

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657124

研究課題名(和文)細胞質交換法を駆使した神経分化過程及び病態時のミトコンドリア形態制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of morphological changes of mitochondria during neural differentiation and under disease condition by using cell-resealing technique

研究代表者

村田 昌之(Murata, Masayuki)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：50212254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット視交叉上核腹外側部由来の神経細胞株・N14.5の分化過程や神経変性疾患におけるミトコンドリア形態を「(セミンタクト細胞)リシール法」を駆使して分析的に可視化再構成し、「神経細胞分化過程や病態環境下での」ミトコンドリア形態制御機構の分子基盤として、GSK3 $\beta$ /AktのキナーゼネットワークによるDrp1のリン酸化制御があることを明らかにした。また、分化または病態におけるミトコンドリア形態及び機能研究にセミンタクト細胞リシール法が有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We established a neural cell line N14.5-Tom5 cells, in which mitochondrial protein GFP-Tom5 is stably expressed. By using N14.5-Tom5, we found that activation of GSK3 $\beta$  or Akt was involved in mitochondrial fission during neural differentiation, and identified the phosphorylation of Drp1, dynamin-related GTPase, by GSK3 $\beta$  regulated the fission. Interestingly, the phosphorylation of Drp1 is reported to be required for the mitochondrial fission at the onset of mitosis in mammalian cells. Next, we constructed model cells that replicated the conditions in neurons of Alzheimer's disease by using the resealing-cell technique and cytosol prepared from ApoE(-/-) mouse. As a result, we found that inactivity of Akt in the model cells caused the elongation of mitochondria and resulted in depressed mitochondrial function. Collectively, the persistent phosphorylation of both GSK3 $\beta$  and Akt plays a crucial role for the maintaining normal mitochondrial morphology and function.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 神経科学 細胞・組織 セミンタクト細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは膜融合と膜分裂を繰り返しその形態をダイナミックに変化させている。この膜融合はミトコンドリア膜の幾つかの膜タンパク質 (Mf1、Mf2、Opa1 など) が担っており、膜分裂は主に細胞質に存在する GTPase である Drp1 (Dynamin-related protein 1) が、細胞内・外のシグナル伝達の制御を受けミトコンドリア膜上に移行しその受容体膜タンパク質・Fis1 と複合体を形成することで正確に制御されている。つまり、ミトコンドリアの形態 (主に長さや容積) は、この融合装置と分裂装置のタンパク質発現量や機能発現バランスによって巧みに制御されている。近年、このバランス変化・攪乱によるミトコンドリアの形態変化が様々な細胞病態発現や分化・発生過程と密接に関わることがわかってきた。例えば、Drp1 ノックアウトマウスでは、ミトコンドリア分裂不全が起こりシナプス形成不全やインスリン分泌不全などが誘起されることが報告されている。また、パーキンソン病の原因タンパク質であるパーキンは、酸化ストレスによる神経細胞のミトコンドリアの形態維持に関わるため、その機能攪乱は神経細胞の機能不全を誘起するとされている。このように、分化過程、病態環境下における細胞を用いたミトコンドリアの融合・分裂のバランス制御機構の解明は、多くのミトコンドリア病の発症機構の解明とその創薬ターゲット同定のためにも重要になってきている。しかし、分化や病態に伴うミトコンドリア形態変化の解析は、疾患個体・組織 (またはその病態モデル動物) から抽出された細胞組織に対して行われる固定サンプルを用いた形態観察が殆どであること、また、融合・分裂に関わるタンパク質群の発現が連動して変化するため、タンパク質の過剰発現系やノックダウン法によるタンパク質発現系を用いた解析では、その制御因子探索やメカニズム解明は非常に困難であるのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ラット視交叉上核腹外側部由来の神経細胞株・N14.5 の分化過程や神経変性疾患におけるミトコンドリアの形態変化を、当研究室が独自に開発してきた「セミインタクト細胞リシール法」を駆使して分析的に可視化再構成し、「神経細胞分化過程や病態環境下での」ミトコンドリア形態制御機構解析のツール構築とそれを用いた形態制御機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

ミトコンドリアの形態制御研究にセミインタクト細胞を用いることが、本申請研究の最大の特徴である。セミインタクト細胞とは、連鎖球菌の酵素感受性毒素であるストレプトリシン 0 (streptolysin O: SLO) などを形質膜に作用させることにより、形質膜を部分

