

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09735

研究課題名(和文) Drp1を介した小胞体・ミトコンドリアの接触場の形成機構とアポトーシス誘導の役割

研究課題名(英文) Analysis of Drp1 mediated apoptosis through formation of ER-mitochondria contact site

研究代表者

西脇 優子 (Nishiwaki, Yuko)

沖縄科学技術大学院大学・神経発生ユニット・グループリーダー

研究者番号：20360620

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)：我々は、輸送異常によって視細胞が変性するゼブラフィッシュ -SNAP突然変異体において、小胞体上のSNARE蛋白であるBNip1が過剰な輸送の異常を検出し、BH3ドメインの活性化を介して細胞死経路を活性化することを報告した。本研究では、この視細胞死では、ミトコンドリア分裂に関わる蛋白であるDynamamin-related protein 1 (Drp1)が関与しており、Mffを介したミトコンドリア外膜への局在が -SNAP変異体の視細胞死を誘導するのに必須であることを確認した。この結果は、BNip1の細胞死活性により起こる細胞死には、小胞体-ミトコンドリア接触を必要とするというモデルを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞輸送の停滞による、小胞体ストレス応答については、多くの研究がなされているが、輸送の過度な活性化による細胞死機構については、我々のゼブラフィッシュ -SNAP変異体が初めての例である。本研究で焦点を当てるDrp1は、元来、ミトコンドリアの分裂を促進する因子として同定され、アポトーシスの誘導にも働くことが知られている。Drp1は小胞体-ミトコンドリア接触を安定化することが報告されているが、細胞死の誘導機構については未だ不明な点が多い。特に、Drp1がミトコンドリアの分裂とアポトーシスという2つの機能をどのように使い分けるのか、Drp1の活性化の仕組みや下流の経路など解明すべき重要な点である。

研究成果の概要(英文)：In zebrafish -snap1 mutant, retinal photoreceptors undergo apoptosis in response to vesicular fusion defects. We previously reported that a BH3-containing SNARE protein, BNip1, induces apoptosis in this mutant when vesicular transport is highly active. In this study, we found that Dynamamin-related protein 1(Drp1) is required for BNip1-mediated apoptosis. Drp1 is a key molecule to form ER-mitochondria contact site as a ground for mitochondria fission and apoptosis. During this process, Drp1 is recruited to the mitochondria outer membrane via binding to specific mitochondrial docking proteins including Mff, Mief1 and Mief2. We also found that BNip1-mediated apoptosis requires Mff. These results support our hypothesis that BNip1-mediated apoptosis requires the formation of ER-mitochondria contact probably through Drp1 recruitment to mitochondria outer membrane.

研究分野：神経発生

キーワード：小胞輸送 細胞死 ミトコンドリア Drp1 BNip1

1. 研究開始当初の背景

網膜の視細胞では、多くの光受容蛋白質が小胞体で合成され、ゴルジ体を經由して、外節と呼ばれる光受容膜へ輸送される。その輸送の破綻は細胞変性を引き起こし、網膜色素変性症に代表される網膜変性を示す遺伝疾患の原因となっている。これらについて原因遺伝子が同定されてきたが、光受容蛋白質の輸送の異常によって視細胞変性が誘導される仕組みについてはまだ不明な点が多い。ゼブラフィッシュの眼球は、組織化学的構造、生理活性、遺伝子発現パターンなど、多くがヒトと共通している。実際、ヒトの視細胞変性の原因遺伝子の変異が、ゼブラフィッシュでも同様の視細胞変性の症状を示すことが報告され、視細胞変性の仕組みを研究する良いモデルとなっている (Brockerhoff and Fadool, 2011, *Cell. Mol. Life Sci.* 68:651-659)。

