

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770133

研究課題名(和文) 筋肉の組織分化におけるミトコンドリア分裂因子 Drp1 の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of mitochondrial fission in muscle tissue

研究代表者

石原 孝也 (Ishihara, Takaya)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：70611862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、細胞内では融合と分裂を頻りに繰り返しながらダイナミックにその形態を変化させていることが知られている。本研究期間ではミトコンドリア分裂の筋細胞における生理的意義に着目し研究をおこなった。哺乳動物細胞を使った解析からミトコンドリアの形態変化とミトコンドリアDNA(mtDNA)のダイナミクスに関して新たな知見を得た。これら細胞レベルの解析から得られた知見を個体レベルの解析に応用し、ミトコンドリアの分裂が筋組織の機能維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are dynamic organelles, and their fusion and fission regulate various cellular events. We examined the physiological role of mitochondrial fission in muscle tissue. We found that nucleoid morphology/dynamics are regulated by balanced fusion and fission in the term of this project. In healthy cells, mitochondrial fission often occurred adjacent to nucleoids. In Drp1-deficient cells, nucleoids were highly enlarged by their clustering within hyperfused mitochondria. Thus, mitochondrial dynamics by fission and fusion play a critical role in controlling mitochondrial nucleoid structures, contributing to cristae reformation and the proapoptotic status of mitochondria. Further analysis showed that mitochondrial fission maintains functional mitochondria in muscle tissue.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：ミトコンドリア 細胞・組織 シグナル伝達 オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内の主要なエネルギー生産を行なうだけでなく、アポトーシスやCa²⁺シグナリングなど多様な細胞制御において重要な機能を担っている二重膜構造の細胞内オルガネラである。ミトコンドリアは融合と分裂を含む形態変化を頻繁に繰り返しており(ミトコンドリアダイナミクス)これが細胞機能制御に重要な機能を持つことが報告されている。しかし、これら形態変化が病態や個体の生理機能に及ぼす影響についての知見は乏しかった。

また酸素呼吸細菌を起源とするミトコンドリアは自身のDNA(mtDNA)をその内部に持ち、DNA結合蛋白質であるTFAMなどと結合し、核様体という構造をとることが知られていた。ミトコンドリアの形態がダイナミックに変化するにも関わらず、これまではミトコンドリアの核様体の挙動に関する詳細な解析はほとんど行われていなかった。

2. 研究目的

ミトコンドリア分裂因子を欠損したマウスの解析から、特に筋細胞における生理的な意義を解析する。また哺乳動物細胞を使った解析では、ミトコンドリアダイナミクス関連因子の発現を制御することによって、ミトコンドリアの形態変化と核様体の挙動や分布の関連を詳細に検討する。

3. 研究の方法

組織特異的なKOマウスを作製し、マウスの表現型(心機能、サルコメア構造)観察と初代培

養細胞における表現型の解析(免疫蛍光染色やミトコンドリア活性染色など)から多角的にミトコンドリア分裂の筋細胞での役割について解析を進めた。また、哺乳動物細胞の核様体のライブイメージング系(図1下)を構築し、RNAi法によってミトコンドリアダイナミクス分子群の発現抑制を行ない、ミトコンドリア形態と核様体との関係性を詳細に観察した。このライブイメージング系で得られた新たなミトコンドリア形態と核様体の知見を筋細胞での解析にフィードバックし、生理的な意義についても詳細に検討を行った。

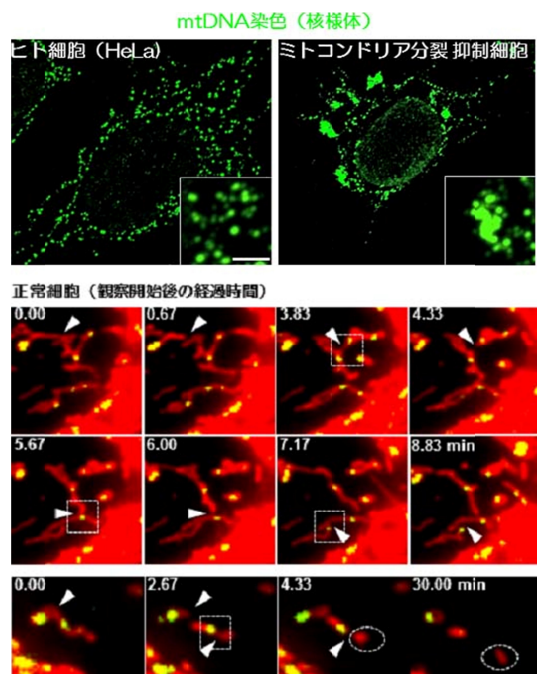


図1上: ミトコンドリア分裂を抑制すると、核様体は集合して大きくなる。図1下: 生きた細胞のミトコンドリア分裂と核様体の関係を経時的に観察した。

4. 研究成果

本研究期間において、ミトコンドリアの形態と核様体の挙動・分布に密接な関係があることを明らかにした。RNAi 法によってミトコンドリアの分裂を抑制したところ、ミトコンドリアの融合に伴い多数の核様体が集合・合体し巨大化していく様子がみられた。(図1上)。さらに通常細胞の詳細なライブイメージングや免疫染色観察から、核様体の近傍で頻りにミトコンドリア分裂が起こることを見出した(図1下)。これらの結果から、核様体の分布はミトコンドリアの融合・分裂によって直接制御されていることが明らかになった。さらに、このような核様体の分布異常が細胞に及ぼす影響を検討したところ、細胞死の進行に重要なシトクロム c の放出が抑制されていることが分かった。これは、核様体が凝集し、膨らんだミトコンドリア(ミトバルブ)では、内膜クリステが極めて密に配置されており、その内部にシトクロム c が封入されることで起こることが分かった(図2)。

