

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19672

研究課題名(和文) Mitochondrial particleを介した細胞間クロストークの解明

研究課題名(英文) Intercellular communication mediated by mitochondrial particle

研究代表者

伊藤 雅史 (Ito, Masafumi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：80393114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアDNA(mtDNA)変異を有するミトコンドリア病モデル細胞から放出されたmitochondrial particle(MP)では、呼吸鎖複合体タンパク質が著減し、ADP/ATP交換輸送体タンパク質が増加していた。また、MPにはmtDNAに加え核DNAが含まれていた。さらに、ミトコンドリア機能が異なる細胞間でMPは細胞内に取り込まれたが、ミトコンドリア機能は著しく低下していた。したがって、MPを介したクロストークにおいて、取り込まれたMPのミトコンドリアとしての機能は限定的であり、MPに含まれるDNAやタンパク質などがシグナル分子として機能している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年報告されたmitochondria particle(MP)は新しい概念であり、その特徴や働きの詳細は不明であった。本研究により、ミトコンドリア機能が低下した細胞のMPに含まれるタンパク質のプロファイルが明らかになり、この成果はMPを介した細胞間クロストークの分子機序の解明に寄与するものと考えられる。将来的には、加齢・老化、老化関連疾患におけるMPの意義が明らかになり、それらメカニズムの解明や新規治療法の開発に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent reports suggest that mitochondrial particles (MPs) released from cells have biological functions, but their roles and characteristics in crosstalk between cells with and without mitochondrial dysfunction through MPs remain unknown. This study demonstrated that one of ADP/ATP translocators was increased in MPs released from cells with mitochondrial dysfunction compared with those from normal cells, whereas mitochondrial respiratory chain complex subunits were significantly decreased. Moreover, not only mtDNA but also nuclear DNA were detected in MPs from both type of cells. More importantly, the mitochondrial respiration-deficient cells and normal cells could incorporate MPs, but the majority of mitochondria contained in MPs were not functional. These results imply that mitochondrial DNAs and proteins contained in MPs may act as signaling molecules and play an important role in crosstalk between cells through MPs.

研究分野：分子生物学

キーワード：Mitochondria particle ミトコンドリアDNA変異 プロファイリング クロストーク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢・老化、老化関連疾患にミトコンドリアの機能異常が関与することはよく知られている。最近になり、虚血時にアストロサイトから機能的なミトコンドリアを含む Mitochondrial particle (MP) が放出され、それがニューロンに取り込まれ細胞死を抑制することが報告された。しかしながら、MP は発表されたばかりの新しい概念であり、MP を介したクロストークの詳細は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア DNA (mtDNA) に変異を有するミトコンドリア病のモデル細胞を用いて、ミトコンドリア機能が異なる細胞間での MP を介したクロストークを検証する。さらに、細胞培養液から単離した MP のプロファイリングを行い、それぞれの特徴を明らかにする。これらアプローチにより、新たに提唱された MP について、生理的・病理的な役割と意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MP 単離法

ヒト骨肉腫由来 143B 細胞株とミトコンドリア病患者の初代培養細胞から樹立されたサイブリッド細胞を使用した。2SD 細胞は mtDNA に疾患変異を有するサイブリッド細胞であり、ミトコンドリアでの翻訳抑制、呼吸活性の低下が報告されている。一方、2SA 細胞は正常 mtDNA を有するサイブリッド細胞であり、ミトコンドリアの機能は維持されている。本研究では、2SD 細胞をミトコンドリア病モデル細胞、2SA 細胞をコントロール細胞として使用した。これらの細胞は D-MEM 培地 (10% FBS、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 mg/L ウリジン含有) で培養した。細胞培養上清を 2000xg で 10 分間遠心し、細胞および細胞断片などを除いた後、12,000xg で 30 分間遠心し、その沈殿を MP 画分として回収した。

(2) MP 画分のプロテオーム解析

MP 画分を sodium dodecyl sulfate (SDS) で変性した後、Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) および methyl methanethiosulfonate (MMTS) を用いて還元アルキル化を行なった。次に、サンプルのトリプシン消化を行なった後、iTRAQ 試薬 (AB Sciex 社) を用いてペプチド断片の安定同位体標識を行なった。標識されたペプチドをイオン交換カラムと脱塩カラムにより精製した後、0.1% trifluoroacetic acid (TFA) にバッファー交換した。サンプルの LC-MALDI-TOF/TOF 分析をダイレクトナノ LC/MALDI フラクションシステムおよび AB Sciex TOF/TOF 5800 システムを用いて実施した。ProteinPilot ソフトウェアにより質量分析データの解析を行い、タンパク質の同定とサンプル間の相対定量を行った。