我々は、ゼブラフィッシュの *-SNAP* 変異体において、視細胞が小胞輸送の破綻によってアポトーシスを起こし、変性することを見出した (Nishiwaki et al., 2013, *Dev. Cell* 25:374-387)。*SNAP* は、細胞内輸送において、輸送小胞と標的膜との融合を促進する。輸送小胞が標的膜に融合する際に、それぞれの膜に存在する *v-SNARE* 蛋白質と *t-SNARE* 蛋白質が相互作用し、*t-SNARE* と *v-SNARE* の複合体が形成される。この複合体は *cis-SNARE* 複合体と呼ばれるが、*SNAP* はこの複合体に結合し分解することで、*SNARE* のリサイクルを促進する。我々は、*-SNAP* 変異体の視細胞死は、細胞死誘導を担う *BH3* ドメインを持った *SNARE* 蛋白質である *BNip1* を介していることを発見した。*BNip1* は本来、*syntaxin18 SNARE* 複合体の *t-SNARE* 因子として、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を制御する。しかし、*-SNAP* 突然変異体では、*SNAP* の機能低下によって *syntaxin18 cis-SNARE* 複合体が解離できずに蓄積し、その結果、*BNip1* の *BH3* ドメインが活性化され、アポトーシスが誘導される。したがって、*BNip1* は *SNARE* 因子として輸送小胞の融合、*BH3* ドメインを介した細胞死の誘導という2つの機能を持った蛋白質である。また、*-SNAP* 突然変異体の視細胞がアポトーシスを起こす時期が、小胞輸送が活発になる時期と一致することから、*BNip1* は小胞輸送の過度な活性化に反応して、細胞死を誘導することを発見した (Nishiwaki and Masai, 2020, *Sci. Rep.* 10:17379)。

ミトコンドリアを經由した細胞死においては、*Bax/Bak* がミトコンドリア外膜上で多量体を形成して孔を開け、さらに、内膜側でクリステの構造が変化して内部のチトクロム C が膜間領域に開放された後、外膜にできた孔を通して細胞質へ放出されることで、下流のカスパーゼ経路が活性化され、アポトーシスが起きる。正常時には、ミトコンドリアの内膜融合に関わる *optic atrophy 1 (OPA1)* が、ミトコンドリアのクリステの袋状構造を閉じることで、チトクロム C の開放を抑えている (Pernas and Scorarro, 2016, *Annu. Rev. Phys.*, 78:505-531)。さらに、クリステからのチトクロム C の開放には、ミトコンドリア分裂を担う *Drp1* が関わっていることが示唆されている。更に、小胞体-ミトコンドリア接触が起こると、*Drp1* がその接触部位に移動し、SUMO 化されることで安定化し、クリステの構造変化とチトクロム C の放出に働くことが示された (Prudent et al., 2015, *Mol. Cell* 59:941-955)。一方、ヒトの培養細胞を用いた研究では、*BNip1* の過剰発現が *Drp1* の発現を上昇させ、ミトコンドリアの分裂を促進するという報告がある (Ryu et al., 2011, *J. Cell. Physiol.* 227:3027-3035)。実際に、我々は *Drp1* のモルフォリノアンチセンスを用いて、*Drp1* をノックダウンすると、ゼブラフィッシュ *-SNAP* 変異体の視細胞変性を抑えることを確認していたが、*-SNAP* 変異体で、*Drp1* がチトクロム C の開放に働くのかは明らかでなかった。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュ *-SNAP* 変異体の視細胞では、*BNip1* を介した細胞死経路により変性が起きる。本研究の最終目標は、*BNip1* を介した細胞死経路の全容を解明することである。*BNip1* の細胞死誘導能は、小胞体上で活性化されるが、このシグナルがどの様にミトコンドリア外膜上の *Bax/Bak* に伝えられるのかは不明である。我々は予備実験より、ミトコンドリア分裂に働く分子である *Drp1* が、*BNip1* を介した細胞死に関与する知見を得た。そこで、*Drp1* の活性化の仕組みや下流の経路などを明らかにすることで、*Drp1* が、*BNip1* が誘導する細胞死において果たす役割を検証した。

3. 研究の方法

まず、*BNip1* を介した細胞死が起きる過程に *Drp1* が関与していることを、モルフォリノによるノックダウンの手法に加えて、*Drp1* 変異体を導入することで検証を行なった。

次に、*BNip1* を介した細胞死の過程で、ミトコンドリアと小胞体の分布がどの様に变化するかを検証するため、それぞれの可視化を行なった。更に、*Drp1*、*BNip1* の分布を検証するため、これらの蛍光標識蛋白を作り、強制発現を行なった。

