

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08423

研究課題名（和文）感染時にみられる好中球のミトコンドリアの融合機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of neutrophil mitochondrial fusion in infection

研究代表者

真崎 雄一（Mazaki, Yuichi）

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：60311304

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）：好中球のミトコンドリアの形態の異常は、易感染性になる原因の一つとして報告されている。我々は、好中球の研究をするなかで、好中球を細菌性ペプチドで刺激すると、ミトコンドリアの形態が短時間に変化し、酸化リン酸化量も増加することを見出した。そこで本研究では、細菌性ペプチドの刺激による好中球のミトコンドリアの形態変化の分子メカニズムを明らかにすることにした。研究の結果、細菌性ペプチドの刺激による好中球のミトコンドリアの形態変化には、Mitofusin 2 (MFN2) が関わっているおり、この発現を抑えると、酸化リン酸化やケモタキシスも抑えられることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球は、感染初期に働く重要な免疫細胞の一つであり、好中球のミトコンドリアの形態異常は、易感染性になる原因の一つとして報告されている。今回、本研究によって、MFN2が、ミトコンドリアの形態変化、酸化リン酸化、走化性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。この知見は、易感染患者にみられる病因遺伝子の発見に貢献するだけでなく、好中球以外の短時間で病原体に应答する生体防御機構を解明するうえで重要な手がかりになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Neutrophils rapidly migrate to infection sites after the recognition of invaders. Previously, we found that mitochondrial morphology changes to a tubular form after fMLP stimulation. In addition, mitochondria oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity significantly increased after fMLP stimulation. In this study, we examined mechanisms of mitochondrial morphology changes after fMLP stimulation. We found that the silencing of mitochondrial fusion protein Mitofusin 2 (MFN2) suppresses mitochondrial morphological changes. Furthermore, MFN2 silencing suppressed OXPHOS activation and chemotaxis upon fMLP stimulation.

研究分野：感染症内科学

キーワード：好中球 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

好中球は、ヒトの白血球の半数以上を占める重要な免疫細胞であり、その主な役割は、体内に侵入してきた病原体を貪食し、体内から排除することである。好中球は、通常、解糖系を用いて ATP を産生している。一方、病原体に感染すると、それを排除するために大量の ATP が必要になり、好中球はミトコンドリアにある電子伝達系を使って、ATP を産生するようになる。電子伝達系による ATP の産生は、大量の ATP を産生できるものの、有毒な活性酸素種 (ROS) を産生してしまうため、細胞の内部では、その状態に応じて、どの程度、電子伝達系を使って ATP を産生するか厳密に制御されていると考えられている。近年、T 細胞において、短いミトコンドリアを持つエフェクター細胞では、ATP 産生に解糖系が主に使われているのに対し、長いミトコンドリアを持つメモリー細胞では、酸化的リン酸化が主に使われていること。ミトコンドリアの融合に関わる分子 Optic Atrophy (OPA1) を欠損したマウスから取り出した T 細胞では、長いミトコンドリアを持つことができないばかりか、酸化的リン酸化の量も減少し、メモリー細胞になれないことから、ミトコンドリアの形態と酸化的リン酸化、さらに、ミトコンドリアの形態と細胞の状態には、密接な関係があると考えられている (Cell 166: 63, 2016)。このような T 細胞におけるミトコンドリアの形態変化は、細胞分裂を伴う変化であるため、T 細胞では、メモリー細胞への分化に伴い、OPA1 の遺伝子の発現量が増加し、ミトコンドリアが融合するのであると考えられていた。

しかし、我々は、好中球及び好中球様細胞を研究するなかで、それらを細菌性ペプチド *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) で刺激すると、細胞分裂を伴うことなく、極めて短時間に、楕円体からチューブ状へと変化し、酸化的リン酸化量も増加するという現象を見出した。これまでに、好中球のミトコンドリアの形態の異常が、易感染性になる原因の一つとして報告されている。したがって、細菌性ペプチドによる好中球のミトコンドリアの形態変化機構を明らかにすることは、生体防御機構を解明していくうえで重要だと考えられる。しかし、細菌性ペプチドによる、このような変化が、どのようなメカニズムで短時間に起こるのかについては謎である。

2. 研究の目的

上記の謎を解くために、本研究では、fMLP の刺激によって、好中球のミトコンドリアが形態変化する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。また、fMLP の刺激によって、ミトコンドリアが形態変化できないと、生体防御機構に、どのような影響を及ぼすのかについても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 超解像度顕微鏡によるミトコンドリアの観察

