

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16115

研究課題名（和文）ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドソーム成熟化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of the promotion of endosome maturation by mitochondrion-endosome association

研究代表者

佐藤 絢（Satoh, Aya）

北海道大学・医学研究院・博士研究員

研究者番号：90854662

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）：低分子量GTP結合タンパク質Rasの下流でクラスリン非依存性エンドサイトーシスを制御するphosphoinositide 3-kinase (PI3K) の結合因子としてvoltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) を同定した。VDAC2はEGF刺激依存的にRas-PI3K複合体陽性エンドソームをミトコンドリアに繫留し、エンドソームの成熟化を促進することを明らかにした。光遺伝学法によるオルガネラ間相互作用の誘導実験により、VDAC2は相互作用を形成する構造的な役割に加えて、VDAC2自身もエンドソームの成熟化を促進する機能を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な細胞機能に重要なオルガネラは、その破綻により多くの疾患の原因にもなり得る。ミトコンドリアやエンドソームの機能障害が関連する疾患はパーキンソン病、アルツハイマー病、がんなど多岐にわたり、未だ発症機序が不明な疾患も多く存在する。本研究によりミトコンドリアとエンドソームの相互作用により発揮される新たな機能が明らかにされたことから、異種オルガネラ間相互作用という新しい視点から、疾患の原因解明や新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We here identify voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2), a mitochondrial outer membrane protein, as a binding partner of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), a regulator of clathrin-independent endocytosis downstream of the small GTPase Ras. VDAC2 tethers endosomes positive for the Ras-PI3K complex to mitochondria in response to cell stimulation with epidermal growth factor and promotes clathrin-independent endocytosis, as well as endosome maturation at membrane association sites. With an optogenetics system to induce mitochondrion-endosome association, we find that, in addition to its structural role in such association, VDAC2 is functionally implicated in the promotion of endosome maturation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンドサイトーシス ミトコンドリア 細胞内シグナル伝達 蛍光イメージング オルガネラ間相互作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究室は以前に、上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) の刺激により、低分子量 G タンパク質 Ras と phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の複合体がエンドソームに移行し、この複合体から発信されるシグナルによりエンドサイトーシスやエンドソームの成熟化が促進されることを報告している (Tsutsumi et al., *Cell Signal*, 2009; Fujioka et al., *PLOS ONE*, 2011)。また、申請者らは Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行を制御する PI3K の責任配列を明らかにし報告している (Fujioka, Satoh et al., *Cell Struct Funct*, 2019)。次に、この責任配列を介した Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在メカニズムを明らかにするため、PI3K の責任配列と結合する因子を探索したところ、ミトコンドリアタンパク質である voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) が同定された。VDAC2 をノックダウンした細胞では EGF 刺激後の Ras-PI3K 複合体のエンドソーム局在および物質の取り込みが抑制され、VDAC2 が実際に Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とエンドサイトーシス制御に関わることが明らかになった。しかし、PI3K 結合因子としてミトコンドリアタンパク質が同定されたことは想定外であり、VDAC2 がどのようにして Ras-PI3K 複合体のエンドソーム移行とエンドサイトーシスを制御しているのかは未知である。

### 2. 研究の目的

ミトコンドリアのポアタンパク質である VDAC2 がどのようにして PI3K との結合を介して Ras-PI3K 複合体のエンドソームへの移行を制御するのかを明らかにする。また、エンドソーム移行後にエンドサイトーシスおよびエンドソームの成熟化が促進されるメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

免疫染色法により Ras-PI3K 複合体と VDAC2 の局在を共焦点蛍光顕微鏡および超解像顕微鏡で観察した。タイムラプスイメージングにより詳細にエンドソームとミトコンドリアの挙動を観察した。人為的にミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を誘導する光遺伝学ツールを作製し、エンドソームの酸性化を評価した。物質透過性変異体 VDAC2 の発現プラスミドを作製し、この変異体の過剰発現下でエンドソームの成熟化を評価した。

### 4. 研究成果

(1)VDAC2 は EGF 刺激依存的なミトコンドリア-エンドソーム間相互作用に必要である  
VDAC2 と Ras-PI3K 複合体の細胞内局在を調べたところ、Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソームと VDAC2 陽性のミトコンドリアが近接しており (図 1) この両者の近接、すなわちミトコンドリア-エンドソーム間相互作用が関与していることが示唆された。次にミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を定量解析した結果、この相互作用は EGF 刺激により促進され、さらにこの促進は VDAC2 発現抑制下では起こらなくなることが明らかになった。

Ras-PI3K複合体 (BiFC) /  
HA-VDAC2 (Alexa Fluor 647)

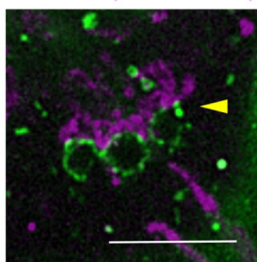


図 1: EGF 刺激 30 分後の Ras-PI3K 複合体と VDAC2 の細胞内局在を超解像顕微鏡で観察した。EGF 刺激後に Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソーム (緑) と、VDAC2 陽性のミトコンドリア (紫) が近接している (図中の矢印)。

