

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19291

研究課題名（和文）ミトコンドリアはメカノセンサーか？ - メカニカルストレス感知機構のイメージング解析

研究課題名（英文）Imaging analysis of mechano-sensing in mitochondria of living cells

研究代表者

小林 剛（KOBAYASHI, Takeshi）

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40402565

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）：メカニカルストレスは細胞の増殖・分化を制御する重要な因子であり、生体の恒常性の維持や器官形成において大きな役割を担っている。しかし、そのメカニカルストレス感知の仕組みには、まだ不明な点が多い。本研究では、メカニカルストレス負荷にตอบสนองして細胞内小器官ミトコンドリアのカルシウムイオン濃度レベルが上昇し呼吸能の亢進を誘導することを見出し、ミトコンドリアがメカニカルストレスのセンサーとして働いている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアのメカニカルストレス感知機構は生体の各組織においても機能していると考えられ、特に、骨格筋ではそのメカノセンシング機構の破綻に伴い筋萎縮が誘導されていることが示唆されている。従って、本研究によって、メカノストレス負荷に誘導されるシグナルの欠落や変調により筋萎縮が起きるメカニズムを他の経路と区別して解析することが可能になり、廃用性筋萎縮の予防・治療方法の開発へつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Animal cell utilizes mechanosensors that sense and convert mechanical signals into biochemical signals. However, the details of those sensors or signals remain unclear. Recently mitochondria have been demonstrated to activate several intracellular signaling pathways upon mechanical stress. Therefore, we hypothesize that mitochondria can feel and respond to mechanical stress as mechanosensors. In this project, we try to verify our hypothesis and to investigate the mitochondrial signaling pathways upon mechanical stress. We found that cultured mesenchymal stem cells elevated mitochondrial calcium concentration in response to mechanical stress, resulting in increased mitochondrial ATP levels. Pharmacological studies showed that the activity of mechanosensitive channels activities was not essential to the changes in mitochondrial calcium concentration. These results support our hypothesis that mitochondria could sense mechanical stimuli and transduce them to biochemical signals.

研究分野：細胞生物学、生理学

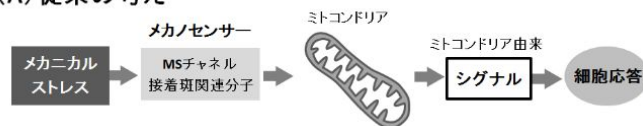
キーワード：ミトコンドリア メカノバイオロジー カルシウム 機械刺激 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

メカニカルストレスは細胞の増殖・分化を制御する重要な因子であり、生体の恒常性の維持や器官形成において大きな役割を担っている。細胞のメカニカルストレス感知のセンサーとして機械刺激受容チャネルや接着斑関連分子が精力的に研究されてきたがまだ不明な点が多い。一方、多くの細胞でメカニカルストレスがミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度変化、ミトコンドリアからの ROS 産生、などの細胞内シグナルを誘導することが知られている。しかし、それらのシグナル誘導は間接的な事象と考えられており(図 1-A) ミトコンドリア自体がメカニカルストレスを感知しているか明らかにされていない(図 1-A)。

しかし、我々の予備的な実験結果では、メカニカルストレス依存的なミトコンドリア由来シグナルの中でも、主要なメカノセンサーのシグナルを抑制しても見られ、ミトコンドリアと相互作用する細胞内骨格を破壊すると消失するものがあることがわかった。すなわち、メカニカルストレスが細胞内骨格を介してミトコンドリアに伝わり、ミトコンドリアがそのストレスを直接感じている可能性が示唆された(図 1-B)。

(A) 従来の考え



(B) 本申請の仮説

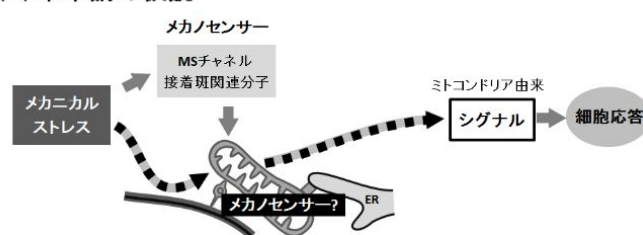


図 1. メカニカルストレス感知応答過程におけるミトコンドリアの役割。(A)これまで考えられてきた間接的な応答。(B)新しい仮説：メカノセンサー様な直接的感知・応答。

2. 研究の目的

本研究では「ミトコンドリアを含んだオルガネラ・ネットワークが、直接的に、メカニカルストレスを化学的シグナルに変換するメカノセンサーとして機能し、ミトコンドリア由来の細胞内シグナルを通じて細胞の応答反応を誘導する」という仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