的に透過性にした細胞のことである。オルガネラや細胞骨格のトポロジーを保持したまま、細胞質を流出させることができる。ここに (細胞を一個の試験管に見立てて) 新たに外部より細胞質成分と ATP 再生系などを添加し、細胞質に依存的な細胞内のイベントを再構成し、その中で生起する生命現象を生物物理学的、生化学的に解析できる。例えば、正常細胞をセミインタクト細胞にし、そこに病態細胞から調製した「病態細胞質」を導入することにより「病態モデル細胞」が作成でき、その中で病態特有に生起する生命現象 (本申請研究の場合は、単一細胞内のミトコンドリア動態・形態変化など) を、細胞質依存的に分析的に再構成することができる。例えば、添加する細胞質と同時に抗体や大腸菌で作成したドミナントネガティブ型リコンビナントタンパク質を加え、様々な細胞内現象への影響を解析することにより、添加した抗体やタンパク質の制御因子に与える影響を調べることができる。当研究室ではこのセミインタクト細胞アッセイ系を用いて、細胞周期依存的オルガネラ形態変化、小胞輸送過程などを可視化再構成し、それらの過程に関わるタンパク質・膜動態の可視化解析を行い、その過程の制御因子の同定・検定を行ってきた実績がある。また、最近、Ca<sup>2+</sup> 依存的に SLO によってできた細胞膜上の孔を閉じることで、細胞質を交換後に再び生細胞 (リシール細胞) に戻すことが可能となった。そのため、ミトコンドリアのように、細胞膜の穿孔により細胞質内のイオン環境が変化してその形態に影響が出そうなオルガネラ研究が十分可能となった。加えて、ミトコンドリア形態研究では、融合・分裂に関与するタンパク質群が連動して発現変動するため、発現系を用いた細胞レベルの研究が難しいが、セミインタクト細胞系では、ミトコンドリア膜タンパク質 (膜融合に関わるタンパク質群) の量を一定したまま、導入する細胞質のみに依存したミトコンドリア形態変化とそれに必要な細胞質制御因子の探索・機能解析ができる利点がある (図 1)。

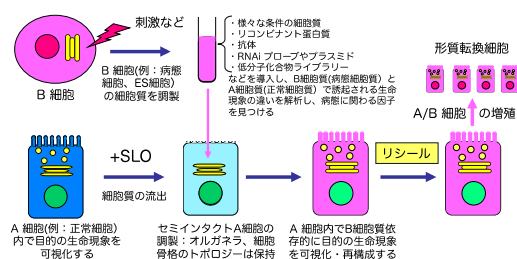


図 1

本研究の準備として、(i) 現有のラット視交叉上核腹外側部由来神経細胞株・N14.5 の分化過程において、ネットワークを形成している長いミトコンドリアが分化誘導と共に細かくフラグメント化されていくことを形態的に確認している。(ii) ミトコンドリアを

GFP可視化したCHO(Chinese hamster ovary)細胞に対し、「セミンタクト細胞リシール技術」を用いることで、糖尿病細胞質依存的なミトコンドリア分裂を再現できることを確認している。また、(iii)セミンタクト細胞アッセイ及びそのリシール細胞作成・解析技術、細胞質調製技術、大腸菌や無細胞翻訳系を利用したリコンビナントタンパク質の作成と精製技術、共焦点レーザー顕微鏡を中心とした細胞内タンパク質動態の可視化技術などに関するノウハウを蓄積している。

#### 4. 研究成果

(1) N14.5「生細胞」のミトコンドリア形態変化の観察：

ラット視交叉上核腹外側部由来の神経細胞株・N14.5のミトコンドリアをMitotrackerで蛍光可視化し、分化誘導前、または誘導後1~4日の細胞のミトコンドリア形態を経時的に観察した。ミトコンドリアは分化誘導直後に分裂し小型化していることを確認できたが、興味深いことに、分化誘導2~3日後には元の状態よりもむしろ伸長化したミトコンドリアの割合が増加していることが分かった。また、融合に関わると予想されるタンパク質群(Mfn1、Mfn2)、分裂に関わるタンパク質(Drp1)について、誘導前後のタンパク質発現量をWestern blotting法により比較したが、そのタンパク質量に大きな変動はなかった。

