

131. ヒトミトコンドリア形態制御因子の網羅的探索

田村 康

*山形大学 理学部 物質生命化学科

Key words : ミトコンドリア, 小胞体, オルガネラコンタクト

緒 言

近年の研究により異なるオルガネラ同士が、物理的に結合するコンタクトサイトを形成し、互いに物質や情報をやりとりすることで、その正常な機能を維持することが急速に明らかになりつつある。例えば、出芽酵母においてミトコンドリアと小胞体を物理的に結合させるERMES (ER-Mitochondria Encounter Structure) [1\)](#)、MECA (Mitochondria-ER-Cortex Anchor) [2\)](#)、ミトコンドリアと液胞 (リソソーム) を結合させるvCLAMP (vacuole and mitochondria patch) [3,4\)](#)、核膜 (小胞体) と液胞 (リソソーム) を結合させるNVJ (Nucleus-Vacuole Junction) [5\)](#) など様々なオルガネラ間コンタクトサイトの存在が次々に明らかとなっている。これらの因子の発見により、これまでとは全く異なる、新しいオルガネラ (ミトコンドリア) 像が明らかになりつつある。このように出芽酵母を用いた解析では、オルガネラバイオロジーにおけるパラダイムシフトが進んでいるところであるが、ヒトなどの高等生物では、オルガネラ間テザリング因子は全くと言っていいほど明らかになっていない (一部報告はあるが研究者間でコンセンサスがとれているものはないと言って良い)。ミトコンドリア・小胞体間のコンタクト部位 (MAM: Mitochondria-Associated Membranes) でオートファゴソーム形成が行われるという報告や[6\)](#)、MAMの形成不全がアルツハイマー病の原因となる報告[7\)](#)があることから、医学的見地からも、その分子基盤解明は重要な意味を持つ。そこで本研究ではヒト一倍体培養細胞 (Hap1 細胞) を用い、ヒト小胞体・ミトコンドリア結合因子の同定を目指し、遺伝学スクリーニング方法、条件の検討を行った。

方法、結果および考察

1. ヒト培養細胞を用いたミトコンドリア形態異常を示す変異細胞の単離実験の条件検討

出芽酵母を用いた研究から、このようなオルガネラテザリング因子の欠損がミトコンドリア形態異常を引き起こすことがわかっているため、オルガネラテザリング因子の同定の足がかりとして、ミトコンドリア形態制御因子のスクリーニング法の条件検討を行った。まずミトコンドリア形態異常を示す突然変異細胞を単離するために、ミトコンドリア局在型 GFP を発現するヒト一倍体培養細胞 (Hap1 細胞) を作製した (図 1)。

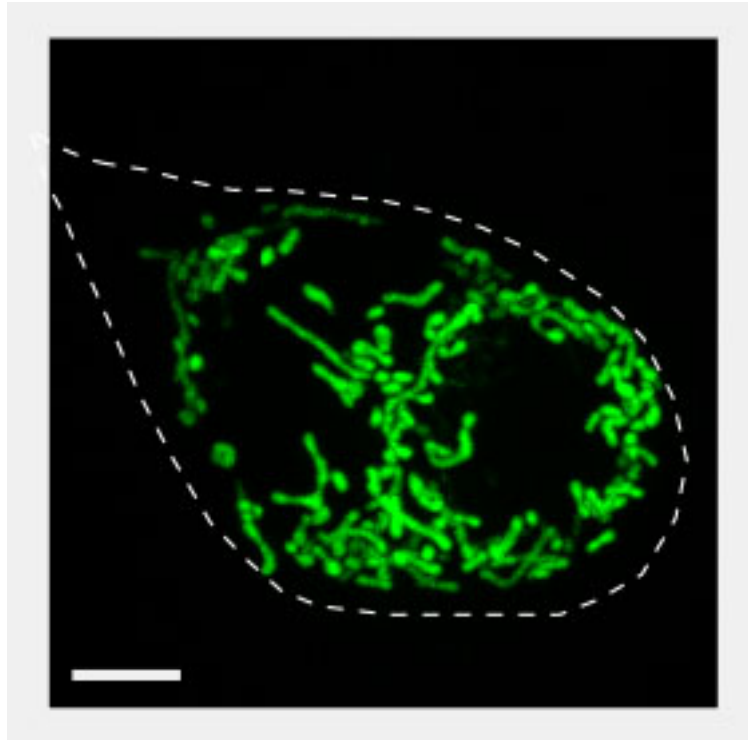


図1. ミトコンドリア局在型 GFP 発現 Hap1 細胞

ミトコンドリア局在型 GFP (Su9-GFP) を発現する Hap1 細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。

Scale bar: 5 μ m.

この細胞を DMEM (10% FBS) で、37°C 5% CO₂ 環境下、100 mm タイプ I コラーゲンコート内で培養した。トリプシン処理によって細胞を回収し、細胞密度が 0.5×10^6 個/ml となるように DMEM (10% FBS) で懸濁した。この細胞懸濁液を SONY セルソーター SH800 を用いて、96 ウェルプレートにシングルセルソートした。まずシングルセルソーティングに使用する流路の径と、細胞を回収する 96 well プレートの材質を変化させ、細胞生存率への影響を調べた。その結果、細胞の生存率は以下ようになった。

流路径 100 μ m、ガラスプレート：21%

流路径 130 μ m、ガラスプレート：34%

流路径 100 μ m、タイプ I コラーゲンコートプラスチックプレート：32%

流路径 130 μ m、タイプ I コラーゲンコートプラスチックプレート：30%

以上の結果から、タイプ I コラーゲンコートプレートに回収する場合は流路径の影響を大きく受けないが、ガラスプレートに回収する場合は影響を受けることがわかった。接着しにくいガラスプレートでは、流路径が小さい時に細胞が受けるダメージの影響が大きく出ている可能性がある。シングルセルソート後の Hap1 細胞の生存率は 3 割ほどであり、数百、数千個レベルの細胞を手動でスクリーニングすることは可能かもしれない。しかし、本格的なゲノムワイドスクリーニングを行うためには、このようなシングルセルソーティングでは効率が悪すぎるため、他のスクリーニング方法を検討した。

2. オルガネラコンタクトを定量的に評価する系の検討

ミトコンドリアの形態を指標に、オルガネラコンタクト因子を同定する方法は効率が悪すぎる。オルガネラコンタクトを定量的に評価できる実験系が構築できれば、そのシグナルを指標に多数の細胞を集団でソーティングでき、スクリーニングの効率が格段に上がるはずである。そこで本研究では、オルガネラコンタクトを split 蛍光タンパク質で検出する実験系の構築を行った。具体的にはまず、ミトコンドリア・小胞体間のテザリング因子が既に同定されている生物種、出芽酵母を用いて、このような実験系が構築可能か検討した。出芽酵母では、ERMES 複合体と呼ばれるタンパク

質複合体が、ミトコンドリア・小胞体コンタクト領域にクラスターを形成し、オルガネラ間を結合している。ERMES複合体構成因子に GFP を融合させ、蛍光顕微鏡下で観察すると、ミトコンドリア（もしくは小胞体上に）ドット状のシグナルとして検出される（図 2）。

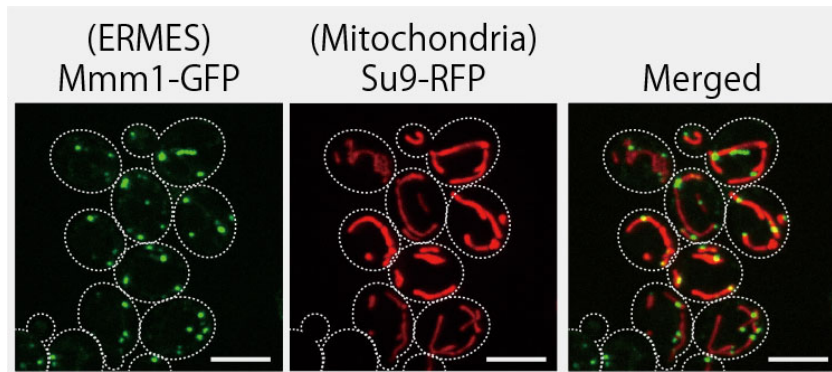


図 2. 出芽酵母ミトコンドリア・小胞体テザリング因子 ERMES 複合体

ERMES 複合体構成因子 Mmm1 と GFP との融合タンパク質 Mmm1-GFP とミトコンドリア局在型 RFP (Su9-RFP) を発現する酵母細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。Scale bar: 5 μ m.

split GFP 分子をミトコンドリア外膜もしくは小胞体膜に局在するタンパク質（もしくは局在化シグナル）と融合して発現させておき、オルガネラ間距離が近接している領域があれば、そこで GFP 分子が再構成されるはずである。実際にミトコンドリアと小胞体膜上にサイトゾルに露出するように split GFP を発現させた細胞を、蛍光顕微鏡下で観察したところ、split GFP のシグナルがミトコンドリアもしくは小胞体膜上にドット状で観察された（図 3）。

