

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15894

研究課題名(和文)ニューロンの軸索におけるオルガネラ間接触によるATP動態制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of ER-mitochondria contacts in the regulation of ATP dynamics in the axon

研究代表者

壺井 将史(Tsuboi, Masafumi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：20847123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経活動時の高いエネルギー需要に応えるため、プレシナプスにおいてミトコンドリアによるATP産生は厳密に制御されると考えられるが、そのメカニズムは良く分かっていない。本研究では、ミトコンドリアと小胞体の物理的接触(Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contact Site; MERCS)がミトコンドリアによるATP産生を制御する可能性を検証した。その結果、MERCSがミトコンドリアのカルシウム取り込みを制御し、プレシナプスにおけるシナプス小胞の放出制御に関わる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、小胞体とミトコンドリアの接触とアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症との関連が報告されている。また、これら疾患はシナプス機能の低下に起因する可能性が指摘されているが何がシナプス機能の低下を引き起こすかは不明である。本研究から、小胞体-ミトコンドリアがシナプス機能制御に寄与する可能性が明らかになり、新規の薬剤ターゲットや治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial ATP production at presynapses is tightly regulated to meet the high energy demand upon neuronal activity, but the mechanism is not well understood. In this study, we examined whether mitochondria-Endoplasmic Reticulum contacts (MERCS) regulate mitochondrial ATP production at the presynapses. We found that MERCS regulates mitochondrial calcium uptake and may be involved in the control of synaptic vesicle release at presynapses.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：プレシナプス ミトコンドリア 小胞体 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトの脳はエネルギー需要の非常に高い器官であり、脳虚血や低血糖症等によりエネルギー供給が絶たれると即座に認知機能障害が引き起こされる。神経細胞の恒常性維持は、神経活動を伴わない場合は解糖系による ATP 産生経路に大きく依存するのに対し、神経活動下においては多量の ATP を産生するミトコンドリアによる ATP 産生経路が非常に重要となると考えられている (Rangaraju et al., 2014; Ashraf et al., 2017)。このことは、神経活動における一過的な高いエネルギー需要に応えるためにミトコンドリアによる ATP 産生がプレシナプス内で厳密に制御されていることを示唆しているが、プレシナプスにおいてミトコンドリアによる ATP 産生がどのように制御されているかは多くが不明なままである。最近急速に発達して来た連続切片電子顕微鏡観察技術を用い、マウス大脳皮質ニューロンのプレシナプスのミトコンドリア構造を調べたところ、ミトコンドリアと小胞体が接触している興味深い微細構造を見出した。近年、オルガネラ同士のクロストークがオルガネラの機能を制御することが明らかになってきており、特に小胞体とミトコンドリア間の接触は ATP 産生やカルシウムイオン濃度の制御等、細胞の恒常性維持に必須の役割を担うことから非常に注目が集まっている。

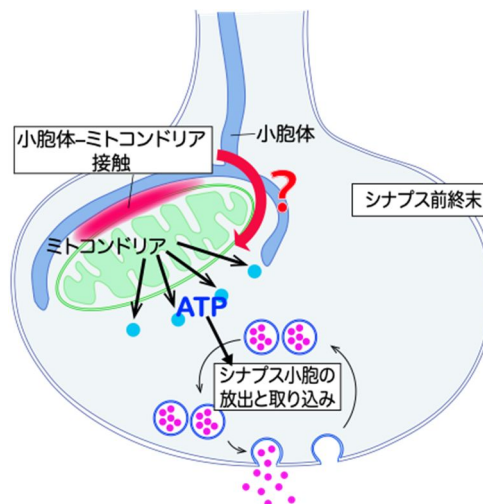


図 1 小胞体 - ミトコンドリア接触はミトコンドリアの ATP 産生を制御し、シナプス小胞の放出・取り込みのバランスを規定するか？

2. 研究の目的

本研究計画では、小胞体-ミトコンドリア接触がプレシナプスにおける ATP 動態を制御する可能性を検証し、そのメカニズム解明を目指した。

3. 研究の方法

3-1. 小胞体 - ミトコンドリア接触がマウス大脳皮質由来ニューロンにおけるミトコンドリアの ATP 産生能に与える影響を検討する。

ニューロンのミトコンドリアにおいて、小胞体 - ミトコンドリア接触が ATP 産生の制御に寄与するかを検討する。そのために、ミトコンドリア局在型 ATP センサー (Lobas et al., 2019) を用いて調べる。