(3) MP 画分のウェスタンブロット解析

サンプルを SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した後、5% スキムミルクでブロッキングした。標的タンパク質に対する抗体を用いた 1 次抗体反応、HRP 標識抗体による 2 次抗体反応の後、発光基質との反応により目的タンパク質の検出を行なった。

(4) MP 画分のミトコンドリア DNA 検出

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて MP 画分から DNA を抽出した。等量の DNA を鋳型にして mtDNA にコードされている MT-ND1 遺伝子と核 DNA にコードされている 18S rRNA 遺伝子に対するプライマーを用いてリアルタイム PCR を実施した。

(5) 蛍光イメージングによる MP の細胞内取り込み観察

膜小胞の膜を染色する ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green (Dojindo 社) を用いて、培養上清から回収した MP を蛍光標識した。一方、レシピエント細胞のミトコンドリアを MitoBright LT Deep Red (Dojindo 社) を用いて染色した。蛍光標識した MP をレシピエント細胞に処理し、2 時間培養した後、共焦点顕微鏡を用いて MP の細胞内取り込みと局在を観察した。その後、細胞内に取り込まれた MP を MitoBright LT Red (Dojindo 社) を用いて染色した。

4. 研究成果

(1) MP 画分に含まれるタンパク質のプロファイリング

ミトコンドリア病モデル細胞 (2SD 細胞) とコントロール細胞 (2SA 細胞) の培養上清から MP 画分を回収し、プロテオーム解析を実施した。その結果、MP 画分から 1083 種類のタンパク質が同定された。「Mitochondrion」、「Nucleus」、「Endoplasmic reticulum」、「Golgi」、「Endosome」、「Cytoskeleton」、「Cell surface」のアノテーションが付加されているタンパク質は、それぞれ 159、467、134、100、94、170、84 種類であった。次にデータ解析ツール PANTHER を用いて Gene Ontology (GO) 解析を行なった結果、positive regulation of RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly (GO:0045899)、pyrimidine nucleotide metabolic process (GO:0006220)、ribosomal large subunit assembly (GO:0000027) など、転写、核酸代謝、翻訳に関連するタンパク質が濃縮されていた (Table 1)。さらに、同定されたタンパク質の中で豊富に存在するものを選択した結果、上位 20 種類のタンパク質の内、8 種類はミトコンドリア呼吸鎖複合体のサブユニットであった (data not shown)。したがって、MP 画分にはミトコンドリアが含まれている可能性が示唆された。

Table 1. MP画分で同定されたタンパク質のGene Ontology解析

GO Biological Process	Fold enrichment	p-value	FDR
positive regulation of RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly (GO:0045899)	15.71	5.68E-04	7.02E-03
pyrimidine nucleotide metabolic process (GO:0006220)	12.27	2.46E-04	3.73E-03
nucleoside monophosphate metabolic process (GO:0009123)	9.82	1.09E-05	2.44E-04
ribosomal large subunit assembly (GO:0000027)	8.03	1.09E-05	2.43E-04
ribosomal subunit export from nucleus (GO:0000054)	7.85	3.72E-03	3.14E-02
DNA unwinding involved in DNA replication (GO:0006268)	7.85	3.72E-03	3.12E-02
pyrimidine nucleobase metabolic process (GO:0006206)	7.85	3.72E-03	3.10E-02
glycolytic process (GO:0006096)	7.64	1.37E-04	2.23E-03
cytoplasmic translation (GO:0002181)	7.17	7.09E-10	5.42E-08
actin filament depolymerization (GO:0030042)	7.14	4.87E-03	3.96E-02

次に、コントロール細胞の MP 画分と比較して、ミトコンドリア病モデル細胞の MP 画分で 1.5 倍以上増減したタンパク質を選抜した結果、68 種類が増加し、72 種類が減少していた。これらタンパク質の GO 解析を行なったところ、apoptotic chromosome condensation (GO:0030263)、ADP transport (GO:0015866)、nucleobase biosynthetic process (GO:0046112)に関連するタンパク質が増加し (Table 2)、actomyosin contractile ring assembly (GO:0000915)、glutathione transport (GO:0034635)、mitotic spindle elongation (GO:0000022)に関わるタンパク質が減少していることが分かった (Table 3)。ミトコンドリア病モデル細胞の MP 画分ではコントロール細胞の MP 画分よりアポトーシスに関連するタンパク質が多く含まれていたことから、MP 画分に比較的多くのアポトーシス小体が混入している可能性が考えられた。

Table 2. ミトコンドリア病モデル細胞のMP画分で増加したタンパク質のGene Ontology解析

GO biological process	Fold enrichment	p-value	FDR
apoptotic chromosome condensation (GO:0030263)	> 100	2.16E-04	3.23E-02
ADP transport (GO:0015866)	> 100	2.88E-04	4.14E-02
nucleobase biosynthetic process (GO:0046112)	43.8	6.33E-05	1.05E-02
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane (GO:0006614)	31.94	1.65E-12	2.63E-09
viral transcription (GO:0019083)	26.66	8.74E-12	8.20E-09