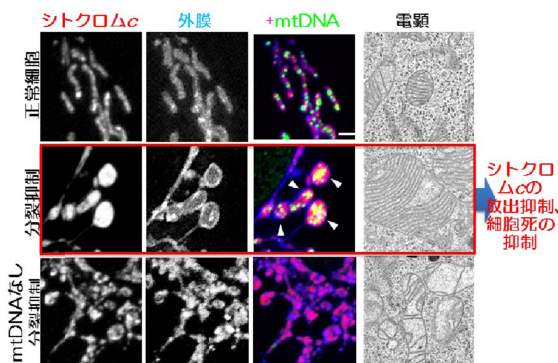


図2 ミトコンドリアの分裂を抑制すると、核様体の集合に伴って、発達した内膜クリステを持つ、巨大なミトコンドリア構造、ミトバルブが形成される。

以上のことから、核様体の動的変化が内膜のクリステ構造の制御と細胞死の制御に極めて重要な機能を持つことが明らかとなった。これらで得られた知見からも筋細胞でミトコンドリア分裂が生理機能の維持に重要であることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] 計2件

1. Ban- Ishihara R, Ishihara T, Sasaki N, Mihara K, Ishihara N. Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. PNAS 110:11863-8 (2013) 査読有り
doi: 10.1073/pnas.1301951110

2. Onoue K, Jofuku A, Ban- Ishihara R, Ishihara T, Maeda M, Koshihara T, Itoh T, Fukuda M, Otera H, Oka T, Takano H, Mizushima N, Mihara K and Ishihara N. Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology. Journal of Cell Science 126:176-185 (2013) 査読有り
doi: 10.1242/jcs.111211.

[学会発表] 計10件

1. Reiko Ban-Ishihara, Takaya Ishihara, Tadato Ban, Maki Maeda, Katsuyoshi Mihara, Naotada Ishihara, Roles of Mitochondrial Fission in Cultured Cells and in Mice Development, The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria (DynaMito2013) 2013.10.28-11.1

沖縄

2. Reiko Ban-Ishihara, Takaya Ishihara, Narie Sasaki, Katsuyoshi Mihara, Naotada Ishihara, Dynamics of Nucleoid Structure Regulated by Mitochondrial Fission Contributes to Cristae Reformation and Release of Cytochrome *c*, The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria (DynaMito2013) 2013.10.28-11.1

沖縄

3. 石原 孝也、石原(伴)玲子、一村 紋佳、三原 勝芳、石原 直忠、筋細胞におけるミトコンドリア分裂の役割、第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13 横浜

4. 石原(伴)玲子、石原 孝也、佐々木 成江、三原 勝芳、石原 直忠、哺乳動物細胞におけるミトコンドリアダイナミクスと核様体の関係性、第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13 横浜

5. 石原 孝也、石原(伴)玲子、一村 紋佳、三原 勝芳、石原 直忠、筋組織におけるミトコンドリア分裂の役割、第 65 回日本細胞生物学会大会 2013.6.19-21 名古屋

6. 石原(伴)玲子、石原 孝也、佐々木 成江、三原 勝芳、石原 直忠、哺乳動物細胞におけるミトコンドリアダイナミクスと核様体の関係性、第 65 回日本細胞生物学会大会 2013.6.19-21 名古屋

7. 石原(伴)玲子、石原 孝也、石原 直忠、哺乳動物細胞におけるミトコンドリア分裂の生理的意義、第 65 回日本細胞生物学会大会 2013.6.19-21 名古屋

8. R. Ban-Ishihara, T. Ishihara, K. Mihara, N. Ishihara, Mitochondrial fission control size and

distribution of mitochondrial nucleoids, contributing to inner membrane cristae structures. Mitochondria: from Signaling to Disease 2013.5.5-7 Lisbon, Portugal

9. 石原 孝也、石原(伴)玲子、一村 紋佳、三原 勝芳、石原 直忠、筋細胞成熟に対するミトコンドリア分裂の役割、第 12 回日本ミトコンドリア学会 2012.12.19-21 筑波大学 大学会館

10. 石原 孝也、三原 勝芳、水島 昇、石原 直忠、筋組織におけるミトコンドリア分裂の役割、第 85 回日本生化学会大会 2012.12.14-16 福岡国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者 石原 孝也 (ISHIHARA TAKAYA)
久留米大学分子生命科学研究所 高分子化学
助教

研究者番号:70611862

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし