

107. mtDNA 動態変化によるミトコンドリアの機能制御

石原 孝也

久留米大学 分子生命科学研究所 高分子化学研究部門

Key words : ミトコンドリア, ミトコンドリア DNA, 膜ダイナミクス

緒 言

細胞内でミトコンドリアは分裂・融合を頻繁に繰り返し、ダイナミックにその形態を変化させている事が知られている。近年の研究から、その形態変化は細胞・組織の機能発現およびその維持にとっても重要であることが分かってきた¹⁾。ミトコンドリアは酸素呼吸細菌の共生が起源と考えられており、その名残として独自のゲノム (mtDNA) を保持している。それらには 13 種類のタンパク質、22 種類の tRNA、2 種類のリボソーム RNA がコードされており、ミトコンドリアの機能維持に必須である。この欠失や変異といった mtDNA の「質や量の変化」は呼吸活性を低下させ、酸化ストレスや代謝異常などを引き起こすことで、ミトコンドリア病だけでなく神経変性疾患・糖尿病・がんの悪性化など多様な病態の原因となることが報告されてきた。mtDNA はミトコンドリアのマトリックスで DNA 結合タンパク質であるミトコンドリア転写因子 A (TFAM) などとともに核様体という構造を形成し、内膜上を移動していると考えられている。しかし、mtDNA ならびに核様体の動的な特性とその分子機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、mtDNA の「動きの変化」とミトコンドリア機能制御との関係について着目し、研究を行った。

方 法

1. 免疫蛍光抗体染色

カバーガラス上で培養した細胞を化学固定し、膜透過処理を行った。その後、ブロッキング、抗体反応 (一次抗体、蛍光標識二次抗体) を行い、スライドガラス上で封入した標本を共焦点顕微鏡で観察した。組織は化学固定した後に OCT コンパウンド中に包埋し、クリオスタットで薄切しスライドガラスに貼り付け標本とした。標本に膜透過処理、ブロッキングを行い、一次抗体を一晩、4℃にて反応させた。一次抗体反応後に蛍光標識された二次抗体を一時間反応させ、十分に洗浄した標本をカバーガラスで封入し、共焦点顕微鏡で観察した。

2. シトクロム c オキシダーゼ活性染色 (COX 活性染色)

カバーガラス上に播種した心筋の初代培養細胞に対して DAB を用いる Seligman 法に準じた COX 活性染色を行った。

結 果

1. HeLa 細胞でミトコンドリア分裂不全により生じる mito-bulb 構造はアポトーシスを制御する

mtDNA は核様体と呼ばれる構造をとり、HeLa 細胞では 1 細胞あたり 1,000 個以上の核様体が観察される。哺乳類細胞では、核様体はミトコンドリア内膜に局在していることが分かっていたが、融合と分裂を頻繁に繰り返すミトコンドリアの内部でどのような挙動をとっているのかについては明らかになっていなかった。HeLa 細胞を用いてミトコンドリア分裂制御因子である *Drp1* の発現を抑制すると、長く伸長したミトコンドリアの一部が非常に大きな風船のような構造 (mito-bulb) を作り、その中で核様体がクラスターリングしていることを見出した²⁾。この構造は、CRISPR-Cas9 システムで作製した *Drp1* KO 細胞でも観察できる³⁾。電子顕微鏡でミトコンドリアの微細構造を観察してみると、*Drp1* ノックダウン細胞の mito-bulb ではクリステが非常に発達しており、ある種のアポトーシスが遅延することが分かった。細胞をあらかじめ DNA 合成阻害剤である ddC で処理し核様体を消失させると、*Drp1* をノックダウンし

でもクリステ構造の発達はみられなかった。すなわち、核様体の分布がミトコンドリアの膜構造に影響を与えるというこれまでに知られていなかった新たな知見を得ることができた (図1) [2\)](#)。

HeLa細胞

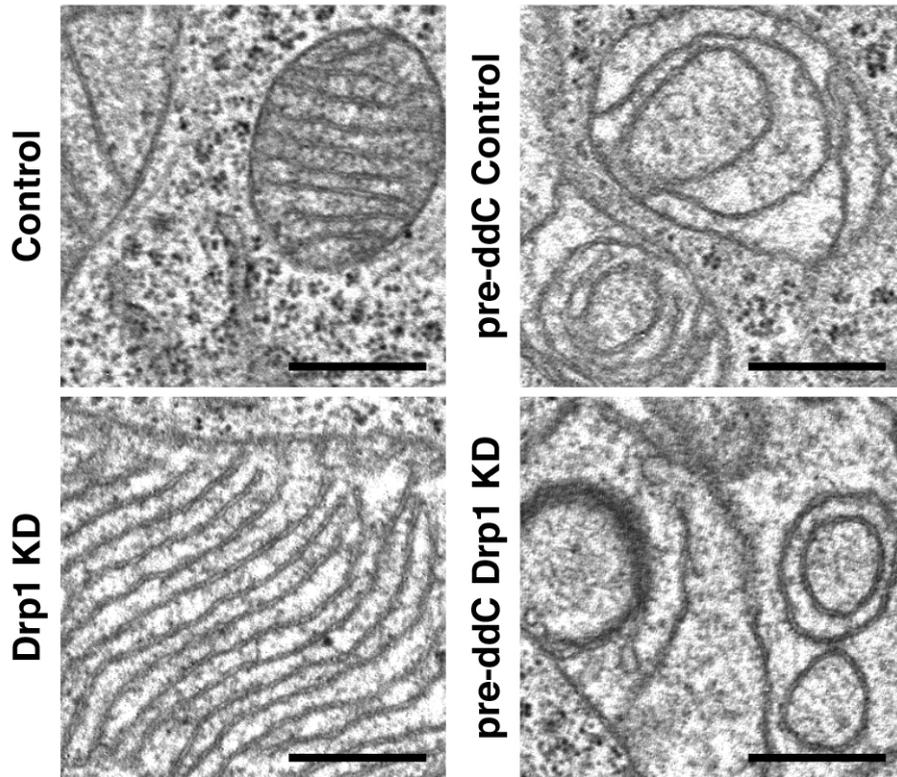


図1. 核様体の分布がミトコンドリアの膜構造に影響を与える

HeLa 細胞に *Drp1* の siRNA を導入して発現を抑制すると、大きな風船のようなミトコンドリアの内部に発達したクリステ構造がみられる (左下)。しかし、事前に ddC 処理を行い核様体を消失させると、*Drp1* の発現を抑制してもクリステ構造は密にならない (右下)。Scale Bar: 0.5 μ m.

2. 心筋では mtDNA のクラスターリングが呼吸鎖サブユニットの不均一な分布を引き起こす

mtDNA の動的な特性について生理的な意義を解析するため、*Drp1* 遺伝子を欠損したマウスの心臓の解析を行った。このマウスは生後まもなく致死となることがわかった⁴⁾。*Drp1* KO マウスの心臓の免疫蛍光抗体染色にて mtDNA の観察を行ったところ、HeLa 細胞で観察されたように核様体のクラスターリングを認めた。このときに、呼吸鎖 IV サブユニット (MTCO1) の分布がミトコンドリア内部で不均一になっていることが分かった。さらに MTCO1 の不均一な分布と核様体がクラスターリングしている箇所がよくオーバーラップしていた (図 2A)。この意義について詳細な解析を進めるため、野生型のマウスと *Drp1* KO マウスからそれぞれ心筋初代培養細胞を単離した。*Drp1* KO マウスでは HeLa 細胞でみられた mito-bulb が観察され、その内部に核様体のクラスターリングがみられた (図 2B)。この細胞でシトクロム c オキシダーゼ活性染色 (COX 活性染色) を行い、ミトコンドリアの活性と核様体のクラスターリングとの関係について検討した。野生型マウスから単離した心筋初代培養細胞は分散した核様体とミトコンドリア全体に COX 活性を確認できた。ところが、*Drp1* KO マウス由来の心筋初代培養細胞では不均一な COX 活性のパターンがみられ、その偏りと核様体のクラスターリングが一致していた (図 2C)。組織と初代培養細胞の解析結果から心筋ではクラスター

ングした核様体は呼吸鎖サブユニットの不均一な分布を誘導し、結果として心筋全体の呼吸活性が低下していることが考えられた (図3)。

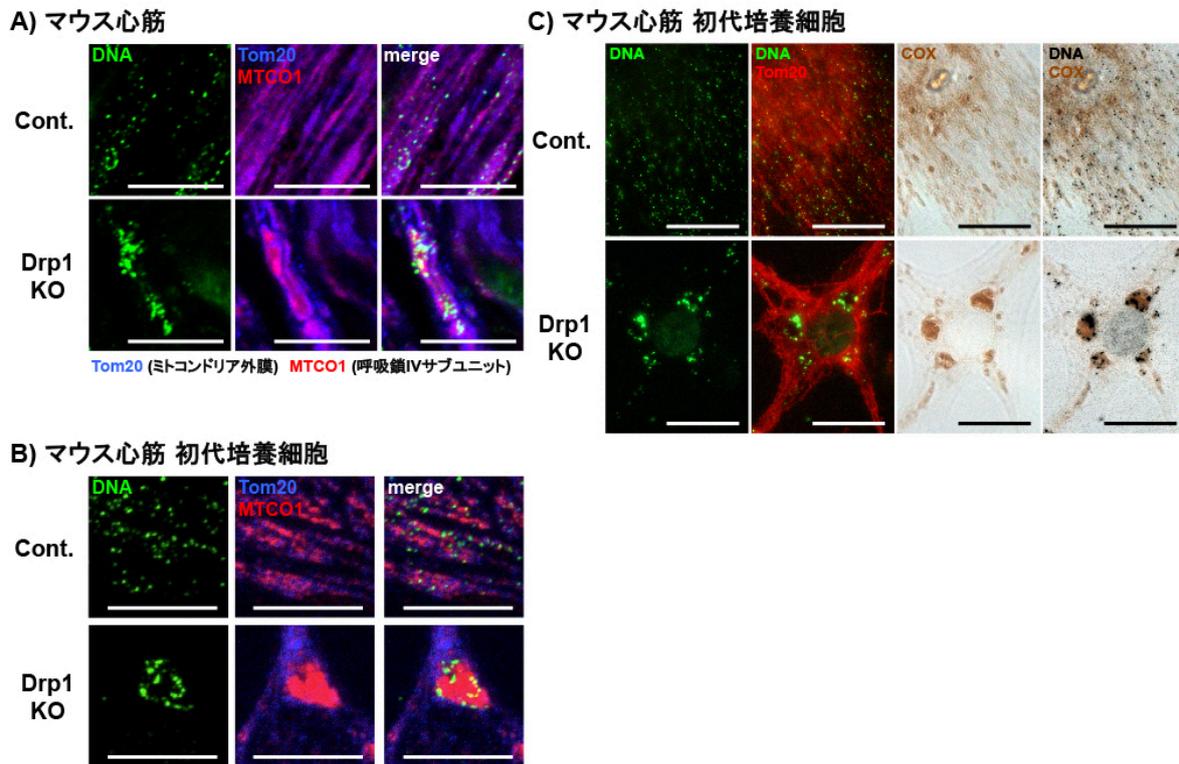


図2. 心筋では mtDNA のクラスタリングが呼吸鎖サブユニットの不均一な分布を引き起こす
 A) 筋組織特異的 *Drp1* KO マウス心筋で核様体のクラスタリングと呼吸鎖サブユニットの不均一な分布がみられる。Scale Bar: 10 μ m. B) *Drp1* KO マウス由来の心筋初代培養細胞で mito-bulb 構造と核様体のクラスタリングがみられる。Scale Bar: 10 μ m. C) *Drp1* KO マウス由来の心筋初代培養細胞では核様体の分布が偏り、COX 活性が不均一になる。Scale Bar: 25 μ m.

考 察

本研究の培養細胞とモデルマウスの解析から、ミトコンドリア膜と mtDNA はそれぞれダイナミックにその形態と挙動を変化させているだけでなく、これらの変化の一部は膜と mtDNA が協調的に働いた結果であることが明らかとなった。これまでは、mtDNA の議論は「質や量の変化」を中心に進められてきたが、本研究結果から「動きの変化」もまたミトコンドリア機能制御に重要な要因となることを示すことができた。ミトコンドリア機能低下と疾患の関連が考えられる際には、mtDNA の変異やコピー数減少だけでなく分布異常や動態不全もその原因となっている可能性が示唆される。しかし、mtDNA の動態に関わる因子の知見については限られており、今後はこれら因子の探索やその分子機構の解明が関連疾患の病態理解へとつながっていくことが期待される。

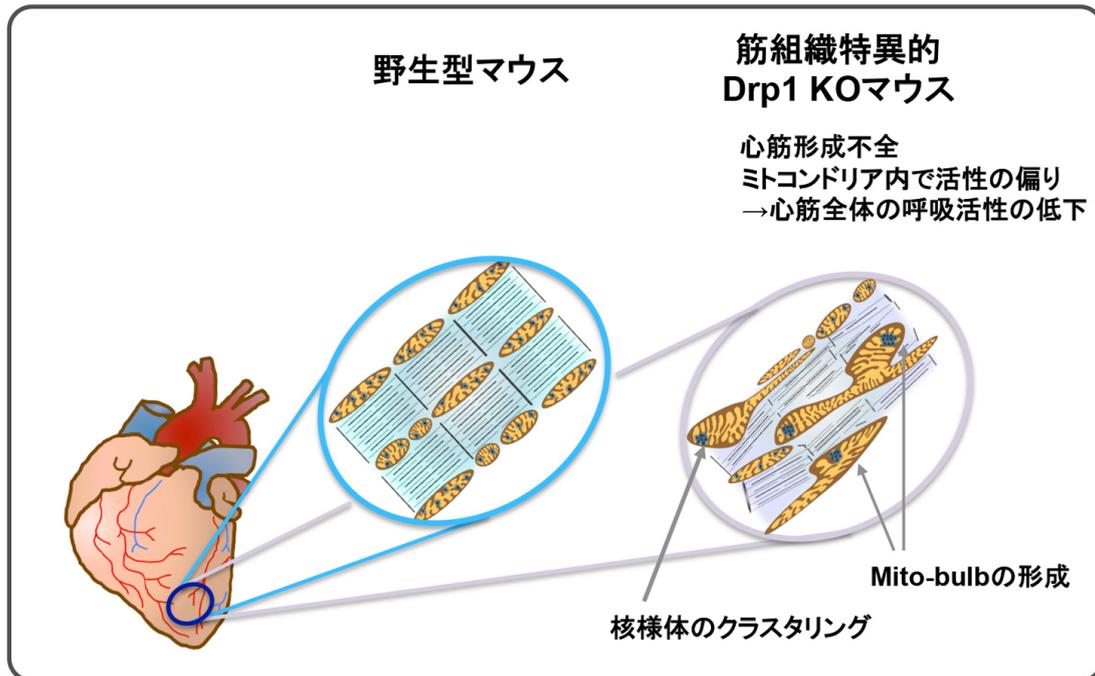


図3. 心筋におけるミトコンドリアダイナミクスと mtDNA 分布制御のモデル図

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直忠、石原玲子、一村紋佳である。最後に、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 T, Kohno H, Ishihara N. Physiological roles of mitochondrial fission in cultured cells and mouse development. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1350:77-81. doi: 10.1111/nyas.12848. Review. PMID: 26375863
- 2) 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.* 2013;110(29):11863-8. doi: 10.1073/pnas.1301951110. PMID: 23821750
- 3) Saita S, Ishihara T, Maeda M, Iemura S, Natsume T, Mihara K, Ishihara N. Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission. *Genes Cells.* 2016;21(5):408-24. doi: 10.1111/gtc.12351. PMID: 26935475
- 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 mitochondrial DNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Mol Cell Biol.* 2015;35(1):211-23. doi: 10.1128/MCB.01054-14. PMID: 25348719