Table 3. ミトコンドリア病モデル細胞のMP画分で減少したタンパク質のGene Ontology解析

GO biological process	Fold enrichment	p-value	FDR
actomyosin contractile ring assembly (GO:0000915)	> 100	2.16E-06	1.38E-03
glutathione transport (GO:0034635)	> 100	1.74E-04	3.42E-02
mitotic spindle elongation (GO:0000022)	> 100	6.32E-06	2.97E-03
immunological synapse formation (GO:0001771)	72.4	1.73E-05	6.12E-03
establishment of apical/basal cell polarity (GO:0035089)	43.44	6.59E-05	1.55E-02

(2)ミトコンドリア病モデル細胞の MP 画分で増減するタンパク質の同定

プロテオーム解析結果に基づき、MP 画分に豊富に存在するミトコンドリア呼吸鎖複合体サブユニットおよびプロテオーム解析により増減が示された数種類のタンパク質のウエスタンブロット解析を実施した。はじめに、細胞画分について検討した結果、コントロール細胞と比較してミトコンドリア病モデル細胞では、核 DNA にコードされている COXIV に顕著な変化は認められなかったが、mtDNA にコードされている MT-CO1 は減少していた。次に MP 画分を検討したところ、ミトコンドリア病モデル細胞の MP 画分では、MT-CO1、COXIV のいずれも著しく減少していた。

一方、プロテオーム解析の結果、コントロール細胞の MP 画分と比較して、ミトコンドリア病モデル細胞の MP 画分では、SLC25A5 (ANT2)、SLC25A6 (ANT3)が増加していた。これらは、ミトコンドリアの内膜に局在する ADP/ATP トランスロケーターであり、細胞内エネルギー代謝において重要な役割を担っている。ウエスタンブロット解析の結果、細胞画分では何れも変化は認められなかったが、ANT2 はミトコンドリア病モデル細胞の MP 画分で増加していた。以上のことから、ミトコンドリア病モデル細胞由来 MP には ADP/ATP トランスロケーターが増加し、呼吸鎖複合体タンパク質が減少していることが明らかとなった。

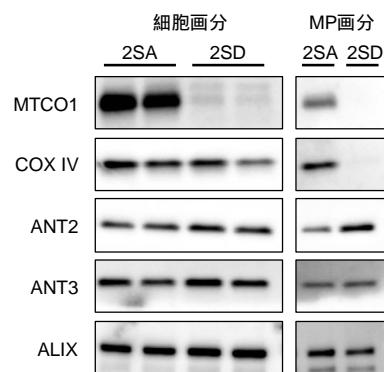


図1. 細胞およびMP画分のウエスタンブロット解析
2SA: コントロール細胞、2SD: ミトコンドリア病モデル細胞

(3)MP 画分に含まれる mtDNA の検出

MP に mtDNA が存在することを確認するために、コントロール細胞とミトコンドリア病モデル細胞の MP 画分から DNA を抽出し、mtDNA の検出を試みた。MT-ND1 遺伝子の配列を認識するプライマーを使用したところ、DNA の増幅が検出され、MP 画分に mtDNA が存在することが確認された。また、核 DNA にコードされている 18S rRNA 遺伝子についても検討した結果、こちらも DNA の増幅が確認された。したがって、MP 画分には mtDNA が存在するが、核 DNA も含まれていることが分かった。

Table 4. PCRによるMP画分内ミトコンドリアDNAの検出

	Ct値	
	MT-ND1	18S rRNA
コントロール細胞	15.7 ± 0.011	21.3 ± 0.003
ミトコンドリア病モデル細胞	15.3 ± 0.013	20.8 ± 0.006

(4)MP の蛍光イメージング解析

MP 画分に存在する小胞を蛍光色素で標識し共焦点顕微鏡で観察した結果、直径 1 μm 以下の小胞が多数観察された(図2)。また、ミトコンドリア病モデル細胞の MP 画分では、コントロール細胞の MP 画分と比較して、粒子径の短い小胞の割合が多い傾向を示した(図3)。

