

49. ミトコンドリアの膜と DNA の協調的な動的变化とその機能

石原 直忠

Key words : ミトコンドリア, 生体膜, 細胞小器官,
膜分裂, ミトコンドリア DNA

久留米大学 分子生命科学研究所

緒 言

ミトコンドリアは細菌の共生を起源とする二重膜構造のオルガネラである。ミトコンドリアは酸素呼吸によるエネルギー産生を行うのみならず、アポトーシスや細胞内カルシウム制御などを介して多様な細胞機能に関与している。呼吸鎖複合体の形成にはミトコンドリアが保持する独自のゲノム (mtDNA) と核ゲノムの両方が必須であり、mtDNA の変異や欠失による呼吸機能不全、さらにそれをきっかけとして起こる酸化ストレスや代謝異常が、ミトコンドリア病のみならず神経変性疾患・糖尿病・老化、さらにはがんの悪性化など多様な病態の原因となる。

哺乳動物培養細胞のミトコンドリアの生細胞観察を行うと、定常状態の非増殖細胞でもミトコンドリアは融合と分裂を頻繁に繰り返しながらダイナミックにその形態を変化させる様子を観察することができる¹⁾(図 1)。これまでにミトコンドリアの融合・分裂因子として局在の異なる 3 つの GTPase 群が同定され、またそれらの変異が神経変性疾患の原因となることがわかっている²⁾。しかしミトコンドリア分裂は細胞増殖や酸素呼吸等のミトコンドリア機能発現自体には必須ではなく、特に個体での生理機能には不明な点が多く残されている。そこで本研究では哺乳動物培養細胞及びマウスを用いてミトコンドリア分裂の生理的意義の研究を行った。

方 法

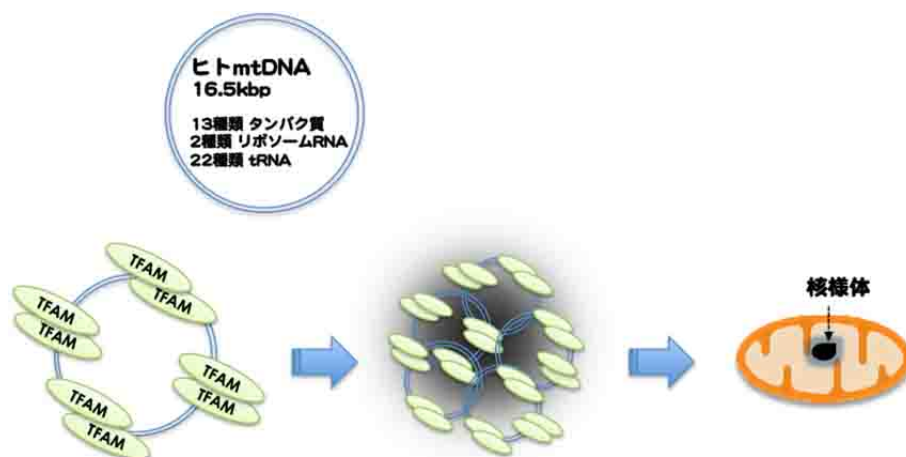


図 1. ミトコンドリア DNA (mtDNA) と核様体の構造。

ミトコンドリアは独自のゲノムを持っており、それらには 13 種類のタンパク質、2 種類のリボソーム RNA、22 種類の tRNA がコードされている。mtDNA は、マトリックス内で TFAM などの DNA 結合タンパク質と核様体と呼ばれる構造体を形成する。

mtDNA はミトコンドリアのマトリクスで TFAM 等の DNA 結合蛋白質と共に「核様体」と呼ばれる構造を形成しており、顕微鏡下に観察することができる (図 1)。しかし、これまで哺乳類の核様体の動的特性はほとんど注目されていなかった。そこで我々はミトコンドリアの膜ダイナミクスと核様体を同時に生細胞観察する実験系を構築し、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³⁾。HeLa 細胞等の哺乳動物培養細胞のミトコンドリア及びその mtDNA の核様体構造を蛍光抗体法、蛍光蛋白質、または蛍光色素により可視化して、固定組織・細胞、及び生細胞の観察を行った。心筋の観察には、ミトコンドリア分裂因子 Drp1 の筋組織特異的 KO マウスを構築し観察を行った⁴⁾。