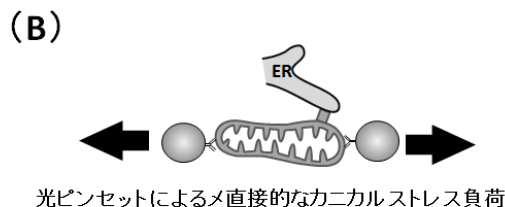
本研究のポイントは、ミトコンドリア複合体が直接的にメカニカルストレスを感知していることを検証することであり、間接的な効果と区別することが肝要である。そのために、下記の3つのアプローチを取った。(1) 生細胞中にメカニカルストレスを負荷し、ミトコンドリア由来の細胞内シグナルを解析する(図 2-A)、(2) 光ピンセットによってミトコンドリアへ直接的に力を負荷しミトコンドリア由来のシグナルを解析する(図 2-B)、(3) 生きている細胞内でミトコンドリア由来のシグナルとミトコンドリアに掛かる張力を同時観察し、その因果関係を解析する(図 2-C)。ミトコンドリア由来の細胞内シグナルとしてミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度変化・電位変化、ROS 産生などをイメージング解析する。

(1) では、メカニカルストレス(負荷時の細胞内シグナルに加えて、オルガネラの動態や相互作用を経時的に解析した。また、細胞骨格の薬理的な破壊、細胞骨格とミトコンドリア間、あるいはミトコンドリアと ER 間の相互作用に関わる分子の発現抑制や機能阻害の効果を調べ、オルガネラ・ネットワークのメカノセンシングにおける役割を解析した。また、メカニカルストレスにより誘導される Ca^{2+} 流入や Src、FAK や p38 などのキナーゼ活性化を阻害し、ミトコンドリア由来のシグナルへの影響を解析し、ミトコンドリア・シグナルが二次的なものかどうか検討した。

(A)



(B)



(C)

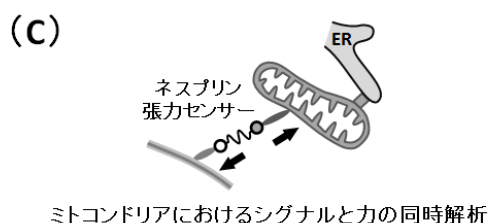


図 2. 本研究で用いた3つのアプローチ

(2)では、細胞から取り出したミトコンドリア、あるいは、細胞骨格を破壊した細胞内のミトコンドリアに対し、外膜に結合したビーズを光ピンセットによって牽引し、直接、ミトコンドリアに対して力を負荷し、ミトコンドリア由来の細胞シグナルが負荷に応じて誘導されるか解析を試みた。

(3)においては、ミトコンドリアと細胞骨格の相互作用を担うアダプター分子の一つネスプリン-2 の分子内に張力センサー（蛍光共鳴エネルギー移動の効率の変化を指標に力を測定）を挟み込んだもの（Arsenovic ら, Biophys J. 100:34-43, 2016）を使い、ミトコンドリアに掛かる力を測り、同時に取得したシグナルとの相関性を解析しその因果関係を探った。

4. 研究成果

ミトコンドリアにおけるシグナルとしては、予備実験において変化が見られたミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度に注目し解析を行った。間葉系幹細胞において、柔らかい基質の牽引と薬理的な Rho 活性化、いずれの方法においてもメカニカルストレス負荷によりミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘導された（図3）。

より定量的な FRET タイプのカムレオン型カルシウム・プローブ（Palmer et al, 2006）をミトコンドリア内に発現させ解析を行った場合でも、メカニカルストレス負荷依存的なミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された（図4）。プローブの出力指標から判断して、ストレス負荷前後で Ca^{2+} 濃度が 50 ~ 100 nM からその 10 倍以上に上昇していると考えられた。また、その Ca^{2+} 濃度上昇は、リガンド刺激などに誘導される速いものとは異なり、比較的ゆっくりとしたもので負荷後 15 分程度より見られ、かつ、濃度上昇の継続していた（図4）。その Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞外液の Ca^{2+} 除去や機械刺激受容 (MS) チャンネルの阻害剤 GsMTX-4 処理した場合でも見られ、さらに、同時に計測した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がなくても、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された。従って、メカニカルストレス依存的に活性化する MS チャンネル作用を介していないと考えられた。一方、アクチン・ストレス繊維の張力を弱めると変化が弱まり、ミトコンドリア内膜上のユニポート- MCU の発現抑制により Ca^{2+} 濃度上昇が抑えられた。メカニカルストレス負荷時に小胞体内 Ca^{2+} 濃度を観察したところ、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度変化と相反する動態が見られた。従って、メカニカルストレス負荷時には、MCU を介して小胞体内の Ca^{2+} がミトコンドリア内に移行していると考えられる。

