

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06066

研究課題名（和文）核様体ダイナミクスに着目したミトコンドリア形態制御の新視点研究

研究課題名（英文）New perspective on mitochondrial morphology regulation focusing on nucleoid dynamics

研究代表者

石原 孝也（ISHIHARA, Takaya）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

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）：本申請研究では、「ミトコンドリアゲノム（mtDNA）によって形成される核様体構造の分布や配置がミトコンドリア膜の分裂制御機構と連携している」という申請者らの発見を契機として、核様体の分子理解からミトコンドリア形態制御機構を明らかにすることを目的に研究を開始した。本研究期間において、核様体の動きを制御する分子としてATAD3の解析を進め、ミトコンドリアダイナミクスの制御とその機能維持に関して核様体の視点から新たなメカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアが分裂と融合によってダイナミックに形態を変化させる動的な特性は、酵母から哺乳動物まで種を超えて普遍的な制御機構を持つ。また、近年の研究から、この特性は分化や細胞応答などさまざまな高次の生命機能を維持するのに重要な機能を持つことが明らかになっている。本研究で得られた知見は、核様体の動きを制御する分子を起点とし、ミトコンドリアの形態や活性制御機構を明らかにしたものである。今後は同様のコンセプトによって、広くミトコンドリアの機能を改善させる分子詳細の解明に貢献できるものである。

研究成果の概要（英文）：This research focused on the nucleoid structure and mitochondrial membrane dynamics based on our concept that "the distribution and arrangement of the nucleoid, which structure formed by the mitochondrial genome (mtDNA), is linked to the fission control mechanism of the mitochondrial membrane." Therefore, we approached to clarify the mechanism controlling mitochondrial morphology through molecular insights into the aspect of nucleoid structure and its regulations. During this research period, we analyzed ATAD3 as a molecule that controls the trafficking of the nucleoid and were able to realize a new mechanism from the perspective of the nucleoid regarding the control of mitochondrial dynamics and maintenance of its function.

研究分野：分子生物学

キーワード：mtDNA ミトコンドリア核様体 ダイナミクス 膜ダイナミクス

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

ミトコンドリアは、私たちの細胞内エネルギーの大半を産生するオルガネラとしてだけでなく、分化や発生、免疫応答などの細胞・生体機能にも深く関わっている。また、ダイナミックにその形態を変化させる動的なオルガネラとしても知られている。近年のモデルマウスや *in vitro* での研究成果から、このミトコンドリア形態変化(ダイナミクス)の異常が、生体の高次機能を破綻させ、疾患の原因となることもわかってきた。この形態変化は、ミトコンドリアで機能する GTPase 群が中心的な役割を果たしているが、これら分子だけでは説明できない現象 (Ota A., Ishihara T. *et al. J Biochem* 2020 など) も見出されており、さらなる分子メカニズムの解明が求められている。

ミトコンドリアは細胞内共生を由来としており、酸素呼吸を維持するために必須のタンパク質、tRNA、rRNA をコードする独自のゲノム (mtDNA) を持っている。mtDNA は、mtDNA 結合タンパク質である TFAM などと結合し、核様体という構造を形成している。興味深いことに、この核様体もまたダイナミックにその分布や形態を大きく変化させ、ミトコンドリア機能を制御している (Ban-Ishihara R., Ishihara T. *et al. PNAS* 2013, Ishihara T. *et al. Mol. Cell. Biol.* 2015)。

申請者らのこれまでの研究から、核様体のダイナミクスがミトコンドリア形態変化やその機能発現と深く関わっていることが明らかになっており、これらの研究成果を契機として、核様体/mtDNA のダイナミクスとその機能を明らかにする研究も大きく発展しつつあった。

2. 研究の目的

本申請研究では、申請者らのこれまでの研究から得た「mtDNA によって形成される核様体構造の分布や配置がミトコンドリア膜の分裂制御機構と連携する」という着想をもとに、関連する因子を探索し、その分子メカニズムを明らかにすることを目指した。さらに、それら分子詳細の理解からミトコンドリアの機能に及ぼす影響を解析した。