(2) ミトコンドリア形態可視化追跡細胞株の樹立：

ラット視交叉上核腹外側部由来の神経細胞株・N14.5の未分化細胞(増殖型繊維芽状細胞)を用い、ミトコンドリア形態がGFP可視化追跡できる細胞株を樹立した。可視化プロープには、神経分化に影響を与えないことを確認されたミトコンドリア外膜タンパク質・Tom5のGFP融合タンパク質(Tom5-GFP)を用い、細胞質ができるだけ広くミトコンドリアの2次元的な形態変化が観察しやすいTom5-GFP恒常発現株細胞(N14.5-Tom5)を可視化法によりスクリーニングした。その結果、ミトコンドリア形態をGFP可視化できるN14.5-Tom5の未分化細胞を多数得ることに成功した。多数のクローンの内、温度依存的(N14.5細胞は、33~39℃に温度シフトすることで神経細胞に分化する)に神経細胞様に分化するクローンとして2種類の細胞株を得た。

(3) セミンタクト細胞リシール法を用いた神経細胞分化に伴うミトコンドリア形態解析系の構築：

本研究課題を遂行するために、最も重要な「N14.5細胞の未分化細胞からセミンタクトリシール細胞を作成し、温度シフトによりそのリシール細胞を分化させる」という基礎

技術の構築を行った。N14.5の未分化細胞を様々な条件下でセミンタクト細胞化し、L5178Y細胞の細胞質を導入した後にリシールN14.5細胞を作成した。リシール細胞作成条件を検討した結果、再現性良く、かつ高効率(70~80%)でリシール細胞を作成する条件を決定した。また、そのリシール細胞が、温度依存的に効率よく(約60%)神経細胞に分化することを形態学的に確認した。

(4) 神経分化過程におけるミトコンドリアの形態変化を制御する細胞質因子の探索と検証：

生細胞の神経分化過程において、ミトコンドリア形態の断片化とその後の伸長化というドラスティックな形態変化が生起することを発見した。そこで、キナーゼ阻害剤ライブラリー(90種類)を用いて、光学顕微鏡レベルでミトコンドリア形態を攪乱させる(断片化又は伸長化)阻害剤を網羅的にスクリーニングしたところ、代表的な成長因子活性化に関わるPI3K/Akt経路の阻害剤群がミトコンドリアの形態変化(伸長化)を誘起することを見つけた。同時に、神経分化に必須とされるキナーゼGSK3のLiClによる活性低下が、ミトコンドリアの伸長化を促進することも発見した。Akt及びGSK3の活性はお互いに拮抗することが知られているため、神経分化過程に見られるミトコンドリアの伸長過程は、活性が拮抗する2つのキナーゼAkt/GSK3の活性比に依存しているのではなく、むしろ、AktまたはGSK3のどちらかの活性低下に強く依存しており、両キナーゼの活性化はミトコンドリア形態の断片化に必須であると考えられた。

神経細胞N14.5の分化初期過程におけるミトコンドリア断片化を活性化させるタンパク質候補として、ミトコンドリア外膜に結合することが知られているDrp1に注目した。GSK3の活性を阻害することで知られているLiClで細胞を処理したり、または、GSK3をロックダウンした細胞では、上記のタンパク質・Drp1のSer265のリン酸化が阻害され、かつ、ミトコンドリアの伸長が観察された。Drp1のSer265は、細胞分裂期(M期)のマスターキナーゼであるcdc2キナーゼによってリン酸化され、それによって細胞質からミトコンドリア膜に移行するDrp1がM期におけるミトコンドリア断片化を促進することが知られている。以上の結果より、神経細胞分化の初期過程に見られるミトコンドリアの断片化は、GSK3の活性化によるDrp1のSer265のリン酸化によって誘起される可能性が出てきた。この結果は、GSK3の活性制御機構研究を通して神経細胞分化過程のDrp1を含むキナーゼネットワーク解析を行うことの重要性を示唆した。

一方、アルツハイマー病モデルマウス(ApoE(-/-)マウス)脳から調製した病態細胞質をセミンタクトN14.5-Tom5細胞内に導

入し、リシールして「病態モデル神経細胞」を作成した。この病態モデル神経細胞では、ミトコンドリア形態の伸長化が観察され、Akt 活性の低下や、ミトコンドリア依存的な ATP 産生能の低下が検出された。

