

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570232

研究課題名(和文)ミトコンドリア形態と細胞内運搬の制御機構

研究課題名(英文)Analysis of mitochondrial morphology and movement

研究代表者

岡 敏彦(OKA, Toshihiko)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：40263321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線虫体壁筋のミトコンドリア形態を指標に、その制御に関わるキネシンKLP-6を同定した。HeLa細胞やマウス神経芽細胞においても、KLP6がミトコンドリア形態、特にミトコンドリア輸送に働くことを示した。

また、ミトコンドリア内膜タンパク質LETM1を用いて、人工リポソーム上に膜陥入構造を再構成した。これにより、ミトコンドリアのクリステ構造を詳細に検討できる手法を確立できた。

研究成果の概要(英文)：An RNA interference screen using nematode led us to identification of a novel kinase KLP6 involved in mitochondrial morphology and movement. The dominant-negative KLP6 induced abnormal mitochondrial morphology in HeLa cells. Furthermore, anterograde transport of mitochondria in the neurites of differentiated neuro2a cells was significantly reduced when the dominant negative form was overexpressed, indicating that KLP6 regulates intracellular transport of mitochondria.

Downregulation of an inner membrane protein LETM1 induces mitochondrial swelling and fragmentation. Moreover, cristae structure clearly disappeared in the LETM1-knockdown cells. To investigate the LETM1 functions, we attempted to in vitro reconstitute membrane invagination using LETM1 recombinant protein and artificial liposome. This is a good tool to analyze the roles of LETM1 on the formation of mitochondrial inner membrane structures.

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：ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

細胞内小器官(オルガネラ)の形態は、その機能と密接に結びついている。特に、本研究で着目するミトコンドリアは、細胞周期、細胞外 pH、ATP 濃度、アポトーシスなど様々な環境変化に応じて、その形態をダイナミックに変化(例えば、ネットワーク状と断片状)することが知られている。ミトコンドリア形態は、ミトコンドリア同士の融合と分裂と細胞内での運搬・配置により主に制御されている。また、私達の最近の研究により内膜のクリステ構造の変化によってもミトコンドリア形態は大きく影響を受ける事が明らかとなった(Oka et al., 2008; Tamai et al., 2008)。しかし、これまでのミトコンドリア形態を制御する分子メカニズムの解析は、外膜・内膜の融合と分裂に焦点を当てたものが中心であり、細胞内運搬やクリステ構造が分子レベルでどのようにミトコンドリア形態をコントロールしているかはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、既存の膜の融合・分裂とは異なる観点からミトコンドリア形態の意義にアプローチする。つまり、細胞内運搬とクリステ構造に着目し、その分子レベルでの制御機構を解明することで、ミトコンドリア形態の制御が細胞機能に果たす役割を総合的に理解することを目指している。これにより、ヒトのミトコンドリア病などのオルガネラ機能欠損に由来する疾患を理解する新たな基盤を得たいと考えている。具体的には、線虫をモデル生物として 89 個のモータータンパク質遺伝子を RNA 干渉法により個々に発現抑制し、ミトコンドリア形態に異常を示す 3 つの遺伝子を見出した。これらの遺伝子を線虫と動物細胞を用いて機能解析を行い、ミトコンドリアの細胞内運搬の生理的役割を明らかにする。また、私達が見出したクリステ構造の形成・維持に必要なタンパク質 LETM1 を用いて、人工的に膜陥入構造を再構成することで、クリステ構造のミトコンドリア形態と機能への関わりを *in vitro* で検証することを目指している。

3. 研究の方法

(1) 新規モーター分子のミトコンドリア形態における役割の解析

これまで、私達はミトコンドリアを可視化出来るトランスジェニック線虫を用いて、線虫のミトコンドリアタンパク質遺伝子

719 個を網羅的にノックダウンし、ミトコンドリア形態に必要な遺伝子を同定して来た(Ichishita et al., 2008)。本研究でもこの系を用いて、線虫のモータータンパク質(キネシン、ダイニン、ダイナクチン、ミオシン)の遺伝子 89 個を個々に発現抑制し、ミトコンドリア形態関連モーター分子を同定・解析する。また、同定した分子の細胞レベルでの機能を解析するため、HeLa 細胞や神経芽細胞 Neuro2a でのミトコンドリア形態への役割も検討する。

(2) クリステ構造の生理的意義と人工膜を用いた再構成

私達は線虫を用いたスクリーニングで、クリステ構造の形成・維持に必要な 2 つの遺伝子(MICS1 と LETM1)を見出した。HeLa 細胞でのそれぞれの遺伝子のノックダウンは、同様にクリステ構造の消失または減少を引き起こす。LETM1 のノックダウンではミトコンドリアが膨張し球状になるのに対し、MICS1 ノックダウンでは軽度の断片化が認められるだけである。どちらもミトコンドリア内膜のタンパク質であるが、その機能欠損が引き起こす形態の変化が異なるため、内膜のクリステ構造と外膜の形態維持機構との違いを、膜の融合・分裂や細胞内運搬の観点から明らかに出来ると考えている。この違いを詳細に検討するため、人工膜を用いて膜陥入構造を再構成することを目指している。これにより、クリステ構造の維持機構の解明に加えて、陥入した生体膜の物性を測定する事が出来る。

4. 研究成果

(1) 新規キネシン KLP6 のミトコンドリア形態と神経軸索輸送における役割の解析

線虫の体壁筋細胞でミトコンドリア形態に関連するモータータンパク質を RNA 干渉法により網羅的に検索した結果、3 つの遺伝子産物(KLP-6, DLC-4, DNC-4)を同定した。その中で、KLP-6 はミトコンドリアとの関連が知られていないキネシンであったため、異なる siRNA や過剰発現により、KLP-6 の遺伝子発現によりミトコンドリア形態が変化することを証明した。