3. 研究の方法

本申請研究では、既知因子の分子詳細の解析と siRNA ライブラリーを使った新規因子の網羅的探索からミトコンドリアの形態を変化させる因子の解析を実施した。さらには、CRISPR-Cas9 システムによるそれら因子のゲノム編集をおこない、多様なミトコンドリア機能に及ぼす影響を解析した。

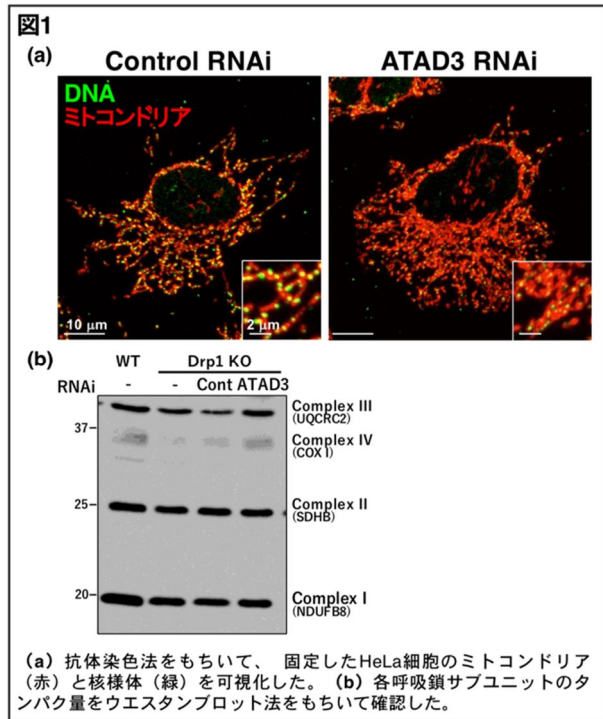
4. 研究成果

(1) 既知因子の機能解析 (Ishihara T. *et al. PNAS* 2022)

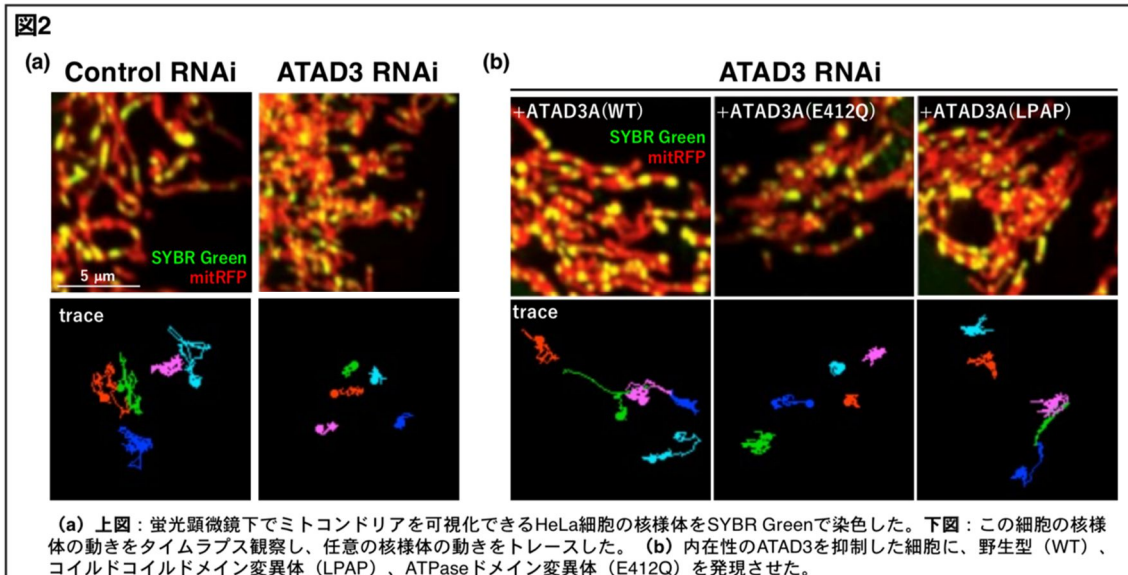
これまでもプロテオミクス技術をもちいて、核様体やその関連分子と相互作用するいくつかの因子が報告されていた。さらに近年の次世代シーケンサーをもちいた疾患関連遺伝子の詳細なゲノム解析から、ミトコンドリア機能異常を引き起こすいくつかの因子が報告されていた。本申請研究では、ATAD3 という遺伝子に着目して解析を行った。この遺伝子の産物である ATAD3 タンパク質は、核様体だけでなくミトコンドリアの脂質