これらの結果を総合的に考察すると、神経病態（例えば、アルツハイマー病）発現とミトコンドリア形態の関係を研究する上では、病態細胞内での GSK3 または Akt による Drp1 のリン酸化状態の制御機構の攪乱を研究することの重要性と、その研究ツールとしてわれわれの作成した病態モデル神経細胞の有用性が確認された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Fujiki, K., Shinoda, A., Kano, F., Sato, R., Shirahige, K., Murata, M. (2013) PPAR  $\alpha$ -induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. Nature Communications. 4. Article number: 2262. doi:10.1038/ncomms3262.<査読あり>

Kano, F., Murata, M. (2013) The Semi-Intact Cell System and Methods for Cell Resealing: a Novel Systems Biology Tool to Elucidate Protein Networks with Spatio-Temporal Information. Advances in Systems Biology. 2(1): 6-14. <査読あり>

Kano, F., Nakatsu, D., Noguchi, Y., Yamamoto, A., Murata, M. (2012) A Resealed-Cell System for Analyzing Pathogenic Intracellular Events: Perturbation of Endocytic Pathways under Diabetic Conditions. PLoS ONE. 7(8):e44127. <査読あり>

加納ふみ、村田昌之 (2012) 哺乳動物細胞ゴルジ体の細胞周期依存的ディスアッセンブリー、生体の科学、63 巻 5 号、404-407. <査読無し>

菅原太一、加納ふみ、村田昌之 (2012) 新しい機能を問われ出した小胞体-ゴルジ体中間区画 (ER-Golgi intermediate compartment: ERGIC)、生体の科学、63 巻 5 号、424-425. <査読無し>

村田昌之、加納ふみ (2012) セミンタクト細胞リシール法を用いた「病態モデル細胞」作製とその疾患研究への応用、化学と生物、Vol.50 (No.7) pp510-517. <査読無し>

Sugawara, T., Nakatsu, D., Kii, H., Maiya, N., Adachi, A., Yamamoto, A.,

Kano, F., Murata, M. (2012) PKC $\delta$  and e regulate the morphological integrity of the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) but not the anterograde and retrograde transports via the Golgi apparatus. Biochem. Biophys. Acta (Molecular Cell Research), 1823(4):861-875. <査読あり>

Murata, M., Kano, F. (2012) Semi-intact cell system: Application to the analysis of membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus and of cell cycle-dependent changes in the morphology of these organelles. in Crosstalk and Integration of Membrane Trafficking Pathways. (Weigert, R. ed.) INTECH (ISBN 978-953-51-0515-2) <査読無し>

[学会発表](計 5 件)

加納ふみ、村田昌之. セミンタクト細胞リシール法を用いた病態モデル細胞の創成. 第 65 回日本細胞生物学会大会. シンポジウム「細胞への蛋白質導入技術と蛋白質イメージング技術」2013 年 6 月 19 日. ウィンクあいち. 依頼講演. 堀内雄太、加納ふみ、野口誉之、村田昌之. セミンタクト細胞リシール技術を用いた糖尿病モデル細胞の構築: 病態依存的なエンドサイトーシス攪乱. 第 65 回日本細胞生物学会大会 (名古屋) 2013 年 6 月 19 日.

Fumi Kano, Daiki Nakatsu, Yoshiyuki Noguchi, Yuta Horiuchi, Masayuki Murata. Disease model cell system: a novel proteomics tool to elucidate protein networks with spatio-temporal information. The 12th Human Proteome Organization Congress, Yokohama, Japan, September 16, 2013.

野口 誉之, 堀内 雄太, 中津 大貴, 加納 ふみ, 村田 昌之. セミンタクト細胞リシール技術を用いた糖尿病モデル細胞の構築. 第 51 回日本生物物理学会年会. 2013 年 10 月 29 日. 京都国際会議場.

Masayuki Murata, Fumi Kano. A Resealed-Cell System for Analyzing Pathogenic Intracellular Events: Insight into Signal Transduction Cascade in Hyperlipidemic or Diabetic Cells. The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012) Nov. 27, 2012. Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田昌之 (MURATA Masayuki)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：5 0 2 1 2 2 5 4