更に、ミトコンドリア可視化システムを用いて、*BNip1* が誘導する細胞死において、ミトコンドリアからチトクロム C の流出が起きているかを検討した。更に、チトクロム C の流出を抑制することで、*BNip1* を介した細胞死が緩和できるかを検討するため、ミトコンドリアのクリステの袋状構造を閉じるのに働く *OPA1* の強制発現を行い、症状の変化について検証した。

4. 研究成果

最初に、Drp1 のノックダウンによる BNip1 依存性の視細胞変性の抑制効果について、モルフォリノと変異体の両方で検証した。モルフォリノによる母性由来を含めた Drp1 の発現のノックダウンは、ゼブラフィッシュ *-SNAP* 変異体の視細胞変性を抑えることが出来た。したがって、Drp1 は BNip1 依存性の視細胞変性に関与することが確認できた。一方、Drp1 の変異体の導入した *-SNAP* 変異体の解析では、視細胞変性を抑えることが出来なかった。これは、ウエスタンブロットによる発現量の解析により、Drp1 変異体では、細胞死が起きる 3dpf まで、少量ではあるが母性由来の Drp1 が残っていることで、Drp1 を介した BNip1 の細胞死誘導が起きていると考えられた。Drp1 変異体は完全な致死性ではないが、性成熟するまで成長することがなかったため、母性由来の Drp1 を除くために Drp1 変異体メスを使用することが出来ない。そのため、以後のノックダウンの解析は、モルフォリノを使用した。また、Drp1 がミトコンドリア外膜へ局在するためには、アダプターとなる膜貫通型分子である MIEF、MFF などと結合する必要がある。多量体形成時に結合するとされている MFF のノックダウンをモルフォリノで行ったところ、*-SNAP* 変異体の視細胞死が抑制される傾向にあった。このことは、Drp1 がミトコンドリア外膜に局在することが、BNip1 依存性の視細胞変性に必須であることを示唆している。

次に、視細胞内での Drp1 の分布について検証するため、まず、EGFP 標識した Drp1 の mRNA を用いて、ミトコンドリア局在型 mKO(monomeric Kusabira Orange)の mRNA とのインジェクションによる共発現させ、LSM を用いてライブイメージングを行った。受精後 24 時間の網膜では、発現した Drp1 は一部が細胞質中にも広がったが、少量発現した細胞では特に、mKO で標識されたミトコンドリア上に点状に集積して分布することが確認出来た。これは、培養細胞などで見られる、小胞体-ミトコンドリア接触場への集積とよく似ており、同様の構造である可能性が示唆された。また、Drp1 を過剰に発現した細胞は、状態が悪くなることが確認されたため、受精後二日目以降の観察には、適切な発現量の調整が可能なドライバーが必要であることが判った。今後、一番自然に近い発現を再現する方法として、標識蛋白である EGFP もしくは tdTomato などを融合する形で、染色体状の Drp1 の N 末側へノックインを行う必要がある。

一方、以前の実験より、ゼブラフィッシュでは、EGFP 標識した BNip1 を過剰に発現させても、単体では細胞死を誘導しないことが判っていたので、ミトコンドリアを可視化した EF1a1:mls-dsRed のトランスジェニック系統(Kim, et al., 2008, *Bio Techniques* 45:331-334)に、ヒートショックプロモーターで EGFP 標識した BNip1 強制発現を行うコンストラクトをインジェクションすることで、BNip1 の細胞内の分布を検証した。標識された BNip1 の分布は、核の周辺など、小胞体の分布と一致した。驚いたことに、野生型の視細胞においても、核の周りから連続して伸びる構造がミトコンドリア近傍に到達しており、正常な状態の視細胞においても、小胞体とミトコンドリアが頻りに接触している可能性が示唆された。ただし、稚魚を用いたライブイメージングでは、視細胞内のオルガネラの詳細を観察するだけの分解能は得られなかったため、今後、眼球培養などの系を用いて、より良い分解能が得られる観察方法を立ち上げる必要がある。

