

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06149

研究課題名（和文）小胞体-ミトコンドリア接触領域のライブイメージング解析

研究課題名（英文）Imaging analysis of ER-mitochondria contact sites in living cells

研究代表者

小林 剛（KOBAYASHI, Takeshi）

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40402565

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）：小胞体-ミトコンドリア接触領域は、カルシウムイオン輸送や脂質輸送などの細胞活動において重要な役割を果たしていることが明らかにされてきているが、生細胞中でのダイナミクスの解析は進んでいない。本研究では、2量体型蛍光タンパク質を利用したプローブを用いてその接触領域のライブイメージングを行い、生細胞中での接触領域の生成・消滅や運動性を解析した。接触領域は定常状態においても動的な性質を有するが、細胞がリガンド刺激や機械刺激を受容した際、接触領域が生成・拡大しミトコンドリアへのカルシウムイオン移行が増強されていた。すなわち、接触領域の形態修飾により領域での機能調節が行われてい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

小胞体-ミトコンドリア接触領域は、カルシウムイオンや脂質など情報や物質をやり取りする場であり、細胞機能の維持に重要な役割を果たしている。この接触領域の機能が損なわれることにより疾病が誘導される可能性も考えられている。すなわち、それぞれのオルガネラ機能異常に加え、接触領域の機能の欠落や変調が疾病の発症基盤になると考えられる。本研究によって、接触領域の動態が接触領域の機能発現に重要な役割を果たしていることが示されたので、したがって接触領域の動態を制御することにより疾病の予防・治療方法の開発へつながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Endoplasmic reticulum-mitochondria contact site (EMCS) plays an important role in various cellular activities including calcium ion transport and lipid transport, but its dynamics in living cells have remained unclear. In this study, we performed live imaging of EMCSs using a probe that utilizes a dimeric fluorescent protein, and analyzed the formation/disappearance and motility of them in living cells. The contact sites had dynamic properties even in steady state, but when cells received ligand stimulation or mechanical stimulation, we found significant increase in number and size of EMCSs, and calcium ion transfer to the mitochondria was found to be enhanced at EMCSs. Therefore, it was suggested that the function of EMCSs could be regulated by their morphological modification.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ接触領域 ダイナミクス 可視化解析 ミトコンドリア 小胞体

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内のオルガネラ間の接触領域が、物質輸送などの生理的な機能を担う場であることが示され注目を集めている。中でも、小胞体とミトコンドリアの接触領域 (ER-Mitochondria Contact Sites, EMCSs) は、脂質や Ca^{2+} の輸送、ミトコンドリアの分裂、ROS 産生等に関わり、さらに疾患との関連も報告され、大きな注目を集め積極的に研究が進められている。EMCSs では、それぞれの膜にある膜分子が相互作用することによりその近接部位が形成されると考えられている。その形成に関わる分子として多種の組み合わせが報告されており、EMCSs は多様性を持つものと考えられている。 Ca^{2+} 輸送を担う EMCSs の形成には、小胞体上の IP3 受容体とミトコンドリア外膜上の VDAC チャンネルの GRP75 を介した相互作用や MFN2 分子同士の相互作用が働いている。EMCSs の解析には、これまで電子顕微鏡を用いた形態解析や生化学的に単離された MAM (Mitochondria-Associated ER Membrane) 画分の解析を中心として進められてきた。固定標本に対する in situ proximity ligation assay による EMCS 検出も行われているが、その形成や崩壊などのダイナミクスの解析はあまり進んでいない。ミトコンドリアと小胞体は非常に動的な構造で、細胞内で活発に動いており、当然、EMCS 構造も動的なものと考えられる。従って、EMCSs の生理的な機能発現のメカニズムを理解するうえで、EMCSs のダイナミクスとその制御機構を解明することは必須である。しかし、現状、EMCSs のダイナミクスの解析は十分進んでいない。これまで特異的なプローブを用いた EMCS ライブセルイメージングとしては、Campbell のグループが 2 量体型蛍光タンパク質を用いたプローブを報告したが、その使用の困難さから広く用いられていない (Alford SC et al, 2012, doi:10.1021/sb300050j)。BRET (生物発光共鳴エネルギー転移) をベースにしたプローブも最近報告され、今後、活用が期待されている (Hertlein V et al, 2019)。また、Split 型の GFP を用いたアプローチもなされているが、EMCSs の安定化に働いてしまう可能性があり生理的なダイナミクスの観察には適さないという議論がある。EMCS に対する特異的なプローブは使わず両オルガネラを高解像度 3 次元イメージングし、近接した領域を検出する方法も行われてきた。今後、超解像蛍光顕微鏡を用いて同様な解析が発展していくと予想されるが、まだ一般的には行われていない。

