

令和元年6月7日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19047

研究課題名(和文)ミトコンドリア由来小胞の形成と神経変性疾患の関係性

研究課題名(英文) Investigation of mitochondrial-derived vesicles in neurodegenerative disease

研究代表者

田中 敦 (Tanaka, Atsushi)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：60404000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアには細胞内で利用される鉄の多くが適切に運ばれ代謝に用いられている。ミトコンドリアに運ばれた後にどのような代謝ステップが異常になると疾患が引き起こされるかについて、本研究ではミトコンドリアがストレスにตอบสนองする際に示す反応のひとつとして新たに見出した、ミトコンドリア由来小胞の形成と神経変性疾患との関わりについて検討した。結果ミトコンドリアは細胞内の鉄分布や代謝の必要性に応じて、他の細胞内小器官と密接に連携しつつその恒常性を保つために、小胞形成をすることを明らかにした。これらシステムの異常は細胞のストレスへの脆弱性を増悪させることから、その生理的意義についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアの機能異常が蓄積すると、酸化ストレスなどの蓄積による細胞内の環境悪化が引き起こされ、その結果さまざまな進行性疾患に至ることは、疾患とミトコンドリアの関係性として広く受け入れられるようになった。しかしながら、そこに至る過程にはさまざまなミトコンドリア機能異常を引き起こす原因があり、今回明らかにした鉄代謝の恒常性維持にミトコンドリアが積極的に関わっているという知見は、その異常を原因とする鉄の代謝異常と発がん、老化などの関係性に新たなメカニズムを提示したと考えられる。今後予防医学や早期異常検知といった観点からも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of dysfunctional mitochondria due to the impaired quality control system links to multiple human disorders.

We investigated how mitochondria send information to other organelles or receive it from them to change their function and dynamics. In a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y, mitochondrial-derived vesicles (MDVs) are formed in response to interference with iron metabolism. Mitochondria recruit endo-/lysosomes to sites of budding MDVs; MDVs are then formed from the body of mitochondria. Upon the formation of MDVs, this inter-organelle contacts likely create sites for transfer of mitochondrial materials to endo-/lysosomes. Interestingly, this event does not require canonical autophagy system. Once this mechanism is disrupted, dysregulation of iron dynamics might be exacerbated by the abnormal iron distribution in a cell and then linked to the pathogenic condition.

研究分野：細胞生物

キーワード：ミトコンドリア リソソーム 鉄代謝 鉄動態 接触 エンドソーム

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞の生存に必須な機能を多く有している細胞内小器官であり、特にヘム合成や鉄-硫黄クラスター形成のためには、細胞内に取り込まれた鉄が正しくミトコンドリアまで運ばれ、代謝・維持されなければいけない。細胞に取り込まれた鉄の輸送やミトコンドリアへの取り込み(鉄の動態)とそのメカニズムの破綻による疾患発症については、その詳細な分子病態は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

これまでに、鉄動態異常により誘導されるミトコンドリアのストレス応答性の小胞形成を見出している。本計画では、ミトコンドリアによる細胞内鉄動態異常にตอบสนองする小胞形成の分子メカニズムと、その破綻による病態を明らかにすることで、細胞内環境維持と鉄の関係性を明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア鉄異常とストレス応答性小胞形成の生理的意義について

これまでにミトコンドリア機能異常の初期段階における鉄減少が認められている、オートファジー欠損マウス(肝臓あるいは神経系特異的欠損)を用い、形態学的、組織学的、生化学的に細胞内環境を評価した。さらに組織・細胞における鉄欠乏の進行に合わせて出現すると予想される、ミトコンドリア由来小胞の形成を生体内で検出することを試みた。

培養細胞(肝臓由来細胞、神経由来細胞株)を用いた検討では、ミトコンドリア小胞形成を誘導可能な鉄キレート剤処理により、細胞内に鉄が枯渇した状況で、時間経過とともに生じる小胞の特異的な構造的特徴(外膜以外に含まれるミトコンドリア由来の構造:内膜や膜間の構成物)を検討した。合わせて、鉄欠乏を起因とした転写レベルでの変化をトランスクリプトーム解析で明らかにし、小胞形成に関与すると想定される因子を検索した。検索で得られた候補因子を発現阻害することにより、小胞形成に与える影響も評価した。