次に、最初に、Drp1 の分布を、dsRed でミトコンドリアを可視化した系統を用いて、野生型と *-SNAP* 変異体で比較した。凍結切片上では、dsRed で可視化されたミトコンドリアは内節部分で球形の塊に見える。*-SNAP* 変異体では野生型よりサイズが少し小さく、標識の明るさも弱くなっていた。一方、Drp1 は、野生型では、ライブイメージングと同様に、ミトコンドリア上ではドット状に分布していた。*-SNAP* 変異体でも、同様にミトコンドリアのシグナルと重なって、ドット状に分布しているが、集積したサイズや明るさが弱く、ミトコンドリア上での分布の状態が異なる可能性が示唆された。

次に、*-SNAP* 変異体の視細胞死で、チトクロム C がミトコンドリアから細胞質へ放出されているか、検証を行なった。チトクロム C の放出について、Drp1 の分布の検証と同様に、凍結切片を用いて抗体染色での検出を行ったところ、*-SNAP* 変異体ではミトコンドリア外へ分布が広がっていることが確認出来た。したがって、BNip1 を介した細胞死誘導でも、チトクロム C のミトコンドリアからの放出が起きていると判った。チトクロム C を内包するミトコンドリアの内膜のクリステの袋状構造のゲートは OPA1 によって閉じられている。小胞体からミトコンドリアへのカルシウムの流入が起きると、OPA1 は OMA1 により分解され、その結果、クリステのゲートが開くことが報告されている。OMA1 のモルフォリノによるノックダウンは、受精後 2 日目までしか発現を抑えられない比較的低い濃度でも、小眼や心臓浮腫などの症状を引き起こすことが報告されていた。そこで、クリステからのチトクロム C の放出を検証するため、OPA1 の全長配列を用いて過剰に発現させることで、クリステの袋状構造の開放を抑えた場合に、ミトコンドリアからチトクロム C の放出が抑えられるか、細胞死は抑えられるのかを検証した。しかし、gnat2 プロモーターで視細胞特異的な発現を誘導した場合も、hsp プロモーターを使った強制発現を行った場合も、視細胞死は抑制されなかった。強制発現した OPA1 が全て OMA1 に分解されて抑制が出来ていない可能性があるため、今後、OMA1 の標的配列に変異を入れた OPA1 を作製して同様の検証を行う必要がある。

更に我々は、細胞内でのカルシウムの動向を検証するために、*-SNAP* 変異体へ、カルシウムセンサーである GCaMP7a を導入し、Rx:Gal4 もしくは Crx:Gal4 のドライバーと組み合わせた系統を確立し、ライブイメージングを行った。Rx プロモーターによる発現は、細胞死が起きる時期より前から GCaMP7a のシグナルを観察することが出来たが、網膜全体で発現するため、*-SNAP*

変異体の視細胞で特異的に上がるシグナルを検出することは出来なかった。一方、Crx プロモーターは、受精後 2 日目にはまだ一部の視細胞でしか発現が見られず、細胞死前の変化を見ることは出来なかったが、視細胞死が起きる受精後 3 日目には、一部の細胞が、視細胞が分布する外顆粒層から外れて丸くなっており、その細胞でシグナルが上昇しているのが確認された。このような細胞の移動と変化は、live-imaging で初めて捉えることが出来た。しかし、細胞死を起こす直前のカルシウムの変動は、主に細胞質に分布する型の GCaMP ではほとんど検出されないことから、更に詳細にためには、ミトコンドリア内のカルシウム変動が観察できる系を導入する必要がある。

今後、生体内の Drp1 の挙動と、細胞内オルガネラの構造の変化をライブイメージングで追い、更に、特徴的な変化を起こすポイントを電験などで詳細に解析することで、一連の細胞死までの経路で Drp1 の果たす役割を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西脇 優子
2. 発表標題 Drp1は小胞輸送の破綻による光受容細胞のアポトーシスに必要である
3. 学会等名 日本発生生物学会 第55回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西脇 優子
2. 発表標題 Drp1 is required for photoreceptor apoptosis in response to vesicular fusion defects
3. 学会等名 第28回 小型魚類研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西脇 優子
2. 発表標題 小胞輸送の破綻により引き起こされる視細胞変性におけるDrp1の役割
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------