ジメチルスルホキシドを用い、好中球様細胞に分化させた HL-60 細胞 (以下、dHL-60 細胞) をカバーガラスに接着させた後、10 nM fMLP で 5 分間刺激した。2% パラホルムアルデヒドで 37 °C、10 分固定後、PBS で洗い、さらにメタノールで -20 °C、5 分固定した。その後、ミトコンドリアの外膜に局在することが知られている translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOMM20) の抗体を用い、定法に従い染色した。また、核は TO-PRO-3 で染色した。

(2) 酸化的リン酸化の測定

4×10^6 の dHL-60 細胞を 2 mL の MiR05 培地に懸濁後、high resolution respirometry のチャンパーに入れた。1 μ M fMLP で 5 分間刺激後、5 mM ジギトキシンで透過処理した。その後、チャンパーに内に、酸化的リン酸化の基質、ADP、阻害剤を入れ、high resolution respirometry で測定した。

(3) 走化性の測定

走化性の測定は、トランスウェルを用いて、測定した。 5×10^5 の dHL-60 細胞を 20 mM HEPES (pH 7.2)、1% BSA を含む HBSS に懸濁後、トランスウェルの上部チャンパーの上側に入れた。また、下部のチャンパーには 10 nM fMLP を走化性物質として入れた。37 °C、2 時間インキュベーション後、チャンパーの膜の下側に移動してきた細胞数をカウントした。

4. 研究成果

これまでに、我々は、dHL-60細胞を fMLP で刺激すると、ミトコンドリアが、極めて短時間に楕円体からチューブ状へ変化すること。それに伴い、酸化的リン酸化量も増加することを見出している。また、電子顕微鏡による観察で、dHL-60細胞を fMLP で刺激すると、ミトコンドリアがチューブ状に変化するだけでなく、ミトコンドリア同士が融合していると思われる像を得ている。これらのことから、この形態変化は、ミトコンドリアの融合によるものではないかと考えた。

ミトコンドリアの融合には、Mitofusin(MFN)1、MFN2、OPA1 の3つのタンパク質が関わっていることが報告されている。そこで、これら3つのタンパク質の発現をテトラサイクリン誘導型 short hairpin RNA (shRNA) システムを用いて抑え、それぞれのタンパク質のミトコンドリアの形態変化に対する影響を調べた。

dHL-60細胞のミトコンドリアは、一般的な培養細胞と比較して小さく、通常の共焦点顕微鏡では、その形態を観察することができないことから、超解像度顕微鏡を使って、ミトコンドリアの形態を調べた。まず、未刺激では、いずれのタンパク質の発現を抑えた場合も、ミトコンドリアの形態に違いは見られなかった(図1)。一方、fMLPで刺激し、ミトコンドリアの形態を観察すると、MFN1、OPA1の発現を抑制した細胞では、ネガティブコントロール(Irr)の細胞とほぼ同様、約80%の細胞でミトコンドリアが楕円体からチューブ状へと変化していたのに対し、MFN2の発現を抑制した細胞では、50%程度の細胞しか変化しておらず、MFN2の発現抑制によって、fMLP刺激によるミトコンドリアの形態変化が抑えられることが明らかになった(図1、2)。

ミトコンドリアの形態変化は、酸化的リン酸化と関係していることが報告されている。そこで、MFN2が、fMLP刺激時のdHL-60細胞の酸化的リン酸化に関与しているか調べた。その結果、ドキシサイクリンによってMFN2のshRNAを発現させた細胞、すなわちMFN2の発現を抑制した細胞では、fMLP刺激時の酸化的リン酸化が著しく減少していることが明らかになった(図3)。

酸化的リン酸化は、ATPの産生に重要な役割を果たしている。そこで、さらに、MFN2と走化性との関係について調べた。その結果、MFN2の発現を抑制した細胞では、fMLPによる走化性が減少していることが明らかになった(図4)。このように、MFN2は、fMLP刺激によるミトコンドリアの形態変化と酸化的リン酸化の活性化に関与し、dHL-60細胞の走化性にも重要な役割を果たしていることが明らかになった。

今回、MFN2が、ミトコンドリアの形態変化、酸化的リン酸化、走化性に重要な役割を果たしていることが明らかになったが、この知見は、易感染患者にみられる病因遺伝子の発見に貢献す