2. 研究の目的

小胞体-ミトコンドリア接触領域 (EMCSs) は、カルシウムイオン輸送や脂質輸送などの細胞活動においての重要な役割を果たしていることが明らかにされてきているが、生細胞中での EMCSs の定量やダイナミクスの解析は進んでいない。本研究では、2 量体型蛍光タンパク質を利用したプローブを用いて EMCSs のライブセルイメージングを行い、そのダイナミクスを解析し、その制御機構と EMCSs が関与する生理機能のメカニズムの解明を目指す。特に、EMCS のダイナミクスとその機能の発現との相関を解析し、カルシウムイオン輸送の制御機構の分子基盤の解明を目指した。

3. 研究の方法

生きている細胞において EMCSs の動態を可視化するためにヘテロ 2 量体化すると蛍光を発する蛍光タンパク分子を用いた。2 量体型緑蛍光タンパク質分子 ddGFP-A を小胞体膜の細胞質側に、ddGFP-B はミトコンドリア外膜上に発現させると、EMCSs 領域では ddGFP-A と ddGFP-B が近づき可逆的に 2 量体化し、特異的に蛍光を発する (図 1 a)。このプローブは、細胞内で発現させると EMCSs ではない小胞様の構造で強い蛍光シグナルを生じてしまうが、我々は、プローブの発現と細胞状態をコントロールすることにより、偽陽的なシグナルを排除し EMCS 特異的なシグナルのみを検出する手法を確立した。ミトコンドリアの蛍光プローブを共発現した細胞をスピニングディスク型共焦点蛍光顕微鏡によりタイムラプス観察した。EMCSs の陽性シグナルはミトコンドリア上に見られた (図 1 b)。取得した蛍光画像の定量には、Z 軸スキャンし、デコンボリューション処理後、Z 投影し、蛍光強度や共局在を定量した。

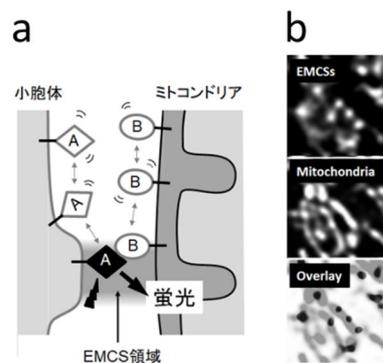


図 1 . 2 量体型蛍光タンパク質を用いた EMCSs 可視化の概念図 (a) と実際の観察画像 (b) (灰色: ミトコンドリア、黒: EMCSs)

4. 研究成果

2 量体型蛍光タンパク質を利用したプローブを用いて、生きた細胞での EMCSs のライブイメージングを行った。EMCSs には、1 分までの短い寿命のものや、10 分以上の長いものが見られ、ミトコンドリアに沿って動いているものも観察された (図 2 a)。EMCS 部位からミトコンドリアの分裂が開始する様子も観察され、生理的な条件で検出できていると考えられた (図 2 b)。

EMCSs はミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送に働くことが分かっているが、細胞にメカニカルストレスを負荷した際、ミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度が 10~100 倍程度ゆっくりと上昇することを見出した (図 3 a)。リガンド刺激などで細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇した際もミトコンドリア