結 果

1. ミトコンドリア分裂による mtDNA 核様体の形態制御³⁾

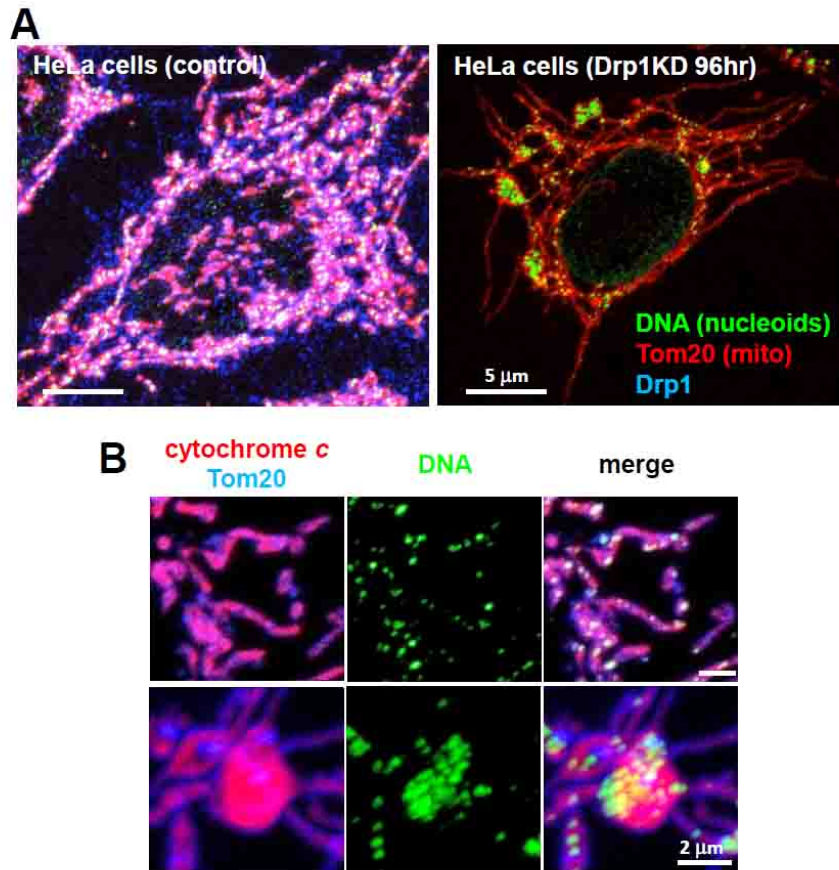


図 2. ミトコンドリア分裂不全による核様体のクラスタリングとミトバルブの形成。

A) コントロールの HeLa 細胞では核様体はミトコンドリア全体に分散している (A 左)。siRNA によって Drp1 をノックダウンするとミトコンドリアは長いネットワークを形成し、核様体の一部に集積する (A 右)。

B) ミトコンドリアの分裂抑制してできた構造体「ミトバルブ」の内部には核様体が集合・巨大化している (B 下段)。シトクローム c はミトバルブ構造の内部に封じ込められる。

哺乳動物培養細胞の細胞生物学的な解析を行った。HeLa 正常細胞では、細胞内に 1,000 個以上の核様体構造が観察される (図 2A 左)。一方、ミトコンドリア分裂因子 Drp1 を抑制すると、ミトコンドリア融合に伴い多数の核様体が集合し巨大なクラスターを形成することが分かった (図 2A 右)。この時、大きなバルブ状構造を持つミトコンドリアが形成され (この構造を我々は「ミトバルブ」と名付けた)、その内部に核様体が集合していることが分かった (図 2B)。さらに正常細胞の生細胞観察を行ったところ、Drp1 が核様体の近傍でミトコンドリア分裂を促進することで、

核様体同士の集合を防ぎ分散した状態を維持させることが分かった。またさらなる解析から、この核様体の動的変化が内膜クリステ構造制御及びアポトーシス制御に重要な機能を持つことも見出した。これは、シトクローム c がミトバルブ内に封じ込められて放出されにくくなったからではないかと考えられる。これらの結果から、核様体の構造はミトコンドリア分裂によって直接制御されており、また核様体の形態・構造が細胞制御に重要な機能を持つことが明らかになった。

2. ミトコンドリア核様体のダイナミクスの生理的意義：心筋における機能⁴⁾

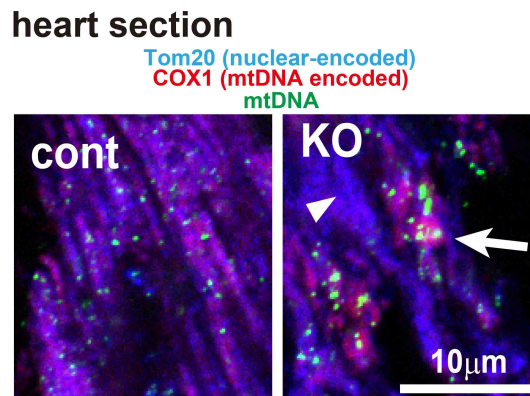


図3. マウス心筋のミトコンドリア分裂不全による核様体のクラスタリング。

心筋のミトコンドリア分裂抑制により、新生児期の心筋成長が停止する。その時、心筋内の mtDNA が一部に凝集して (矢印)、その結果呼吸鎖が細胞内に不均一に分布するようになる (矢印と矢頭のミトコンドリアを比較)。