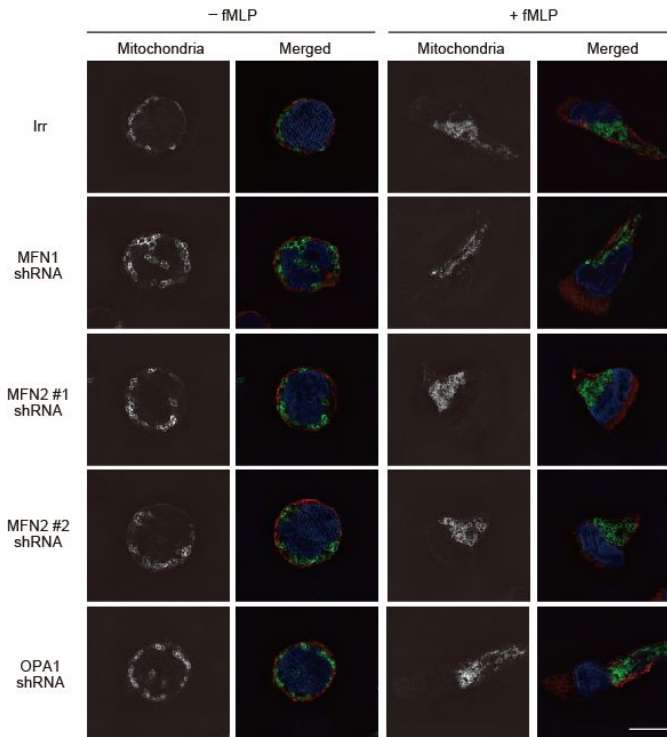


図1 ミトコンドリアの形態変化に対するMFN1、MFN2、OPA1の影響(超解像度顕微鏡像)
緑:ミトコンドリア 赤:チューブリン 青:核

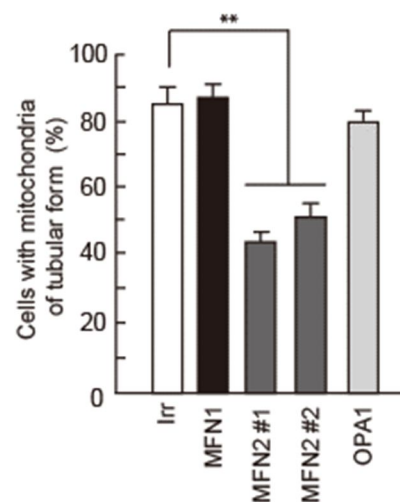


図2 ミトコンドリアの形態変化に対するMFN1、MFN2、OPA1の影響

るだけでなく、好中球以外の短時間で病原体に
応答する他の生体防御機構を解明するうえで重要な
手がかりになると考えられる。

<引用文献>

Mazaki, Y., Takada, S., Nio-Kobayashi, J.,
Maekawa, S., Higashi, T., Onodera, Y., Sabe,
H.

Mitofusin 2 is involved in chemotaxis of
neutrophil-like differentiated HL-60 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 513 (3): 708-
713 (2019)