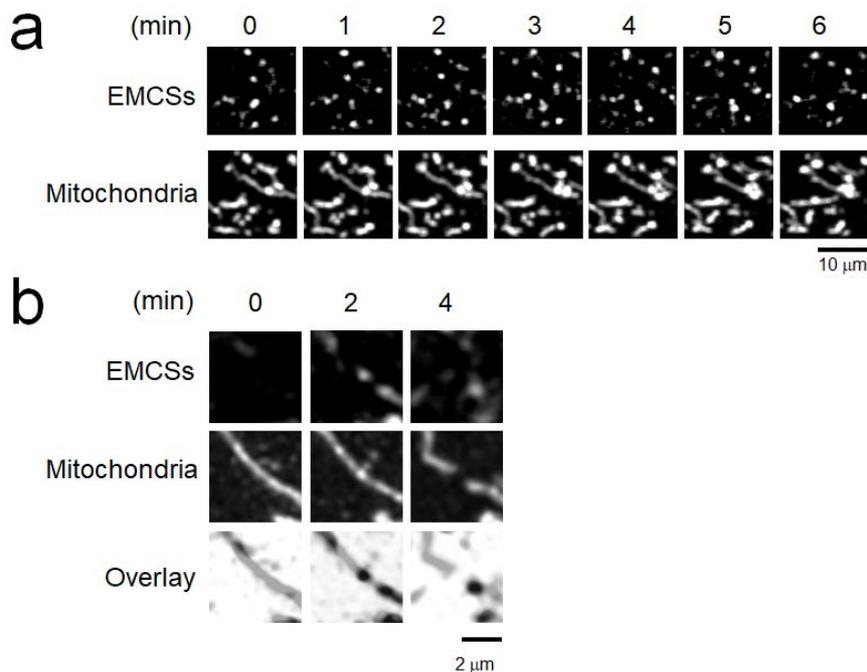


図 2 . EMCSs のライブイメージング

アの Ca^{2+} 濃度が上昇するが、その応答は一過的に短時間でミトコンドリア全体に見られた。一方、メカニカルストレスに誘導された場合、 Ca^{2+} 濃度が均一に上昇するのではなく 10 μM 以上に上昇するスポット状の部位がミトコンドリアに長時間増えていることが判った。この Ca^{2+} スポットの増加は、ミトコンドリア Ca^{2+} ユニporter (MCU) の発現抑制や小胞体の Ca^{2+} を枯渇

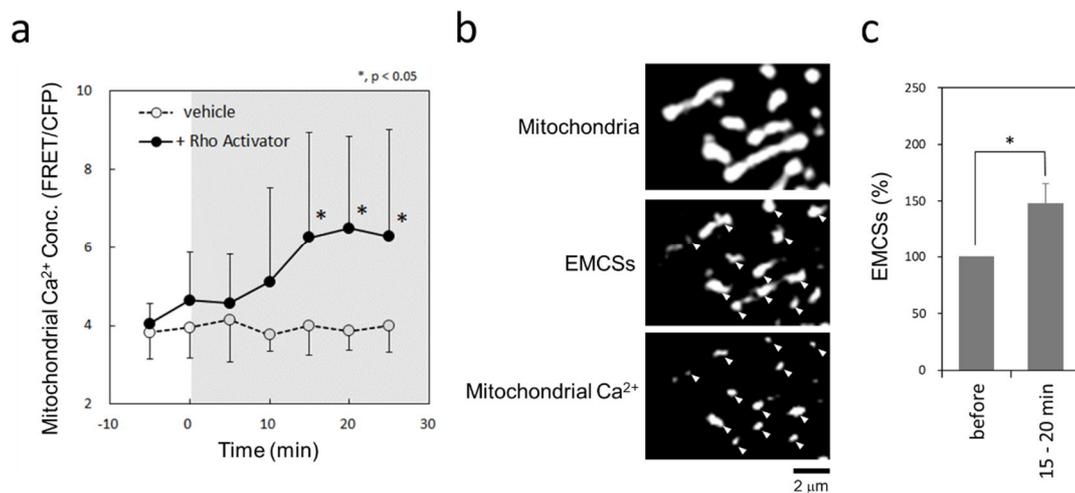


図 3 . メカニカルストレスに誘導されるミトコンドリア Ca^{2+} 濃度上昇と EMCSs 量の増加

a. Rho 活性化処理後 15 分からミトコンドリア Ca^{2+} 濃度が緩やかに上昇した。b. Rho 活性化処理後 15 分におけるミトコンドリア、EMCSs およびミトコンドリア Ca^{2+} スポットの観察画像。ほとんどのミトコンドリア Ca^{2+} スポットは EMCSs 上に見られた (矢じり)。c. Rho 活性化処理後に EMCSs 蛍光シグナル量は有意に増加した。