調節、さらには細胞増殖など多様な機能が報告されていた。

ATAD3 をノックダウンすることで、ミトコンドリアの形態は変化し、核様体が小さくミトコンドリア全体に分布することがわかった (図 1(a))。加えて、この核様体が小さく分散した細胞では、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体サブユニットのいくつかで、そのタンパク量が増加していることも分かった。さらに興味深いことに、ミトコンドリア分裂制御因子である Drp1 のノックアウト細胞や発現を抑制した細胞でみられる核様体の集積が、ATAD3 をさらにノックダウンすることによって解消されるとともに、この細胞で減少していた呼吸鎖複合体のサブユニットの量が一部回復することも分かった (図 1(b))。このことから、小さく分散している核様体はミトコンドリア機能を亢進させる、一方で核様体が集積するとミトコンドリア機能は抑制される、という核様体の分布によるミトコンドリア呼吸機能調節メカニズムの存在が示唆された。



さらに、核様体の分布メカニズムについて、核様体ライブ観察システムをもちいて検討した。コントロールとなる細胞でダイナミックに分布を変化させていた核様体の動きが、ATAD3 をノックダウンした細胞では顕著に悪くなっていることがわかった (図 2 (a))。詳細な解析から、この動きの制御には、ATAD3 の N 末端側のコイルドコイルドメインと C 末端側の ATPase ドメインのいずれもが関与していることが分かった (図 2 (b))。



これらのことから、通常、ミトコンドリア内部で分布を変化させている核様体は、ミトコンドリア分裂制御因子 Drp1 を抑制することで局所的に集積するが、核様体の動きを止めると、この集積が阻害され、結果的に核様体を分散させたまま維持することで呼吸鎖複合体を安定に形成することに寄与していると考えられる。しかし、核様体の動き

を止めてしまうことで起こりうる細胞機能などへの影響について、詳細に検証することができていない。すでに ATAD3 の発現抑制は細胞増殖を低下させることが報告されており、多機能な因子であることから詳細な検証を難しくさせている。今後は、このような機能をもつ別の因子を探索・解析することで、核様体ダイナミクスとミトコンドリア活性（呼吸鎖複合体形成）との関連を明らかにできると考えられる。

(2)新規因子の探索

申請者らは、独自のカスタム siRNA ライブラリーを用いて、関連因子の網羅的スクリーニングを進め、その他にも複数の因子を同定している。このアプローチからも核様体ダイナミクスとミトコンドリアの形態変化を関連付ける分子メカニズムが明らかになりつつある。