上記の細胞生物学的な研究成果を基にして、哺乳動物個体内での核様体ダイナミクスの機能解析を行った。Drp1 遺伝子を欠損したマウス心筋では、上記成果からの予想通りに核様体が細胞内で凝集していた (図3)。この時、ミトコンドリア内で呼吸鎖が不均一に分配し、その結果心筋全体の呼吸活性が低下することが分かった。さらにこの時、筋原線維の形成が不全となり、新生児期の心機能不全から致死となることが分かった。これらの結果から、核様体の構造制御がマウス新生児期の心筋の成長に必須であること、またミトコンドリアの膜と DNA の協調的なダイナミクスが生体内でも重要な機能を持つことが初めて明らかになった。

考 察

哺乳動物の核様体に関して、その構造形成や動態に関する知見はこれまで極めて限られており、またその細胞機能や分化・細胞応答・病態における機能はほとんど理解されていなかった。今回核様体の構造形成・ダイナミクスに注目することにより新しいミトコンドリアの姿を捉えることができた。哺乳動物培養細胞での生細胞観察を行うことで核様体がミトコンドリア膜と協調的にダイナミックにその形態・分布を変化させることを世界に先駆けて示すことができた³⁾。さらに本研究では個体内での核様体の形成、さらに疾患との関連の理解を進めることができた⁴⁾。これらの成果を基にして、多様なミトコンドリア関連疾患・病態における新たな治療標的を提案することが期待される。ミトコンドリアダイナミクス因子の変動により、神経変性疾患や代謝疾患等の発症・病態が影響を受ける可能性が報告され議論されており、これらの病態におけるミトコンドリアダイナミクスの意義の理解がさらに進むことが期待される。

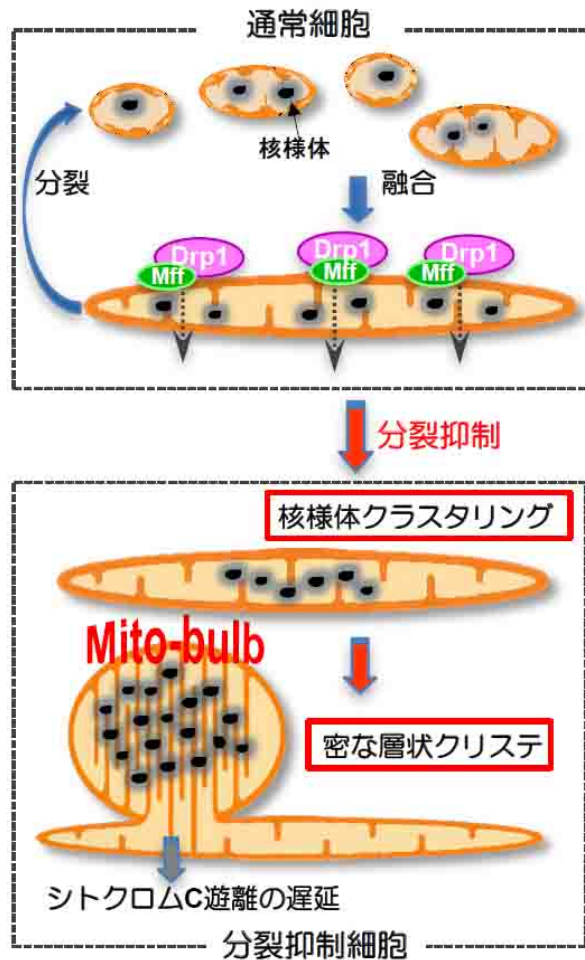


図4. ミトコンドリアの膜と DNA のダイナミクスのモデル図.

共同研究者

本研究の共同研究者は、久留米大学分子生命科学研究所の石原玲子、石原孝也である。また本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Ishihara, N., Otera, H., Oka, T. & Mihara, K. : Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antiox. Redox Signal.*, **19** : 389-399, 2013.
- 2) Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S. O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., Taguchi, N., Morinaga, H., Maeda, M., Takayanagi, R., Yokota, S. & Mihara, K. : Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.*, **11** : 958-966, 2009.
- 3) 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110** : 11863-11868, 2013.
- 4) Ishihara, T., Ban-Ishihara, R., Maeda, M., Matsunaga, Y., Ichimura, A., Kyogoku, S., Aoki, H., Katada, S., Nakada, K., Nomura, M., Mizushima, N., Mihara, K. & Ishihara, N. : Dynamics of mtDNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Mol. Cell. Biol.*, **35** : 211-223, 2015.