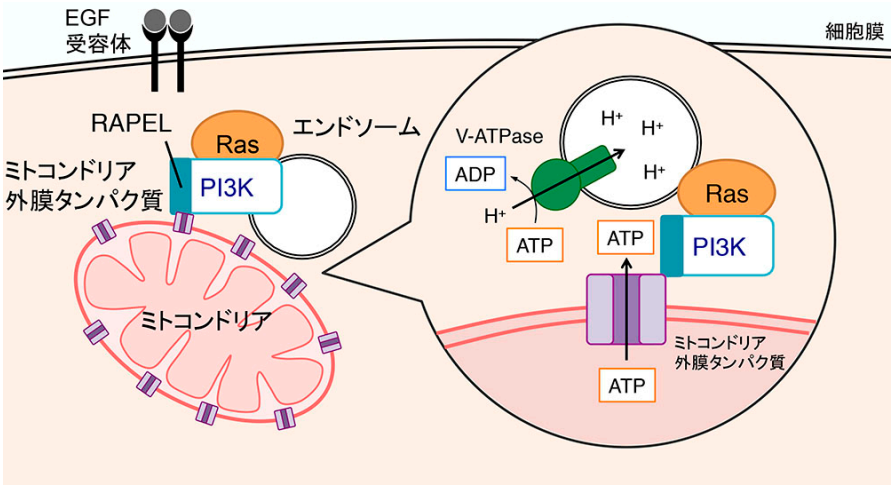
155　異種オルガネラ間相互作用の機序と生理的意義の解明	藤岡　容一朗

【目的】細胞内オルガネラは細胞生理機能に必須の役割を担っているが、それぞれが固有の機能を有しており、互いに相互作用するか否かについては、一部の現象を除きよく解っていない。これまで我々は、蛍光イメージング手法による生きた細胞におけるシグナル伝達研究により、低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras と phosphoinositide 3-kinase（PI3K）がエンドソームからシグナルを発することがエンドサイトーシスの制御に重要であることを明らかにしてきた。その研究の過程で、Ras-PI3K 複合体を時空間的に制御する因子がミトコンドリアに局在することを突き止め、エンドソームとミトコンドリアという異種オルガネラ間相互作用に興味を持ち研究を行うこととした。

【方法】本研究では、Ras-PI3K 複合体を時空間的に制御する因子の機能解析とともに、エンドソームとミトコンドリア接触時のエンドソームの分子メカニズムと、接触がエンドソームに与える影響を、オプトジェネティクスをはじめとするバイオイメージング技術を用いた研究により明らかにした。

【結果】我々はエンドソームとミトコンドリアが相互作用することを明らかにした。また、この相互作用には Ras-PI3K 複合体を時空間的に制御する因子が関与することを示した。さらに、エンドソームとミトコンドリア間相互作用をオプトジェネティクスにより人為的に誘導する系の構築に成功し、この相互作用を誘導した際にエンドソームの酸性化が促進することが示唆された。以上から、エンドソームとミトコンドリア間相互作用がエンドサイトーシスを促進するという、既存の概念を覆すような現象を捉えることができた。

エンドソームとミトコンドリア間相互作用を介したエンドソーム酸性化機構



155. 異種オルガネラ間相互作用の機序と生理的意義の解明

藤岡　容一朗

*北海道大学 大学院医学研究科 細胞生理学分野

Key words：オルガネラ，エンドサイトーシス，オプトジェネティクス

緒　言

細胞内小器官（オルガネラ）はそれぞれが固有の機能を有しており、一般的には独立して細胞生理機能に必須の役割を担っていると考えられてきた。しかし、最近我々はエンドソームとミトコンドリアが相互作用し、エンドサイトーシスを促進するという、既存の概念を覆すような現象を捉えることができた。これまで我々は、フェルスター共鳴エネルギー移動（Förster resonance energy transfer：FRET）や蛍光タンパク質再構成法（bimolecular fluorescence complementation：BiFC）等のイメージング手法による生きた細胞におけるシグナル伝達研究を行ってきた［1］。また、低分子量GTP結合タンパク質Rasとphosphoinositide 3-kinase（PI3K）の複合体がエンドソームへ特異的に移行すること、エンドソームでのPI3K活性化にRasが必要であることを発見した［2］。さらに、Ca^{2+}-Ras-PI3Kシグナルが、エンドサイトーシスとウイルス粒子の取込に重要であることを報告した[3〜5]。最近では、アンジオテンシンIIの1型および2型受容体がエンドソームでヘテロ二量体を形成することが、互いのシグナル伝達に重要であることや[6]、インテグリン分子の細胞内輸送が細胞接着増強と生存シグナル発信に重要であることなどを報告している[7]。以上の結果をまとめると、細胞内小器官と膜輸送、特にエンドソームとエンドサイトーシスの制御は、シグナル伝達機構に高度に制御されているとともに、積極的なシグナルプラットフォームとして、シグナル伝達や細胞機能の制御に関与することが明らかとなっている。