(2) ミトコンドリア機能制御のための鉄動態の重要性と疾患との関わりについて

ミトコンドリア機能を積極的に制御(ファインチューニング)する手法への展開を視野に入れ、マウス肝臓の生理的変化もしくは培養細胞の形態的な変化を指標に、その回復法を検討した。手法を確立したミトコンドリア由来小胞の精製法(段階的遠心による分画と密度勾配による分離)を用い、鉄欠乏ストレス下で形成されるミトコンドリア小胞の特異的内包物をマスマスペクトロメトリー解析により検討した。これらの検討結果に基づき、鉄代謝異常から起こるミトコンドリア機能崩壊を防ぐ、あるいは回復させる手段を検討した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア鉄異常とストレス応答性小胞形成の生理的意義について

オートファジー欠損した肝臓において、ミトコンドリアが鉄欠乏状態に陥る段階でも、形態学的にはミトコンドリアの構造が保たれていることが明らかとなり、組織学的にはまだ炎症などストレスが蓄積していることも認められなかった。一方でミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成するサブユニットタンパク質に、特異的な脱落(減少)が認められ、呼吸鎖活性も時間経過とともに減少することが明らかとなった。ミトコンドリア内の鉄欠乏については、その現象はミトコンドリア機能異常へと至る過程のごく初期段階であることが示唆された。

培養細胞を用いた検討では、鉄が枯渇した状態(鉄キレート時)に、有意なミトコンドリア小胞の形成が認められ、この小胞は一過性に数を増やし、時間経過とともに再度減少していくことが明らかとなった。構造を詳細に検討したところ、ミトコンドリアの外膜と内膜を含み、内容物が疎である構造(直径~100nm程度)、さらに外膜成分、内膜成分ともに、特異的に含まれるものと含まれない(排他されている)ものがあることが明らかとなった。このことは、小胞の形成に、選択的なメカニズムが鉄ストレスにตอบสนองして働くことを示唆した。

さらに、鉄キレート処理からの時間経過ごとのトランスクリプトームを実施し、小胞形成に必要と予想される因子の転写変化、鉄代謝応答性と思われる因子の転写変化などを捉えた。これら小胞形成時に変化する因子について、発現阻害実験による小胞形成への影響を検討したところ、いくつかの因子で小胞形成(鉄代謝ストレス応答)に必須であることを明らかにした。

(2) ミトコンドリア機能制御のための鉄動態の重要性と疾患との関わりについて

ミトコンドリア小胞の内包物として同定されたものについて、さらなる解析を進め、ミトコンドリアが細胞内の鉄の代謝状態、存在量を敏感に察知し、応答していることが明となった。つまり、細胞質内・ミトコンドリア内で利用される鉄については、厳密なセンサーとしてミトコンドリアが機能していることが考えられた。その際に他のオルガネラとの協調が予想されたことから、鉄代謝ストレス応答性のミトコンドリア小胞形成時に他のオルガネラとの関係を検討したところ、酸性オルガネラのミトコンドリアへの接触が、有意に観察され、このことがミトコンドリア小胞形成に必須であることも明らかになった。

ミトコンドリア小胞形成を阻害した場合、細胞はいち早く細胞死へと至る過程を進めることも明らかになった。このことは、ミトコンドリアが細胞内鉄代謝状態を察知し、それに応答することが重要な生理的な意義を持つことを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Cakir Zeynep, Funk Kathrin, Lauterwasser Joachim, Todt Franziska, Zerbes Ralf M., Oelgeklaus Aline, Tanaka Atsushi, van der Laan Martin, Edlich Frank
Parkin promotes proteasomal degradation of misregulated BAX
Journal of Cell Science, 2017(130):2903-2913 査読あり DOI: 10.1242/jcs.200162