(3)その他

本研究期間中には、書籍の出版（ミトコンドリアダイナミクス：基礎研究から疾患・老化まで）や共同研究（論文発表済3件、未報告3件）に参画するなど自身の研究以外にも当該領域の発展に貢献することができた。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Liu Lu, Yang Jiahao, Otani Yoshinori, Shiga Takahiro, Yamaguchi Akihiro, Oda Yasuaki, Hattori Miho, Goto Tsukimi, Ishibashi Shuichi, Kawashima-Sonoyama Yuki, Ishihara Takaya, Matsuzaki Yumi, Akamatsu Wado, Fujitani Masashi, Taketani Takeshi	4. 巻 24
2. 論文標題 MELAS-Derived Neurons Functionally Improve by Mitochondrial Transfer from Highly Purified Mesenchymal Stem Cells (REC)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17186 ~ 17186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242417186	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 石原 孝也、石原 玲子、石原 直忠	4. 巻 95
2. 論文標題 ミトコンドリアゲノムの新しい制御機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 650 ~ 654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950650	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 Yasuda Tatsuki, Ishihara Takaya, Ichimura Ayaka, Ishihara Naotada	4. 巻 42
2. 論文標題 Mitochondrial dynamics define muscle fiber type by modulating cellular metabolic pathways	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112434 ~ 112434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112434	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 Hozumi Kaori, Sugawara Kenji, Ishihara Takaya, Ishihara Naotada, Ogawa Wataru	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of imeglimin on mitochondrial function, AMPK activity, and gene expression in hepatocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-27689-y	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 Ishikawa Kaori, Honma Yo, Yoshimi Ayami, Katada Shun, Ishihara Takaya, Ishihara Naotada, Nakada Kazuto	4. 巻 185
2. 論文標題 Pearson syndrome-like anemia induced by accumulation of mutant mtDNA and anemia with imbalanced white blood cell lineages induced by Drp1 deletion in a murine model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacological Research	6. 最初と最後の頁 106467 ~ 106467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phrs.2022.106467	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 Ishihara Takaya, Ban-Ishihara Reiko, Ota Azusa, Ishihara Naotada	4. 巻 119
2. 論文標題 Mitochondrial nucleoid trafficking regulated by the inner-membrane AAA-ATPase ATAD3A modulates respiratory complex formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2210730119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2210730119	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 94
2. 論文標題 代謝と自然免疫をつなぐミトコンドリアの細胞情報伝達機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 230 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940230	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 Takeichi Yukina, Miyazawa Takashi, Sakamoto Shohei, Hanada Yuki, Wang Lixiang, Gotoh Kazuhito, Uchida Keiichiro, Katsuhara Shunsuke, Sakamoto Ryuichi, Ishihara Takaya, Masuda Keiji, Ishihara Naotada, Nomura Masatoshi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Non-alcoholic fatty liver disease in mice with hepatocyte-specific deletion of mitochondrial fission factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 2092 ~ 2107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-021-05488-2	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 5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 Impact of mitochondrial dynamics on functional maturation in cardiomyocytes
3. 学会等名 第100回 日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石原孝也, 石原直忠
2. 発表標題 ミトコンドリア機能を制御する核様体の動的変化メカニズム
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022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の動的制御を司る翻訳後修飾
3. 学会等名 第20回 日本ミトコンドリア学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石原孝也, 石原直忠
2. 発表標題 核様体の構造変化が及ぼすミトコンドリア機能への影響
3. 学会等名 第44回 分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石原孝也, 石原直忠
2. 発表標題 組織分化におけるミトコンドリアダイナミクスの重要性
3. 学会等名 生理研研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石原孝也, 石原直忠
2. 発表標題 ミトコンドリアの膜とゲノムの動的特性が制御する細胞内エネルギー代謝
3. 学会等名 第94回 日本内分泌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 市川 葵, 石原孝也, 石原直忠	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 245
3. 書名 ミトコンドリアの膜とDNAのダイナミクスとその制御機構 -増刊 ミトコンドリア 疾患治療の新時代	

1. 著者名 石原直忠ほか82名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 458
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ミトコンドリアDNAの“動き”の制御でミトコンドリアの機能を向上
https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2022/20221116_1
New insights into mitochondrial nucleoid dynamics
<https://www.eurekalert.org/news-releases/971640>
New insights into mitochondrial nucleoid dynamics
<https://www.asiaresearchnews.com/content/new-insights-mitochondrial-nucleoid-dynamics>

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
---------	---------