細胞レベルでの KLP-6 の機能を解析するために、哺乳類の相同遺伝子をラットよりクローニングした。哺乳類のキネシンは既に 27 種類がクローニングされているが、KLP6 はこれらとは異なる新規のキネシン分子であった。ラット KLP6 は過剰発現により、HeLa 細胞のミトコンドリア形態を変化させるが、他のオルガネラ(小胞体、ゴルジ体、ペルオキシソーム)には影響を与えなかった。さら

に、タイムラプス解析によりミトコンドリアの移動速度が顕著に低下していることが明らかとなった。神経芽細胞 neuro2a においても、神経突起 (neurite) のミトコンドリアの移動が末端方向に向かって移動が遅くなることが観察された。逆に、細胞体への移動には影響がなかったことから、KLP6 は一般的なキネシンと同様に微小管の重合端に向かって移動することが示唆された。

これまでにミトコンドリアの細胞内運搬に関わるキネシンは 2 つ (KIF5/KHC, KIF1B α) 報告されている。KLP6 との機能的違いを検討するため、モータードメインを欠損させた優性変異体を過剰発現させ、神経芽細胞でのミトコンドリア移動を観察したところ、KIF5/KHC 変異体では細胞体から神経突起へのミトコンドリアの移動が強く阻害されていた。このことから、KIF5/KHC は細胞体内でのミトコンドリアの輸送に強く関わることが示唆された。しかし、KLP6 と KIF1B α 変異体では、神経突起へのミトコンドリアの移動は少し遅れる程度であった。そこで、タイムラプス解析によりこの 2 つのキネシン変異体の影響を解析したが、大きな差は観られなかった。また KLP6 と KIF1B α 変異体を同時に発現させても、それぞれの単独で発現させた効果と差異がなかったことから、どちらの変異体も共通の制御因子を競争阻害することで KLP6 と KIF1B α の機能を同時に低下させているのではないかと考えた。KIF1B に結合する因子を検索したところ、Two hybrid 法で相互作用が示された因子として KBP が報告されていた (Wozniak et al., 2005)。神経芽細胞での KBP の免疫蛍光染色解析により神経突起内のミトコンドリアに存在することが明らかとなった。そこで、3 つのキネシンとの免疫沈降実験を行った結果、KBP は KLP6 と KIF1B α に強く結合し、KIF5/KHC には全く結合しないことが明らかとなった。これらの結果は論文にまとめ報告した (Tanaka et al., 2011)。

KBP との結合領域を決定するために KLP6 を部分的に欠損させた変異体を HeLa 細胞に発現させ、免疫沈降法により KBP との結合を測定した。その結果、モータードメインだけでなく FHA ドメインも結合に必要であることが明らかとなった。

(2) LETM1 を用いた人工陥入膜の in vitro 再構成

私達は、LETM1 タンパク質を線虫の体壁筋においてミトコンドリアの形態に関連する因子として同定した (Ichishita et al., 2008)。内膜タンパク質 LETM1 の発現抑制は、HeLa 細胞でミトコンドリアの膨張と断片化を引き起こす (Tamai et al., 2008)。また、他の研究グループにより LETM1 またはその相同分子は、カリウムイオンの恒常性、ミトコンドリアのリボソーム受容体、カルシウム・プロトン対向輸送体などとしてその機能が

が提唱されているが、まだ結論は得られていない。全ての機能がミトコンドリア内膜を介する生理的な作用であることから、LETM1 は内膜の構造を決定する構造タンパク質ではないかと考えた。そこで、カイコを用いて発現・精製した LETM1 リコンビナントタンパク質を人工リボソームに再構成することで、ミトコンドリア内膜の特徴的なクリステ構造の再構成を行った。LETM1 を加えたりリボソームでは、電子顕微鏡観察により複数の膜陥入が確認された。

しかし、この膜の変形が LETM1 機能と関連しているかは不明であった。膜変形能と LETM1 の機能の相関を検討するために、LETM1 の機能変異体の作成を進めた。LETM1 の酵母相同分子 *MDM38* の遺伝子欠損による生育不全をヒト LETM1 遺伝子は相補する。これを利用して、LETM1 機能に重要なドメインを検索したところ、EF ハンドやロイシンジッパードメインではなく、LETM1 同士に高く保存されている未知の領域の重要性が明らかとなった。

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 5 件)

Ishihara, N., H. Otera, T. Oka, and K. Mihara, Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals, *Antioxid. Redox Signa*, 査読無, **19**, 2012, 389-399.

DOI: 10.1089/ars.2012.4830.

Tanaka, K., Y. Sugiura, R. Ichishita, K. Mihara and T. Oka, KLP6, a newly identified kinesin that regulates morphology and transport of mitochondria in neuronal cells, *J. Cell Sci.*, 査読有, **124**, 2011, 2457-2465.

[学会発表] (計 3 件)

岡 敏彦, オルガネラ形態の機能的意義、第 1 回生命分子科学研究会、北海道、2014.3.17-19

Toshihiko Oka, " Formation of Cristae Structure in Mammals ", The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Diseases, 沖縄、2013.10.28-11.1

岡 敏彦, ミトコンドリア形態とクリステ膜構造の形成機構、第 85 回日本生化学会、福岡、2012.12.14-16

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.rikkyo.ac.jp/web/oka_lab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 敏彦 (OKA, Toshihiko)

立教大学・理学部生命理学科・教授

研究者番号：40263321

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：