逆に、ミトコンドリアに掛かるメカニカルストレス負荷を低減した場合、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度は変動するのか？それを調べるために、細胞に ROCK 阻害剤 Y27632 処理を行いストレス繊維の張力を低下させた。その結果、処理後数時間後からミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度の低下が認められた。

ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度は、呼吸鎖の酵素活性に作用しミトコンドリアの ATP 産生に影響を当てることが知られている。メカニカルストレス負荷によりミトコンドリア Ca^{2+} 濃度が上昇す

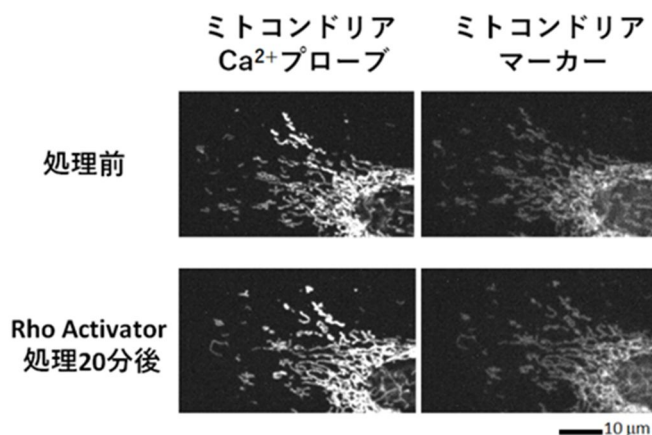


図3. メカニカルストレス負荷により誘導された間葉系幹細胞のミトコンドリア内カルシウム濃度上昇

同時取得した(左) ミトコンドリアに局在させた緑色蛍光 Ca^{2+} プローブと(右) 赤色蛍光のミトコンドリアマーカーの共焦点蛍光観察画像。

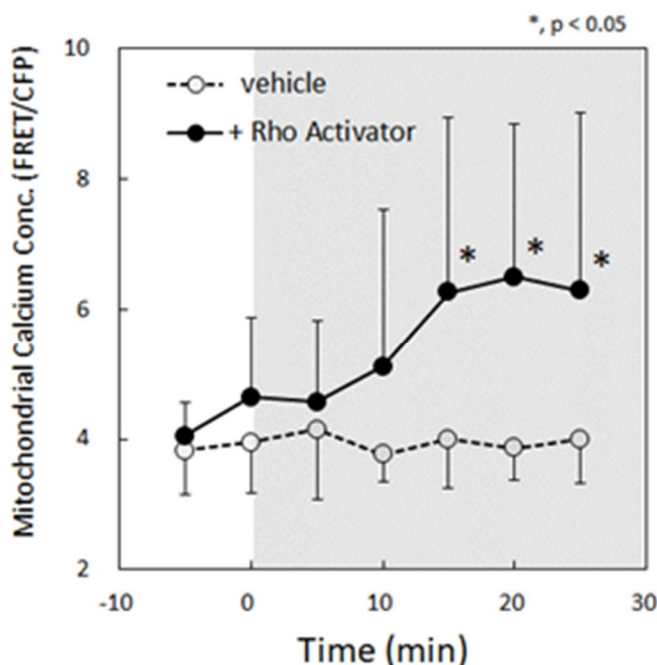


図4. FRET タイプの Ca^{2+} プローブで見た間葉系幹細胞ミトコンドリアのメカニカルストレス負荷誘導後のカルシウム濃度上昇の経時変化

る際にも、ATP 産生が影響を受ける可能性が考えられた。そこで、呼吸能の解析を行ったところ、メカニカルストレス負荷により、ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度上昇と同様にミトコンドリア呼吸能上昇していることが分かった。同様に、ミトコンドリア内の pH 変化も解析したが、Rho 活性化前後で pH の変化は認められなかった。

ミトコンドリアと細胞骨格の間の張力を測定するために、アダプター分子内に FRET タイプの張力センサーを組み込んだプローブを用いた(図5)。この張力センサーは、ミトコンドリア周囲に局在し、Rho 活性化によってストレス繊維の張力を上昇させると FRET シグナルの低下、すなわち、張力センサーが引っ張られている、ことが確認できた(図6)。すなわち、ミトコンドリアの掛かる張力が増加していることが確認された。

ミトコンドリアへの直接的なメカニカルストレス負荷に関しては、ミトコンドリアヘマイクロビーズを結合し、2本の光ピンセットにより、牽引、圧縮といったメカニカルストレスを負荷する計画であった。ミトコンドリア外膜上にタグを融合した膜分子を導入し、ビーズを結合することに成功した。