3-2. 小胞体-ミトコンドリア接触がプレシナプスにおける神経伝達物質の放出過程に与える影響を検討する。

小胞体 - ミトコンドリア接触がシナプス小胞放出の制御に寄与するか、また寄与するならばどの過程の制御に寄与しているかは分かっていない。シナプス小胞の放出頻度の定量的ために pH 依存的に蛍光を発する pHluorin をシナプス小胞に局在させた synapto-pHluorin を用いる。これにより、シナプス小胞のプレシナプスからの細胞外への放出を蛍光変化を検出することで定量的に調べる。

3-3. 小胞体-ミトコンドリア接触がプレシナプスにおけるミトコンドリアによるカルシウムの取り込みを制御するか検討する。

小胞体 - ミトコンドリア接触がミトコンドリア ATP 産生制御に寄与するならば、そのメカニズムを明らかにする。これまでに、ミトコンドリアによる Ca^{2+} の取り込みがミトコンドリア呼吸鎖複合体を活性化することが知られており (Glancy and Balaban, 2012)、小胞体 - ミトコンドリア接触を介した Ca^{2+} 流入がミトコンドリア呼吸鎖複合体を活性化する可能性が考えられる。そこで、神経活動依存的にミトコンドリア内へのカルシウム流入が見られるか、またそれが小胞体-ミトコンドリア接触により制御されるかを、ミトコンドリア内膜局在のカルシウムインジケータを用いることで調べる。

4. 研究成果

4-1. 小胞体-ミトコンドリア接触はマウス大脳皮質ニューロンにおいて定常状態における ATP 量の制御に関わる可能性が示唆された。

マウス大脳皮質ニューロンにおいて小胞体-ミトコンドリア接触形成を担う因子をノックダウンしミトコンドリア(外膜)局在型 ATP センサーを発現させたところ、ニューロンの細胞体において ATP レベルが有意に増加する傾向が得られた。このことは小胞体-ミトコンドリア接触がニューロンにおける ATP 産生制御に寄与する可能性を示唆している。今後はミトコンドリア内膜局在型 ATP センサーを用いて、プレシナプスのミトコンドリア内の ATP レベルを調べる。

4-2 . 小胞体-ミトコンドリア接触はプレシナプスにおけるシナプス小胞のエクソサイトーシスを制御する可能性が示唆された。

大脳皮質ニューロンにおいて神経活動を惹起するための field stimulation の系の構築、および synapto-pHluorin によるシナプス小胞のエクソサイトーシスを定量的に解析する系の構築に取り組んだ。白金電極の調整、イメージングバッファの最適化を行った結果、観察視野の大部分のプレシナプスにおいて神経刺激依存的な synapto-pHluorin シグナルの増加を捉えることに成功した。また、構築した系を用いて小胞体-ミトコンドリア接触を担う因子のノックダウンを行いシナプス小胞のエクソサイトーシスに与える影響を調べたところ、予備的な結果ではあるがシナプス小胞の放出量に変化が見られた。今後は、この結果について再検証するとともに、この変化が ATP 産生の変化によるものかについても検証する。

4-3 . 小胞体-ミトコンドリア接触はプレシナプスにおけるミトコンドリアによるカルシウムの取り込みに必要であることが示唆された。

4-2 において構築した field stimulation の系を用いて、マウス大脳皮質由来ニューロンを刺激したところ、プレシナプスに局在するミトコンドリアにおいて神経刺激依存的なミトコンドリアのカルシウムレベルが増加する結果を得た。そこで、このミトコンドリアカルシウムレベルの増加を小胞体-ミトコンドリア接触が制御する可能性を検討した。小胞体-ミトコンドリア接触を担う因子のノックダウンしたところ、予備的ではあるがプレシナプスに局在するミトコンドリアの神経刺激に応じたカルシウムの取り込み量が低下するという結果を得た。このことから、小胞体-ミトコンドリア接触がミトコンドリアへのカルシウム流入を制御する可能性が示唆された。今後、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが小胞体由来か、細胞質由来のカルシウムによるものか明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|