させると抑えられたことから、小胞体からミトコンドリアへ EMCSs を介した Ca^{2+} 流入を反映していると考えられた。実際、EMCSs の可視化解析すると、刺激に応じ EMCSs 量が増加し、それに合わせてミトコンドリアの Ca^{2+} スポットも増加していた (図 3 b, c)。従って、刺激により EMCSs が影響を受け、 Ca^{2+} 移動が変調している可能性が示された。リガンド刺激などで細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇した際にミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇し、それに同調して EMCSs シグナルの増減も観察された (図 4)。一方、細胞にメカニカルストレスを負荷した際は、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存せずに EMCSs 量が増加した。しかし、いずれの場合もミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度の上昇が見られ、MCU の阻害剤処理で、その Ca^{2+} 濃度の上昇は抑えられた。一方、その処理で EMCSs 量の増加は抑えられなかった。従って、EMCSs 量の増加は、ミト

コンドリア内 Ca^{2+} 濃度による副次的なものではなく、むしろ、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 流入を制御している可能性が考えられた。すなわち、EMCSs 量の制御により EMCSs の機能調節が行われている可能性が示された。

また、我々は、アルツハイマー病の発症に関わるアミロイド β ペプチド ($\text{A}\beta$) の EMCSs の動態に対する影響を解析した。 $\text{A}\beta$ は凝集し細胞内に Ca^{2+} を流入させ細胞死を誘導する。その際、ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度も上昇させることが報告され、 $\text{A}\beta$ 誘導の細胞死に寄与する可能性が示唆されている。アルツハイマー病モデル動物や $\text{A}\beta$ を作用させた細胞では、EMCSs 量や構成分子の発現が亢進していることから、 $\text{A}\beta$ 作用において EMCSs の関与が注目されている。実際、培養細胞に $\text{A}\beta$ 刺激を行うとミトコンドリア Ca^{2+} 濃度の緩やかな上昇とともに EMCSs のシグナル量増加が誘導された。詳細な解析により EMCS 数の増加とともに個々の EMCSs が大きくなっていることができた。すなわち、EMCSs が変化しミトコンドリアへの Ca^{2+} 移動を増強していると考えられている。この他、ミトコンドリアへの Ca^{2+} の移行を担う MCU の機能阻害が、線虫の加齢やジストロフィー症モデルでの体壁筋機能減退を抑えることを見出した。

