

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790289

研究課題名(和文)細胞増殖および細胞分化におけるミトコンドリアによる細胞外環境センシング機構の解析

研究課題名(英文) Study of mitochondrial behavior as a sensor of surrounding conditions during cell proliferation and differentiation.

研究代表者

満島 勝 (Mitsushima, Masaru)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40621107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究のミトコンドリアによる環境センシングの分子機構の解明において、直接のATP量の変化やカルシウムイオンの変化を検出することはできなかったが、グルコース飢餓状態においてミトコンドリアの形態が大きく変化することを見出した。この分子機構について解析を行い、阻害剤やsiRNAによる発現抑制実験によりAMPKが関与している結果を得た。AMPKは細胞外の栄養状態などにより活性化するキナーゼであり、環境センサーとして機能している可能性が示唆されたことから、現在AMPKからミトコンドリアにつなぐ機構を解析するため、ミトコンドリアに局在する新規AMPK基質の同定を試みている。

研究成果の概要(英文)：Although we could not get any direct evidences that mitochondria might sense the surrounding conditions by monitoring the changes of ATP or Ca<sup>2+</sup> concentrations within individual mitochondria, we found that mitochondria changed their morphologies in response to the glucose starvation. We investigated the molecular mechanisms underlying glucose starvation-induced mitochondrial morphological changes and we could identify AMPK as a key molecule for that regulation. AMPK is well known kinase that is activated by lack of energy, suggesting that AMPK acts as a sensor for mitochondria. Altogether, mitochondria might sense the surrounding conditions through AMPK, so we are now challenging to identify the novel substrates for AMPK that localizes in/on mitochondria.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ミトコンドリア 環境センシング 細胞増殖 細胞分化 ミトコンドリアダイナミクス

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内のほぼ全てのATPを合成、供給するオルガネラであり、細胞の生存、増殖、分化、運動など様々な細胞運命の決定に加え、アポトーシスの実行に関与することで細胞死の制御にも関わる、細胞の生と死を共に制御するオルガネラである。さらに、ミトコンドリアは小胞体と同様にCa<sup>2+</sup>を貯蔵し、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度を制御することで、Ca<sup>2+</sup>を介した様々なシグナル伝達系の制御に関与する。また、ミトコンドリア内のATP合成に関与するTCA回路や電子伝達系、β酸化系の多くの酵素がCa<sup>2+</sup>によって活性化調節されていることが分かっており、Ca<sup>2+</sup>調節は細胞内シグナル伝達とミトコンドリア内酵素活性調節に非常に重要である。これらの生命現象を行うため、ミトコンドリアは細胞の活動に見合った場所で適切な量のエネルギー源を供給しなければならないと考えられるが、これまでにミトコンドリアがいかにそれらをセンシングし、ATP合成系を調節しているかはほとんど分かっていない。

### 2. 研究の目的

細胞が様々な諸過程を行うにはエネルギー源としてATPが必須であり、細胞内オルガネラであるミトコンドリアがそのほとんどを合成、供給している。そのため、ミトコンドリアの機能異常は癌や神経疾患、糖尿病など様々な病態に関わるとされている。近年、ミトコンドリアは細胞の置かれた状況に応じて非常にダイナミックに形態や局在を変化させることが分かってきたが、その制御機構や役割に関しては不明な点が多い。本研究では、ミトコンドリアの細胞内局在とその活性に着目し、ミトコンドリアが様々な細胞外環境(細胞接着、増殖因子、栄養状態、酸素状態など)をセンシングし、それによりATP合成系を制御する仕組みを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

ミトコンドリアの活性をi)膜電位、ii)活性酸素(ROS)、iii)カルシウムイオンを指標とし、それらを検出する蛍光プローブや蛍光試薬を用いて、ライブイメージングにより細胞外環境と接する領域におけるミトコンドリアの活性変化を検出する。細胞外環境の違いがミトコンドリアに与える影響を調べるため、様々な細胞外環境で培養した細胞からミトコンドリアを高純度精製し、生きたミトコンドリアのATP合成活性などの酵素活性を調べるとともに、二次元電気泳動によりミトコンドリアタンパク質を分離し、違いのあるスポットを質量分析装置により網羅的に同定する。

### 4. 研究成果

細胞が様々な諸過程を行うにはエネルギー源としてATPが必須であり、細胞内オルガネラであるミトコンドリアがそのほとんどを合成、供給している。そのため、ミトコンドリアの機能異常は癌や神経疾患、糖尿病など様々な病態に関わるとされている。近年、ミトコンドリアは細胞の置かれた状況に応じて非常にダイナミックに形態や局在を変化させることが分かってきたが、その制御機構や役割に関しては不明な点が多い。本研究では、ミトコンドリアの細胞内局在とその活性に着目し、ミトコンドリアが様々な細胞外環境(細胞接着、増殖因子、栄養状態、酸素状態など)をセンシングし、それによりATP合成系を制御する仕組みを明らかにすることを目的とする。本年度はこれらの研究を進めるに当たり、まずカルシウム、ATPをセンシングするプローブおよびミトコンドリアの形態を可視化するためのプローブとしてVLMTS-GFPを安定発現する培養細胞株の作成を行った。用いた細胞はヒト網膜上皮細胞(RPE)およびイヌ腎由来正常上皮細胞(MDCK)を用いた。各細胞において、安定発現する細胞を数クローンずつ獲得した。これらの細胞を用いてタイムラプス観察によりミトコンドリア内におけるカルシウムイオン濃度、ATP濃度やミトコンドリアの形態を、様々な刺激を加えて観察した。カルシウム濃度はA23187やATPを加えた際には顕著な変化が観察されたが、増殖因子刺激や酸化ストレス刺激、栄養飢餓、また細胞密度の変化によっては観察できなかった(結果未掲載)。それらの刺激による変化は今回用いたプローブの検出限界以下であった可能性が考えられた。しかしながら、様々な培養条件下でタイムラプス観察を行った結果、グルコース飢餓状態においてミトコンドリアの形態が大きく変化することを見出した(図1)。

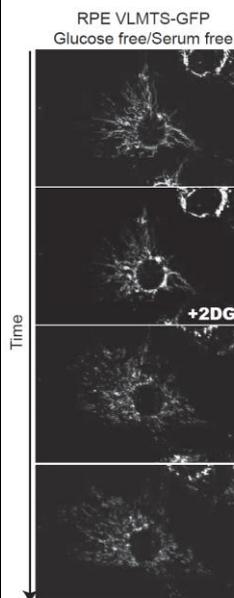


図1  
血清及びグルコース飢餓状態のRPE/VL-MTS-GFP細胞に2-deoxy-D-glucose(100mM)を加えてAMPKを活性化させたタイムラプス観察を行った。2-deoxy-D-glucose処理により比較的細長いミトコンドリアから短いミトコンドリアが増え、それらが細胞の周囲に広がっていく様子が観察された。

この分子機構について解析を行った。細胞内ATP濃度の減少によって活性化するAMPキナーゼというキナーゼが知られているため、その阻害剤を用いてミトコンドリアの形態に与える影響を検討した。その結果、AMPキナーゼの阻害剤であるcompound Cの処理によりグルコース飢餓とした時に断片化したミトコンドリアが増加した現象とは逆に、枝分かれしたつながったミトコンドリアが多く見られた(図2)。

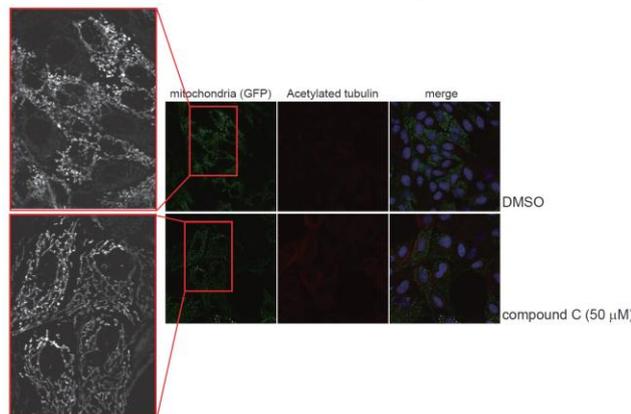


図2 MDCK/VL-MTS-GFP細胞をDMSOあるいはAMPK inhibitor compound C(50 μM)で処理をし、固定、透過処理後抗アセチル化チューブリン抗体(赤)とHoechst(青)で染色した。DMSOでは通常と同様比較的細かいミトコンドリアが観察されるが、compound C処理後は枝分かれを持つつながったミトコンドリアが観察された。

また、AMPキナーゼのキナーゼサブユニットをsiRNAにより発現抑制し、内在性のAMPキナーゼの活性を阻害した場合においてもそれらのミトコンドリアの形態変化は見られなかった。このことから、栄養飢餓状態によるミトコンドリアの形態制御にはAMPキナーゼが関与していることが示された。また、シヨ糖密度勾配遠心法を用いて細胞内オルガネラの分画を行いAMPキナーゼの基質分子がミトコンドリアに局在するかを検討したところ、AMPキナーゼの基質のリン酸化特異的抗体によって複数のタンパク質がAMPキナーゼによってリン酸化されていることを示唆する結果を得た(図3)。そこでスケールを大きくして、飢餓状態とcompound CによってAMPキナーゼを阻害した細胞からミトコンドリアを精製し、可溶化後、AMPキナーゼの基質のリン酸化特異的抗体によって免疫沈降し銀染色によって沈降タンパク質を調べたところ、飢餓状態において複数のタンパク質の沈降を確認した。AMPキナーゼは細胞外の栄養状態が悪化し細胞内のATP濃度が減少し、ADP, AMP濃度が上昇することなどにより活性化する栄養センサーキナーゼであり、本研究で得られた結果は、AMPキナーゼが環境センサーとして機能し、ミトコンドリアの形態および局在性を直接制御している可能性が示唆されたことから、現在AMPキナーゼからミトコンドリアにつながる機構を解析するため、ミトコンドリアに局在する新規AMPキナーゼ基質の同定を試みている。

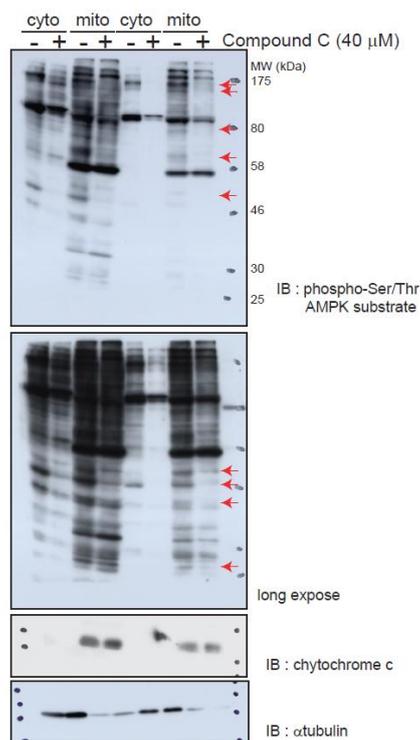


図3 RPE細胞を血清及びグルコース飢餓状態とし、DMSOあるいはcompound C存在下において2-deoxy-D-glucose(100mM)を加た。細胞質画分およびミトコンドリアリッチ画分をそれぞれ回収し、SDS-PAGEでタンパク質を分離後、AMPキナーゼのphospho-Ser/The AMPK substrate抗体でリン酸化タンパク質を検出した。矢印はミトコンドリアで主にAMPK依存的にリン酸化されるタンパク質を示している。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

満島 勝 (MITSUSHIMA MASARU)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40621107

(2) 研究分担者

なし ( )

(3) 連携研究者

なし ( )