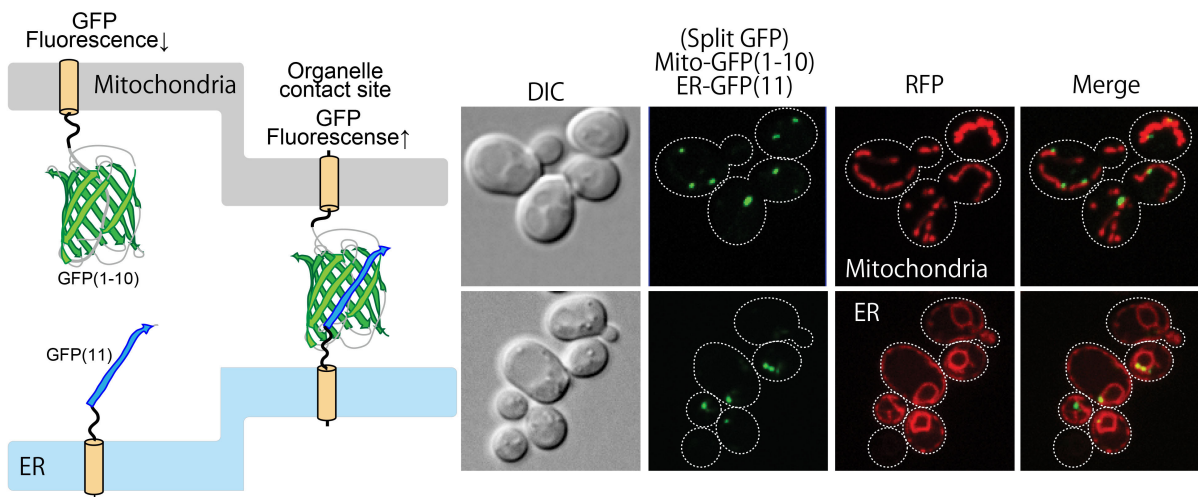


図 3. split GFP 分子を利用したオルガネラ間コンタクト領域の検出

ミトコンドリア外膜と小胞体膜上に split GFP 分子(GFP の 11 本の β ストランドの内 1~10 番目 GFP (1-10) と 11 番目 GFP (11) をそれぞれ発現させた。両オルガネラが近接する領域では GFP 分子が再構成され、GFP の蛍光を発すると考えられた。実際にミトコンドリアと小胞体(赤色蛍光タンパクで可視化)上にドット状のシグナルとして再構成した GFP シグナルが検出された。Scale bar: 5 μ m.

興味深いことに、この split GFP のシグナルが、ERMES 複合体が示すドットのパターンと共局在することを確認した (図 4)。

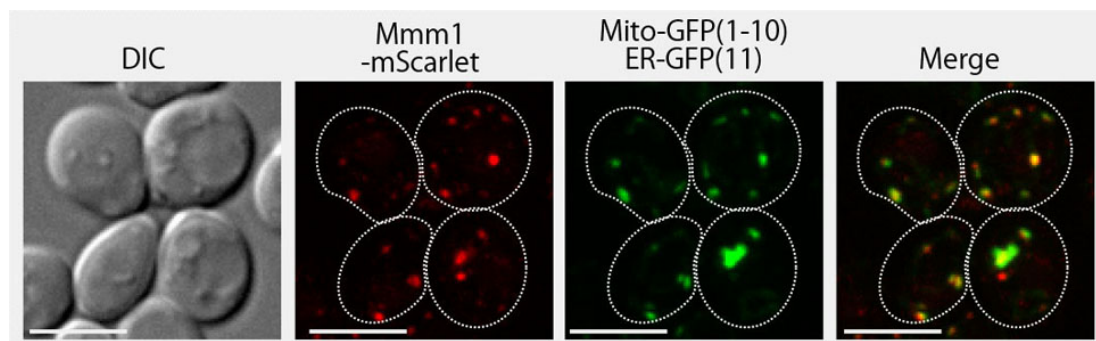


図 4. ミトコンドリア・小胞体間近接領域を検出する split GFP シグナルは ERMES 複合体と共局在する

ERMES 複合体構成因子 Mmm1 と赤色蛍光タンパク質 mScarlet との融合タンパク質を発現する酵母株に、図 4 と同様の split GFP 分子を発現させ、蛍光顕微鏡下で観察した。Scale bar: 5 μ m.

この結果は、split GFP 分子が既存のオルガネラ間コンタクトサイトを介して再構成していることを示す重要な証拠であり、Split GFP を利用したオルガネラコンタクトの検出が定量的に行える可能性を示している。今後、ヒトの培養細胞のオルガネラ膜上に split GFP タンパク質を発現させて、split GFP のシグナルを指標にオルガネラ間コンタクト因子をスクリーニング出来ると考えられる。

文 献

- 1) Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, Walter P. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):477-81. doi: 10.1126/science.1175088.
- 2) Lackner LL, Ping H, Graef M, Murley A, Nunnari J. Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 5;110(6):E458-67. doi: 10.1073/pnas.1215232110.
- 3) Elbaz-Alon Y, Rosenfeld-Gur E, Shinder V, Futerman AH, Geiger T, Schuldiner M. A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev Cell*. 2014 Jul 14;30(1):95-102. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.007.
- 4) Hönscher C, Mari M, Auffarth K, Bohnert M, Griffith J, Geerts W, van der Laan M, Cabrera M, Reggiori F, Ungermann C. Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev Cell*. 2014 Jul 14;30(1):86-94. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.006.
- 5) Henne WM, Zhu L, Balogi Z, Stefan C, Pleiss JA, Emr SD. Mdm1/Snx13 is a novel ER-endolysosomal interorganelle tethering protein. *J Cell Biol*. 2015 Aug 17;210(4):541-51. doi: 10.1083/jcb.201503088.
- 6) Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013 Mar 21;495(7441):389-93. doi: 10.1038/nature11910.
- 7) Schon EA, Area-Gomez E. Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Jul;55:26-36. doi: 10.1016/j.mcn.2012.07.011.