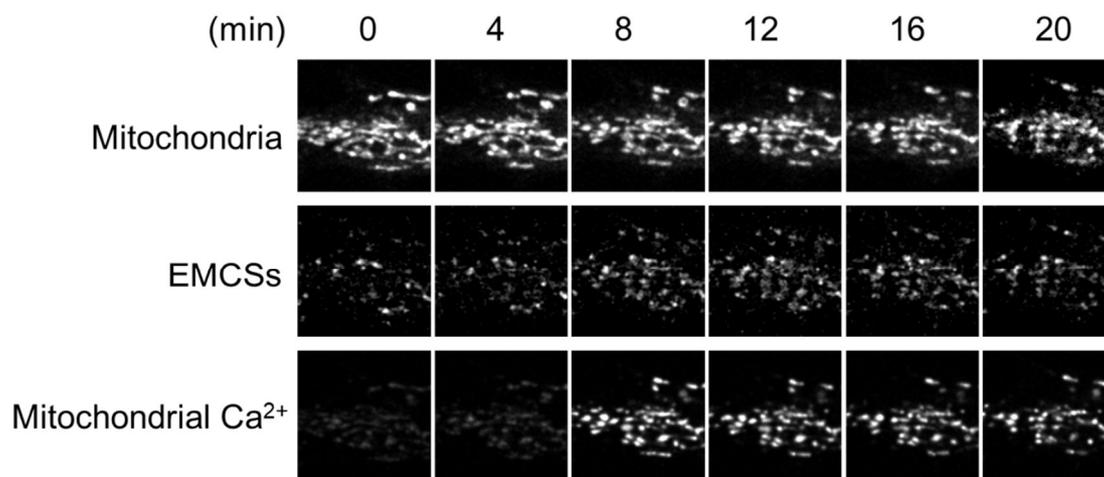


図4 .細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に誘導されるミトコンドリア Ca^{2+} 濃度上昇と EMCSs 量の増加
細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇部位でミトコンドリア Ca^{2+} 濃度が上昇し、また、EMCSs 蛍光シグナルが増強していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 小林 剛、田中瑞奈、寺西美佳、東谷篤志	4. 巻 55
2. 論文標題 ミトコンドリアにおける機械刺激受容	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 55 - 58
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 Higashitani A, Teranishi M, Nakagawa Y, Itoh Y, Sudevan S, Szweczyk NJ, Kubota Y, Abe T, Kobayashi T	4. 巻 37
2. 論文標題 Increased mitochondrial Ca ²⁺ contributes to health decline with age and Duchene muscular dystrophy in <i>C. elegans</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 e22851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202201489RR	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 小林 剛、田中瑞奈、寺西美佳、東谷篤志	4. 巻 4
2. 論文標題 ミトコンドリアに注目したメカノバイオロジー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 873 - 877
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 小林 剛、田中瑞奈、寺西美佳、東谷篤志	4. 巻 53
2. 論文標題 ミトコンドリアにおけるメカニカルストレス感知と応答	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 62 - 65
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 Ulla A, Uchida T, Miki Y, Sugiura K, Higashitani A, Kobayashi T, Ohno A, Nakao R, Hirasaka K, Sakakibara I, Nikawa T	4. 巻 704
2. 論文標題 Morin attenuates dexamethasone-mediated oxidative stress and atrophy in mouse C2C12 skeletal myotubes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Biochem Biophys	6. 最初と最後の頁 108873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.108873	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 Furuya K, Hirata H, Kobayashi T, Sokabe M	4. 巻 11
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate Induces ATP Release via Volume-regulated Anion Channels in Breast Cell Lines.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11080851	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 Kawamura Y, Hida T, Ohkawara B, Matsushita M, Kobayashi T, Ishizuka S, Hiraiwa H, Tanaka S, Tsushima M, Nakashima H, Ito K, Imagama S, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K	4. 巻 592
2. 論文標題 Meclozine ameliorates skeletal muscle pathology and increases muscle forces in mdx mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commu	6. 最初と最後の頁 87 - 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.003	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 17.寺西美佳、東谷篤志、小林 剛	4. 巻 6
2. 論文標題 モデル生物の筋萎縮とミトコンドリアCa2+	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Precision MedicinePrecision Medicine	6. 最初と最後の頁 659 - 662
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kobayashi T, Tanaka M, Teranishi M, Nikawa T, Higashitani A
2. 発表標題 Mechano-sensing of mitochondria in cultured animal cells
3. 学会等名 International Symposium on Mechanobiology for Human Health: 8 years progress in the AMED-CREST/PRIME project on mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kobayashi T
2. 発表標題 Cell Gravisensing Project
3. 学会等名 Joint CSA/ESA/JAXA/NASA ISS Increment 65 Science Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曾我部正博、小林 剛、二川 健、東端 晃
2. 発表標題 単一細胞における重力センシング機構の解明を目指して (Towards understanding the gravity sensing in single cells)
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会 「宇宙とメカノバイオロジー」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 剛、内田貴之、田中瑞奈、橋爪藤子、石毛智子、安西洋平、中山師生、梅村さや香、山崎誠和、鈴木智美、笠原春夫、梅原真澄、谷川直樹、嶋津 徹、伊藤 剛、東端 晃、二川 健、曾我部正博
2. 発表標題 国際宇宙ステーションにおけるライブセル共焦点イメージング
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第37回大会
4. 発表年 2023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			
米国	Ohio University			