

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：10101
研究種目：若手研究
研究期間：2022～2023
課題番号：22K15375
研究課題名（和文）なぜ上皮間葉転換でmitoNEET発現は抑制されるのか

研究課題名（英文）Why is mitoNEET downregulated during EMT?

研究代表者

半田 悠 (Haruka, Handa)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：00844721

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)は、創傷治癒や個体発生といった正常状態のみならず、癌の悪性度進展やケロイド形成といった病態に深くかかわるため、EMTの細胞生物学的理解を深めることは、疾患の治療においても重要である。本研究では、ミトコンドリアの外膜上タンパク質がミトコンドリアの機能に影響を与え、さらには細胞機能としての運動能に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ミトコンドリアの外膜タンパク質が、酸化リン酸化に影響を与えるだけでなく、細胞機能としての運動能に影響を与えることを示した点が新しく、さらにその外膜タンパク質のミトコンドリア上における局在が重要であることを示唆させるデータが得られた。この結果により、ミトコンドリア外膜タンパク質の新たな制御機構が示唆された点で、ミトコンドリアバイオロジーに新規の概念を提供できた。

研究成果の概要（英文）：Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is involved not only in normal conditions such as wound healing and development, but also in pathological conditions such as malignant progression of cancer and keloid formation. Therefore, a better understanding of the cellular biology of EMT is important for developing therapies to treat diseases.

In this study, we demonstrated that a certain protein on the mitochondrial outer membrane affects mitochondrial function and, moreover, motility as a cellular function.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで上皮間葉転換(EMT)による癌の悪性度進展について研究を行ってきた。また、共同研究として、年齢依存的な心筋特異的 mitoNEET の発現減少と心不全との関係について解析を行ってきた。今回、マウス正常乳腺上皮細胞(NMuMG 細胞)において EMT 誘導による mitoNEET 発現減少を発見した。そこで、EMT に伴う運動能獲得を担保する細胞内環境の構築を解く手がかりとして、まず mitoNEET と運動能との関連を調べたところ、mitoNEET 強制発現系では、明らかに wound healing assay および 3D 運動能に影響が生じることがわかった(下図)。一方で、細胞のランダムな運動速度は mitoNEET 強制発現系でわずかに減弱するが、その速度差だけでは wound healing assay の影響を説明できず、ランダム運動よりも指向性の運動に mitoNEET が関わることを強く示唆する。本研究の対象である mitoNEET は、二量体を形成するミトコンドリア外膜タンパク質で、鉄-硫黄中心を持ちミトコンドリアの OXPHOS 活性に関与するとされているが、詳細な機序は明らかではない。最近、mitoNEET がミトコンドリア間に存在しミトコンドリアの動態制御の一端を担うことや、mitoNEET が Parkin/PINK1 と協調し膵島細胞の mitophagy に関与することが報告されている。しかしながら、EMT のようにダイナミックに細胞動態が変化する状況で、mitoNEET の発現制御機構や OXPHOS 活性の制御機構、ミトコンドリア動態への影響が明らかにされた例は無い。そのため、既に報告されている OXPHOS への働きとは異なる機能を mitoNEET が持つと推測できる。mitoNEET のようにミトコンドリア外膜に存在するタンパク質が運動能に影響を与える現象を解析した例はほとんどなく、これまで知られてきた mitoNEET の機能とは異なる機能を明らかにしうるうえで、重要な課題と考えられる。

