡便で生きた細胞で観察できるとも優れた方法だが、mtDNA（核様体）の動態を経時的にライブ観察するには、シグナルの褪色が大きな問題となっていた。そこで、褪色に耐えられる長時間ライブ観察可能なプローブの作製を進めた。結果、核様体の構成タンパク質として知られている TFAM の DNA 結合ドメインと蛍光タンパク質を融合させたものが新規プローブとして機能することが分かった。このプローブを用いることで、インターカーレーターの方法に比べてシグナルの減弱が抑えられ、核様体の動きを長時間観察することが可能となった（図2）。また、関連因子の探索については、siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングから膜貫通ドメインをもつ MARCH ファミリータンパク質に焦点をあてた解析を行った。MARCH ファミリーに属する MARCH5 (MITOL) は、ミトコンドリア膜のダイナミクス因子の制御に関わる分子として研究が進められていた。今回、私達は MARCH ファミリー11 種類のスクリーニング結果を詳細に検証すると、MARCH3, MARCH6, MARCH7 それぞれの発現抑制によって核様体の分布に変化が起きることを明らかにした。これら研究成果は、核様体ダイナミクスを解析するシステム構築と新規関連因子の同定、として報告した (Ishihara T. and Kanon H. et al. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2021)

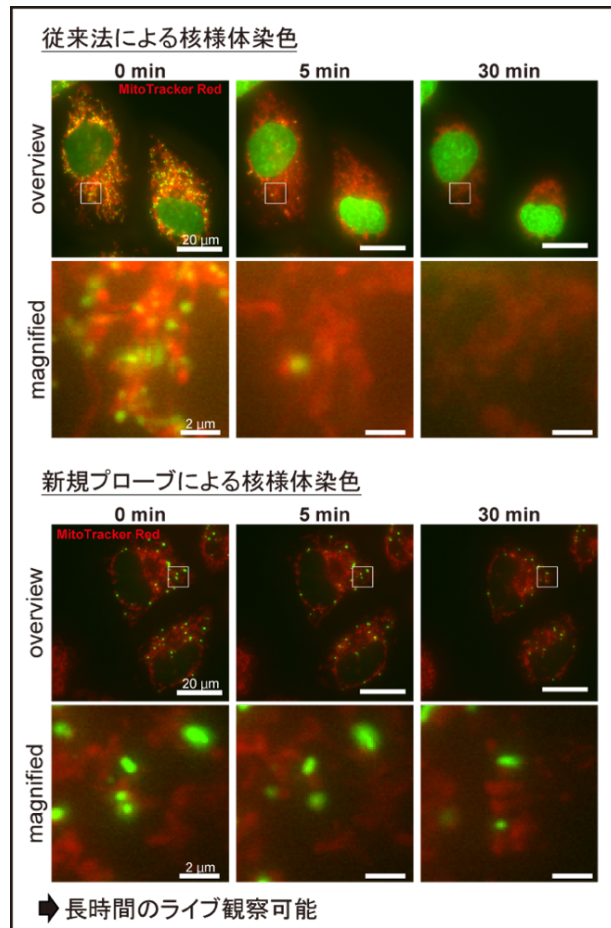


図2 核様体ダイナミクス研究を加速化させる新規プローブの開発

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ban Tadato, Kohno Hiroto, Ishihara Takaya, Ishihara Naotada	4. 巻 1859(9)
2. 論文標題 Relationship between OPA1 and cardiolipin in mitochondrial inner-membrane fusion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Bioenerg.	6. 最初と最後の頁 951-957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbabi.2018.05.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 花田有希・石原孝也・石原直忠	4. 巻 69(6)
2. 論文標題 ミトコンドリアの膜動態による細胞高次機能の制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 581-585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ota Azusa, Ishihara Takaya, shihara Naotada	4. 巻 167
2. 論文標題 Mitochondrial nucleoid morphology and respiratory function are altered in Drp1-deficient HeLa cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 287 ~ 294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安田樹・石原孝也・石原直忠	4. 巻 35
2. 論文標題 【ミトコンドリアと病気】(第7章)ミトコンドリア病と基礎研究 ミトコンドリア構造の動的変化と疾患	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 遺伝子医学MOOK	6. 最初と最後の頁 286-290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanada Yuki, Ishihara Naotada, Wang Lixiang, Otera Hidenori, Ishihara Takaya, Koshiba Takumi, Mihara Katsuyoshi, Ogawa Yoshihiro, Nomura Masatoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 MAVS is energized by Mff which senses mitochondrial metabolism via AMPK for acute antiviral immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19287-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丸山翔太・石原孝也・石原直忠	4. 巻 45
2. 論文標題 細胞の環境変化に应答するミトコンドリアダイナミクス	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本基礎老化学会	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石原孝也・小笠原絵美・石原直忠	4. 巻 13
2. 論文標題 ミトコンドリアダイナミクスが制御する生理・病理機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 238-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Takaya, Kanon Hirota, Ban-Ishihara Reiko, Ishihara Naotada	4. 巻 1865
2. 論文標題 Multiple assay systems to analyze the dynamics of mitochondrial nucleoids in living mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129874 - 129874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2021.129874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石原孝也、石原直忠
2. 発表標題 核様体制御に関わる新規因子の探索
3. 学会等名 日本ミトコンドリア学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石原孝也、石原直忠
2. 発表標題 Novel role of post-translational modification (ubiquitin-like modification) in dynamics of mitochondrial DNA and function.
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 孝也、石原 直忠
2. 発表標題 ミトコンドリア核様体の分布制御メカニズム
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原 孝也、石原 直忠
2. 発表標題 ミトコンドリアDNAの動態変化によるミトコンドリア機能の制御
3. 学会等名 第73回 日本酸化ストレス学会、第20回 日本N0学会 合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原 孝也、石原 直忠
2. 発表標題 Regulation of mitochondrial DNA dynamics in mammalian cells
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原孝也、石原直忠
2. 発表標題 mtDNAダイナミクスが制御するミトコンドリア機能
3. 学会等名 第23回 植物オルガネラワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------