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) Atsushi Tanaka, Konno Y, Abe M, Ishizaki M, Mattie S, McBride HM
Mitochondrial dynamics and cellular iron homeostasis.
Gordon Research Conference (Mitochondrial Dynamics and Signaling)(国際学会)
2019 年
- (2) Atsushi Tanaka, Konno Y, Abe M, Ishizaki M, Mattie S, McBride HM
Mitochondrial dynamics and cellular iron homeostasis.
Keystone Symposia on Mitochondrial Biology (joint with Selective Autophagy) (国際学会)
2018 年
- (3) Atsushi Tanaka
Mitochondrial dynamics and cellular iron homeostasis
The 1st International Mitochondria Meeting for Young Scientists(招待講演)(国際学会)
2018 年
- (4) 田中 敦
ミトコンドリアが感知し応答する細胞内鉄代謝の変化とミトコンドリアダイナミクス.
第 42 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会(国内学会)
2018 年
- (5) 田中 敦, 井上 弘章, Mattie S, McBride H
ミトコンドリアが感知する細胞内鉄動態と応答するミトコンドリアダイナミクスの変化
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(Conbio2017, 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会)(国際学会)
2017 年
- (6) 川岸 由, 久保 純, 松本 健, 田中 敦, 小椋 利彦, 野村 慎一郎
巨大リボソーム電気融合による異種細胞へのミトコンドリア導入
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(Conbio2017, 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会)(国際学会)
2017 年
- (7) 田中敦
ミトコンドリアのストレス応答からみた細胞小器官接触場の形成と細胞内鉄動態恒常

性の関係
第 53 回 肝形態科学研究会(招待講演) (国内研究会)
2017 年

- (8) 田中敦
ミトコンドリアのストレス応答からみたオルガネラ接触場の形成と細胞内鉄動態恒常性の関係
第 379 回 回川崎医学会講演会(招待講演) (国内研究会)
2017 年
- (9) 田中敦
ストレス応答性ミトコンドリア由来小胞とオルガネラ接触場形成の関係性
AMED 難治性疾患実用化研究事業:「ミトコンドリア病診療の質を高める、レジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究 班会議(招待講演)
2017 年
- (10) 田中敦、Sevan Mattie, 井上弘章、大塚理奈、Heidi McBride
ストレス応答性ミトコンドリア由来小胞の構造と動態解析
ミトコンドリアサイエンスワークショップ 2016 (国内研究会)
2016 年
- (11) Atsushi Tanaka, Sevan Mattie, Hiroaki Inoue, Heidi McBride
Communication between mitochondria and lysosomes regulates iron homeostasis
EMBO workshop Organelle contact sites: Intracellular communication and role in disease(国際学会)
2016 年
- (12) 井上弘章, 大塚理奈, McBride Heidi M, 田中敦
細胞内鉄欠乏に反応するミトコンドリア由来小胞の構造と形成メカニズム
第 89 回日本生化学会年会 (国内学会)
2016 年
- (13) Atsushi Tanaka
Communication between mitochondria and lysosomes regulates iron homeostasis
東京薬科大学一私立大学戦略的研究基盤形成「オルガネラの接触場の形成 機構と破綻による疾患」国際シンポジウム(招待講演)(国際シンポジウム)
2016 年
- (14) 田中敦
ミトコンドリアとオルガネラのコミュニケーション Inter- and Intra-mitochondrial biology
第 39 回日本分子生物学会年会 (国内学会)(シンポジウム主催)
2016 年

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 田中敦
ミトコンドリア品質管理におけるミトコンドリア小胞の形成
細胞 2016 年 10 月号 "特集 ミトコンドリアダイナミクスと疾患" ニュー・サイエンス社 (招待執筆)

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 田中敦研究室
<http://tanaka.yu-med-tenure.com>
- (2) 山形大学学長定例記者会見における研究紹介
https://www.yamagata-u.ac.jp/jp/information/press/20170921_01/

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：Heidi M McBride (McGill University, カナダ)

ローマ字氏名：Heidi M McBride

研究協力者氏名：Frank Edlich (Freiburg University, ドイツ)

ローマ字氏名：Frank Edlich

研究協力者氏名：日野 啓輔(川崎医科大学)

ローマ字氏名：Keisuke Hino

研究協力者氏名：酒巻 有里子(東京医科歯科大学)

ローマ字氏名：Yuriko Sakamaki

研究協力者氏名：三瓶 美夏(山形大学医学部)

ローマ字氏名：Mika SANBE

研究協力者氏名：石崎 学(山形大学理学部)

ローマ字氏名：Manabu ISHIZAKI

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、研究者個人に帰属されます。