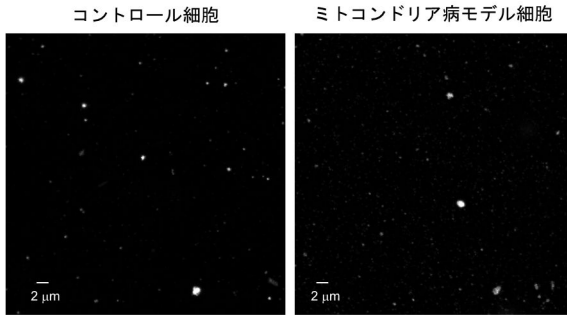


図2. MPの蛍光イメージング画像

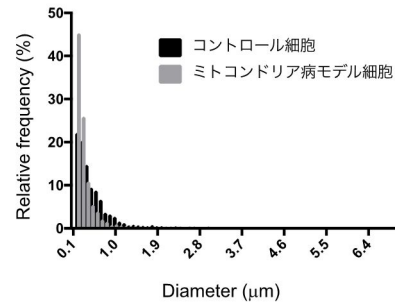


図3. MPの粒子径分布

(5)蛍光イメージングによる MP の細胞内取り込み

ミトコンドリア病モデル細胞とコントロール細胞間において MP の相互作用が存在するか検討するために、各々の細胞から回収した MP の細胞内取り込みを評価した。蛍光プローブで標識した MP をミトコンドリアが蛍光標識された細胞 (pre-staining) に添加し、共焦点顕微鏡で観察した結果、ミトコンドリア病モデル細胞もコントロール細胞も、2~3 時間後には各細胞由来の MP を細胞内に取り込んでいた(図4)。また、MP とミトコンドリアの共局在が観察されなかったことから、細胞に取り込まれた MP は既存のミトコンドリアと融合しないものと考えられた。さらに、細胞に取り込まれた MP にミトコンドリアが存在することを確認するために、MP を取り込んだ細胞を他のミトコンドリア蛍光プローブで染色した(post-staining)。その結果、コントロール細胞にコントロール細胞の MP を処理した細胞では、ミトコンドリア蛍光色素陽性の MP が観察された。しかしながら、多くの MP はミトコンドリア蛍光色素陰性であり、細胞内に取り込まれた MP のミトコンドリア機能が細胞に寄与している可能性は低いものと考えられた。また、コントロール細胞にミトコンドリア病モデル細胞の MP を処理した細胞では、ミトコンドリア蛍光色素陽性を示す MP は観察されなかった。ミトコンドリア蛍光染色プローブは膜電位依存的にミトコンドリア膜に集積することから、呼吸鎖複合体タンパク質が減少しているミトコンドリア病モデル細胞 MP では膜電位が低下し、ミトコンドリア蛍光色素に対して陰性になったものと考えられた。以上のことから、ミトコンドリアの機能が異なる細胞間で MP のクロストークが存在することは示されたが、取り込まれた MP のミトコンドリアとしての機能は限定的であり、MP に含まれる DNA やタンパク質などがシグナル分子として機能している可能性が示唆された。

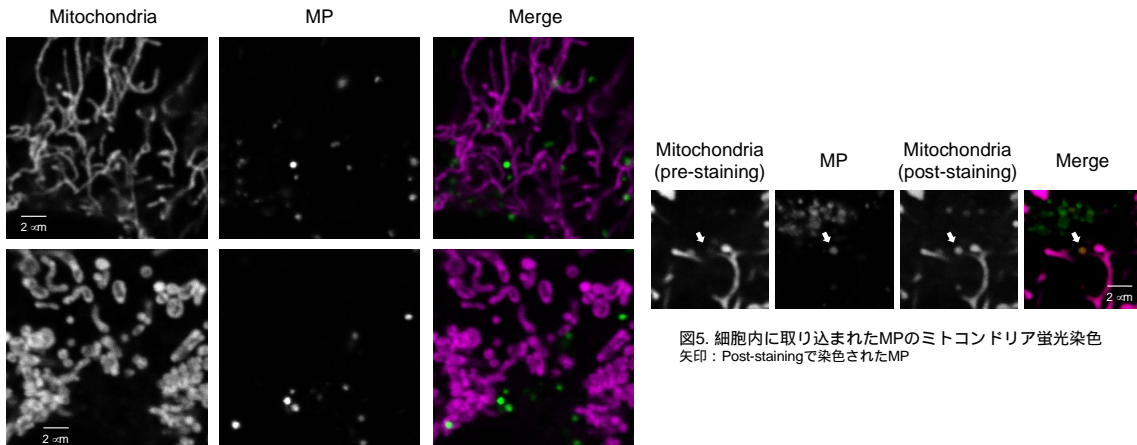


図4. MPの細胞内取り込みと局在
 上段：コントロール細胞にミトコンドリア病モデル細胞由来MPを添加
 下段：ミトコンドリア病モデル細胞にコントロール細胞由来MPを添加

図5. 細胞内に取り込まれたMPのミトコンドリア蛍光染色
 矢印：Post-stainingで染色されたMP

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
連携研究者	藤田 泰典 (Fujita Yasunori) (30515888)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	