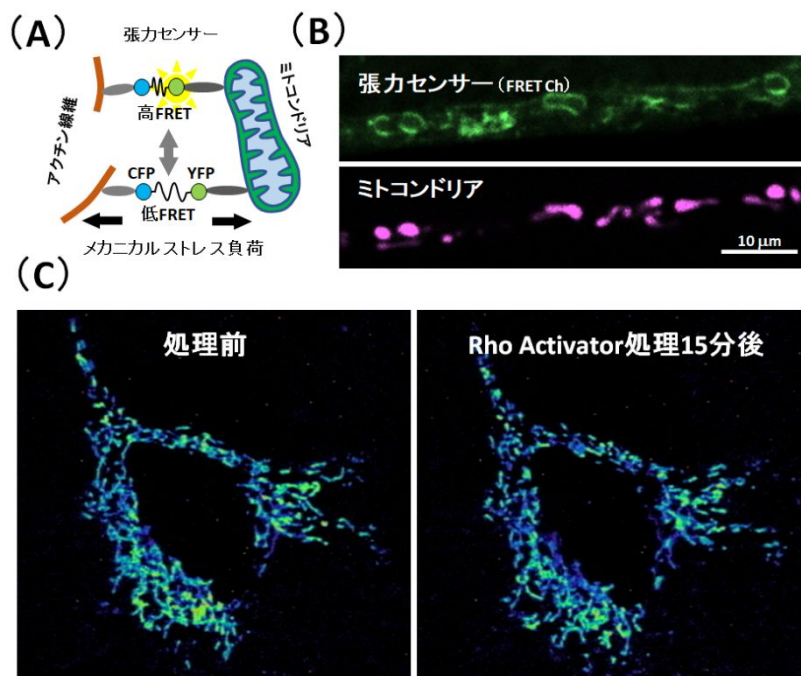


図5. 生細胞内でのミトコンドリアに掛かる力の測定 A. 張力センサーの模式図。アクチン線維とミトコンドリアの間で力が掛り、伸張すると FRET 効率が低下。B. 生細胞中のミトコンドリア近傍での張力センサーの観察例。薬理的的にアクチン線維を壊すと FRET 効率が上昇した。C. Rho 活性化後には FRET/CFP シグナル(擬似カラー表示)の低下、すなわち、張力の亢進が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Khan L, Sato K, Okuyama S, Kobayashi T, Ohashi K, Hirasaka K, Nikawa T, Takada K, Higashitani A, Abiko K	4. 巻 106
2. 論文標題 Ultra-high-purity Iron Is a Novel and Very Compatible Biomaterial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mech Behav Biomed Mater	6. 最初と最後の頁 103744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmbbm.2020.103744.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 寺西美佳、小林 剛	4. 巻 52(12)
2. 論文標題 モデル生物を用いた筋の老化とミトコンドリア	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 4-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小林 剛、田中瑞奈、寺西美佳、東谷篤志	4. 巻 52(12)
2. 論文標題 ミトコンドリアはメカノセンサーか？ - 新規メカニカルストレス感知機構の解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 51-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi, K., Takahashi, H., Furuichi, T. Toyota M., Furutani-Seiki M., Kobayashi T., Watanabe-Takano H., Shinohara M., Numaga-Tomita T., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Naruse K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Gravity sensing in plant and animal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41526-020-00130-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 剛、伊藤侑晃、田中瑞奈、寺西美佳、清島大資、二川 健、曾我部正博、東谷篤志
2. 発表標題 線虫体壁筋細胞および培養細胞におけるミトコンドリアの力学的刺激感知能の解析
3. 学会等名 第5回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀池由朗、鬼頭舞帆、加藤信靖、田中瑞奈、橋爪藤子、東端 晃、二川 健、曾我部正博、小林 剛
2. 発表標題 間葉系幹細胞の重力感知初期過程におけるPKC の関与
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teranishi M, Kobayashi T, Ito Y, Sudevan S, Xintong W, Nagasawa R, Momma K, Higashitani A
2. 発表標題 Dynamics of mitochondrial morphology and Ca ²⁺ in <i>C. elegans</i> muscle cells with aging
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ3AW-04 「ミトコンドリアの形と機能の新規連関」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中瑞奈、寺西美佳、二川 健、曾我部正博、東谷篤志、小林 剛
2. 発表標題 培養動物細胞におけるミトコンドリアの力学的刺激感知能の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東谷篤志、小林 剛
2. 発表標題 線虫を用いた筋ミトコンドリア研究
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ3PW-09 「筋ミトコンドリア研究の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi T
2. 発表標題 Substrate rigidity sensing of mesenchymal stem cells by utilizing Trpv4 channels
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 ワークショップAW-13 Ch 13 「細胞基本機能を制御する細胞外硬度：感知の分子物理機構と応答シグナリング」(招待講演)
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	曾我部 正博 (SOKABE Masahiro) (10093428)	名古屋大学・医学系研究科・研究員 (13901)	

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
---------	---------