2. 研究の目的

個体発生や創傷治癒で見られる上皮間葉転換(EMT)は、癌の悪性度進展やケロイド形成に深く関与する。申請者は今回「EMT において mitoNEET の発現が減弱する」ことを見出し、さらに「mitoNEET が細胞の指向性運動に関与しうることを示唆するデータを得た。EMT の誘導機構や、運動能に寄与する細胞骨格の制御については、多くが明らかとなっているが、その力学的分子装置を駆動するための環境を細胞がいかに構築するかについてはほとんど解明されていない。mitoNEET はミトコンドリア外膜に存在し、鉄-硫黄クラスターを保持するタンパク質であり、ミトコンドリアの Redox sensor として機能しているとされ、さらに OXPHOS 活性にも影響を与えうるが、未だその分子機構は不明瞭である(引用文献)。mitoNEET が加齢による心不全に関連することを以前、共同研究で報告している(引用文献)。そこで、本研究においては mitoNEET の OXPHOS と運動能に対する影響とその分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- I. mitoNEET の変異体を導入した NMuMG 細胞株を作製し、Oxygraph-2k を用いて EMT 前後の OXPHOS capacity を測定した。
- II. mitoNEET 強制発現および変異体発現 NMuMG を用いて運動能を測定した。評価系として random walking, wound healing, transmembrane assay の系を確立し、2D と 3D の運動能を評価した。さらに隘路における細胞運動を観察できる系の構築に着手した。
- III. HA タグ抗体を用いて、IP-MS を行い、mitoNEET と相互作用する分子を探索した。
- IV. mitoNEET のミトコンドリア上の分布評価を行う目的で、Biotin 化酵素をドキシサイクリン誘導性に発現できる構築を導入した。
- V. 組織学的な評価のために、5 nm 金コロイドを用いた免疫組織染色を行い、電子顕微鏡で行った。
- VI. EMT 誘導前後、および mitoNEET 発現の有無によってミトコンドリア呼吸鎖複合体(電子伝達系)の構成に影響があるか否かを、ミトコンドリアを粗精製し Blue-Native PAGE で展開することにより評価を行った。

4. 研究成果

上記3「研究の方法」に対応させて記載する。

- 3-I : EMT 前後で OXPHOS 活性が変化することをすでに見出しており, mitoNEET 強制発現によって, その変化が見られなくなることを確認した。一方で, mitoNEET 変異体発現細胞においては, 正常型と同様の変化が見られたことから, mitoNEET の変異導入部位が, EMT 前後の OXPHOS 活性に重要であることが明らかとなった。
- 3-II : mitoNEET 強制発現細胞において, random 2D 運動, wound healing, transmembrane assay の系で EMT 誘導後の運動能が正常型と比して減弱することを見出した。一方で, mitoNEET 変異体発現細胞においても同様の結果であったことから, 運動能に関して, mitoNEET 変異導入部位が機能しているとは限らないことが分かった。隘路観察については, 系の確立が完成しなかった。
- 3-III : ミトコンドリア関連タンパク質が複数検出できた。そのなかに, ミトコンドリア内膜タンパク質が複数存在していたため, mitoNEET のミトコンドリアにおける局在を再考する必要が生じた。
- 3-IV : Biotin 化酵素の発現部位に応じて mitoNEET が Biotin 化されていることを確認した。
- 3-V : ミトコンドリア外膜のマーカーとして, Tomm70, 内膜のマーカーとして Timm50 を利用し, 得られた電顕像から mitoNEET を含むそれぞれの存在分布を記録した。
- 3-VI : EMT 誘導および mitoNEET 発現の有無によって構成が大きく変わることを見出すことはできなかった。

以上の結果から, mitoNEET が EMT で発現減少することは, ミトコンドリアの OXPHOS capacity を増加させ, ひいては運動能に貢献することが明らかとなった。しかし, mitoNEET がミトコンドリアの電子伝達鎖に影響を与える分子機構については, 今後の課題である。

【引用文献】

Eddie T, Gary S. MitoNEET Provides Cardioprotection via Reducing Oxidative Damage and Conserving Mitochondrial Function., *Int. J. Mol. Sci.*, 25 (1), 480, 2024.

Furihata T, Takada S, Kakutani N, Maekawa S, Tsuda M, Matsumoto J, Mizushima W, Fukushima A, Yokota T, Enzan N, Matsushima S, Handa H, Fumoto Y, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Tanaka S, Tsutsui H, Sabe H, Kinugawa S. Cardiac-specific loss of mitoNEET expression is linked with age-related heart failure., *Commun. Biol.*, 29;4 (1):138, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 半田悠
2. 発表標題 上皮間葉転換(EMT)でミトコンドリア機能や動態はどう関わっているのか
3. 学会等名 生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 半田悠
2. 発表標題 上皮間葉転換におけるミトコンドリア機能制御機構
3. 学会等名 ミトコンドリア学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 半田悠
2. 発表標題 上皮間葉転換における酸化的リン酸化の制御機構
3. 学会等名 シグナルネットワーク研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 半田悠
2. 発表標題 上皮間葉転換におけるmi toNEETの働き
3. 学会等名 生化学会大会
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
---------	---------