(2)ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によりエンドソームの酸性化が促進される  
タイムラプスイメージングによりミトコンドリア-エンドソーム間相互作用中のエンドソームを観察したところ、相互作用中に初期エンドソームマーカーである EEA1 の蛍光強度が徐々に減少し、後期エンドソームマーカーである Rab7 の蛍光強度が次第に増加する様子が観察された。このことから、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用はエンドソームの成熟化を促進することが示唆された。そこで、pH 感受性蛍光色素を用いてエンドソームを染色し、相互作用前後のエンドソームの酸性化を定量し、エンドソームの成熟化を評価した。その結果、相互作用後にエンドソームの酸性化が促進され、VDAC2 をノックダウンすると酸性化が認められなくなった (図 2)。

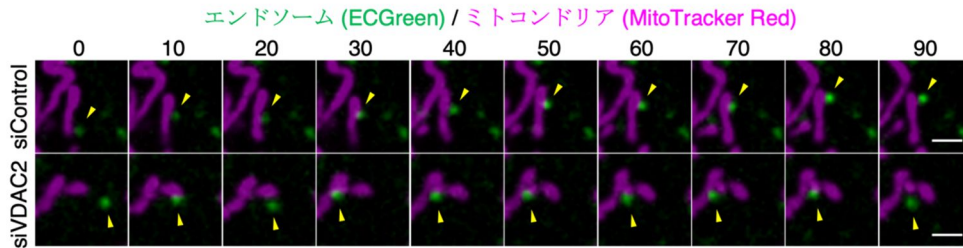


図2：ミトコンドリアとエンドソームを蛍光色素で可視化し、10秒毎に蛍光顕微鏡で撮影した。エンドソームはpHの低下に伴い蛍光強度が増加する色素であるECGreenで染色した。図中の矢印は、ミトコンドリア（紫）と相互作用後にエンドソーム（緑）の色素が次第に明るくなり、pHが低下して酸性化する様子を示している。

(3)ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を介したエンドソームの酸性化にはVDAC2のポア機能が必要である

人為的にミトコンドリア-エンドソーム間相互作用を誘導する光遺伝学ツールを作製し、これを用いて光照射後にエンドソームの酸性化が促進されるかを調べた。細胞にpH感受性蛍光色素標識のデキストランを取り込ませ、光照射により相互作用を誘導した。実際に光照射後にデキストランの蛍光強度が増加し、エンドソームの酸性化が促進された(図3左)。興味深いことに、VDAC2をノックダウンすると光照射後もデキストランの蛍光強度は増加せず(図3右)。ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドソームの成熟化にはVDAC2の何らかの機能が必要であることが示唆された。そこで、物質透過性が減少する変異を導入した変異型VDAC2の発現プラスミドを作製し、これを細胞に過剰発現させてエンドソームの成熟化を評価した。その結果、野生型VDAC2の過剰発現によりエンドソームの酸性化が促進されたが、変異型VDAC2の過剰発現の場合は顕著な酸性化が認められなかった(図4)。従って、ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドソーム酸性化促進にVDAC2のポア機能が関与することが示唆された。

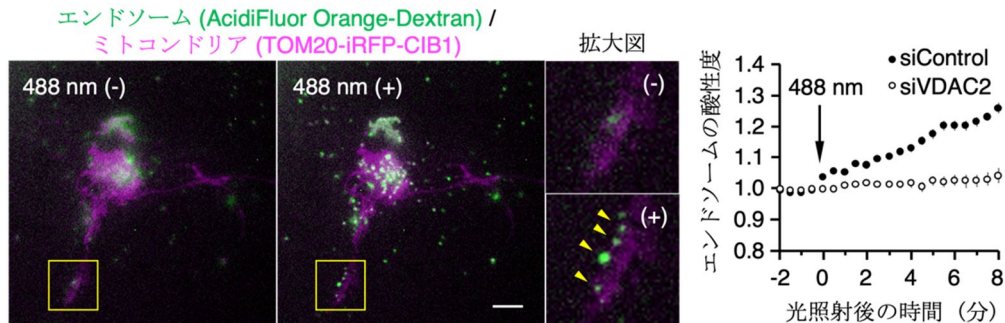


図3：光遺伝学の技術を用いて488nmの光でミトコンドリア（紫）とエンドソーム（緑）の相互作用を誘導し、光照射前後のエンドソームのpHを測定した。光照射後にエンドソームの蛍光強度が増加、すなわちpHが低下して酸性化する様子を捉えた（拡大図中の矢印）。VDAC2発現抑制細胞では光照射後の酸性化が認められなくなった（左のグラフ）。

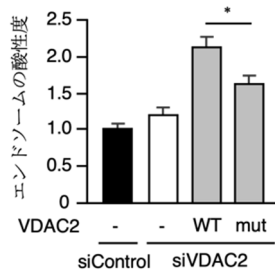


図4：コントロールまたはVDAC2のsiRNAを導入したA431細胞に、コントロールまたはVDAC2の野生型(WT)および物質透過性が減少する変異型(mut)の発現プラスミドを遺伝子導入し、エンドソームの酸性化を定量した。\*  $p < 0.0001$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sato Aya O., Fujioka Yoichiro, Kashiwagi Sayaka, Yoshida Aiko, Fujioka Mari, Sasajima Hitoshi, Nanbo Asuka, Amano Maho, Ohba Yusuke	4. 巻 42
2. 論文標題 Interaction between PI3K and the VDAC2 channel tethers Ras-PI3K-positive endosomes to mitochondria and promotes endosome maturation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112229 ~ 112229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112229	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤絢、藤岡容一郎、大場雄介
2. 発表標題 ミトコンドリア - エンドソーム間相互作用によるエンドソーム成熟化促進機構
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020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
---------	---------