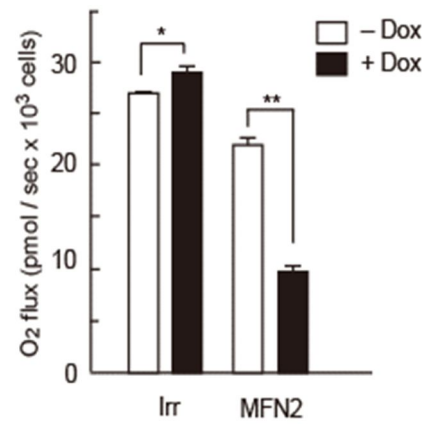


図3 酸化的リン酸化に対する
MFN2の影響

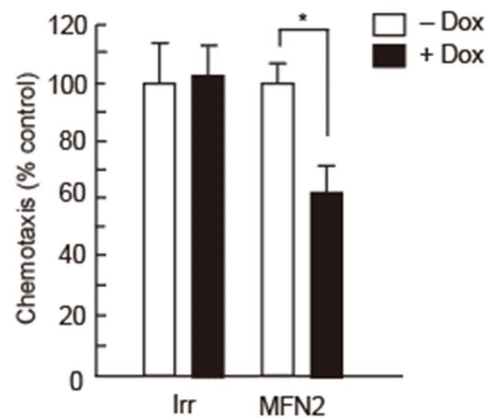


図4 走化性に対する MFN2 の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Horinouchi Takahiro, Mazaki Yuichi, Terada Koji, Miwa Soichi	4. 巻 43
2. 論文標題 Cigarette Smoke Extract and Its Cytotoxic Factor Acrolein Inhibit Nitric Oxide Production in Human Vascular Endothelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1804 ~ 1809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Horinouchi Takahiro, Mazaki Yuichi, Terada Koji, Miwa Soichi	4. 巻 143
2. 論文標題 Extracellular Ca ²⁺ promotes nitric oxide production via Ca ²⁺ -sensing receptor-Gq/11 protein-endothelial nitric oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 315 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mazaki Yuichi, Takada Shingo, Nio-Kobayashi Junko, Maekawa Satoshi, Higashi Tsunehito, Onodera Yasuhito, Sabe Hisataka	4. 巻 513
2. 論文標題 Mitofusin 2 is involved in chemotaxis of neutrophil-like differentiated HL-60 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 708 ~ 713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Horinouchi Takahiro, Karki Sarita, Terada Koji, Mazaki Yuichi, Miwa Soichi	4. 巻 140
2. 論文標題 Ca ²⁺ signal is involved in endothelin-1-induced internalization of endothelin type A receptor expressed in Chinese hamster ovary cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 102 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Higashi Tsunehito, Elmeligy Enas, Mai Yosuke, Noya Yoichi, Terada Koji, Mazaki Yuichi, Kuge Yuji, Miwa Soichi	4. 巻 509
2. 論文標題 Glutathione and cysteines suppress cytotoxicity of gas phase of cigarette smoke by direct reacting with unsaturated carbonyl compounds in the gas phase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 988 ~ 993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mazaki Yuichi, Higashi Tsunehito, Horinouchi Takahiro, Miwa Soichi	4. 巻 511
2. 論文標題 Annexin A2 is involved in activation of extracellular signal-regulated kinase upon endothelin-1 stimulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 69 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mazaki Yuichi, Higashi Tsunehito, Onodera Yasuhito, Nam Jin Min, Hashimoto Ari, Hashimoto Shigeru, Horinouchi Takahiro, Miwa Soichi	4. 巻 593
2. 論文標題 Endothelin type B receptor interacts with the 78 kD a glucose regulated protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 644 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Kazuki, Ohira Hiroshi, Horinouchi Takahiro, Nakaya Toshitaka, Mazaki Yuichi, Sugimoto Ayako, Watanabe Taku, Tsujino Ichizo, Nishimura Masaharu	4. 巻 26
2. 論文標題 Chinese herbal medicine Qing-Dai-induced pulmonary arterial hypertension in a patient with ulcerative colitis: A case report and experimental investigation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine Case Reports	6. 最初と最後の頁 265 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmcr.2019.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真崎雄一、東恒仁、堀之内孝広、三輪聡一
2. 発表標題 メラノーマ細胞において、Annexin A2は、エンドセリン-1の刺激によるAKTの活性化に関与する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真崎雄一、高田真吾、小林純子、前川聡、東恒仁、小野寺康仁、佐邊壽孝
2. 発表標題 好中球様細胞に分化させたHL-60細胞のケモタキシスにおける小胞体とミトコンドリアの接触
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真崎雄一、東恒仁、堀之内孝広、三輪聡一
2. 発表標題 Annexin A2は、エンドセリン-1の刺激によるERKの活性化に関与する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真崎雄一、高田真吾、小林純子、前川聡、東恒仁、小野寺康仁、佐邊壽孝
2. 発表標題 MFN 2は好中球様細胞に分化させたHL-60細胞のケモタキシスに関与する
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真崎雄一, 東恒仁, 橋本あり, 橋本茂, 南ジンミン, 小野寺康仁, 堀之内孝広, 三輪聡一
2. 発表標題 GRP78はエンドセリンB受容体を介したERKの活性化を促す
3. 学会等名 第92回日本薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真崎雄一, 東恒仁, 堀之内孝広, 橋本あり, 橋本茂, 南ジンミン, 小野寺康仁
2. 発表標題 エンドセリンB受容体はGRP78と相互作用する
3. 学会等名 日本分子生物学会第28回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真崎雄一, 小野寺康仁, 東恒仁, 堀之内孝広, 及川司, 佐邊壽孝
2. 発表標題 ARF1 activation initiates a regulation circuit for ARF1 and RAC1 activities in GPCR-mediated neutrophil chemotaxis
3. 学会等名 日本生物物理学会第55回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真崎雄一, 東恒仁, 堀之内孝広, 橋本あり, 橋本茂, 南ジンミン, 小野寺康仁
2. 発表標題 GRP78 is involved in endothelin B receptor signaling
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会、第51日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018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
---------	---------