その後我々はRas-PI3Kのエンドソーム局在とエンドサイトーシス亢進に必須のアミノ酸配列を同定し、Ras-PI3K endosome localization domain（RAPEL domain）と命名した。すなわち、RAPELを欠損したPI3KはRasと結合できるにも関わらず、複合体のエンドソーム移行ができなくなる（図1；論文投稿中）。また、RAPELの過剰発現でエンドサイトーシスが抑制され、結果としてエンドサイトーシスを介して細胞に侵入するウイルスの感染も抑制された。

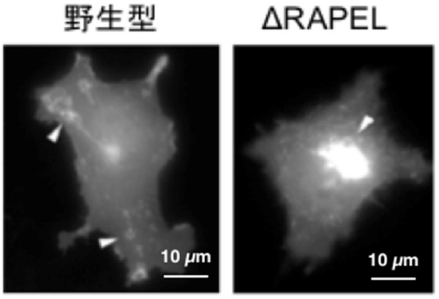


図1. RAPEL欠損によるRas-PI3K複合体移行の阻害
野生型PI3KとRas複合体はエンドソームに局在するが、RAPEL欠損PI3Kは核周囲に蓄積する。（ともに矢頭で表す）バーは10 μm。

以上の結果はRas-PI3K複合体のエンドソーム移行とエンドサイトーシスを制御するRAPEL結合因子の存在を示唆するものである。スクリーニングの結果、同定された40超の候補分子には、興味深いことに、ミトコンドリアや小胞体での物質輸送関連分子が含まれており、これらのタンパク質のノックダウンによりやRas-PI3Kのエンドソーム局在やエンドサイトーシスが抑制された。細胞内オルガネラが互いに直接相互作用するか否かについては、小胞体とエンド

*現在の所属：北海道大学 大学院医学研究院 細胞生理学教室

ソーム、小胞体とミトコンドリアなど一部の現象を除きよく解っていない。そこで本研究では、ミトコンドリアとエンドソーム間の相互作用に注目したところ、RAPEL 結合因子がその相互作用に関与し、異種オルガネラ間相互作用がエンドソームの酸性化を制御することが示された。

方　法

1. ミトコンドリアーエンドソーム相互作用の定量解析

RAPEL 結合タンパク質が局在するミトコンドリアと Ras-PI3K 複合体が局在するエンドソームが相互作用するか蛍光イメージングで解析した。

2. オプトジェネティクスによる異種オルガネラ相互作用の誘導

青色光より誘導される分子間相互作用である Cryptochrome2（CRY2）と CIB1 の結合を用いて、図 3 のような異種オルガネラ接触誘導法を構築した。CRY2 に iRFP とエンドソーム局在配列を付加し、エンドソームに局在させた。一方、CIB1 には RFP とミトコンドリア外膜タンパク質 TOM20 を付加し、ミトコンドリアに局在させた。以上により、473 nm の光照射で CRY2-CIB1 結合が生じ、それに伴いエンドソーム–ミトコンドリア接触が誘発する系を構築した。

3. エンドゾームーミトコンドリア相互作用時の物質交換とエンドサイトーシス制御機構の解明

構築したオプトジェネティクスの系を用いてエンドソームーミトコンドリア接触を人為的に誘導し、エンドソームが酸性化するか検討した。エンドソームの酸性化は酸性化で蛍光強度が増加する色素で標識されたデキストランを用いて定量解析した。

結果および考察

1. エンドソームとミトコンドリアは一過的に相互作用した

エンドソームとミトコンドリアの挙動を注意深く観察したところ、両者の一過的な相互作用が確認された（図 2）。また、同定された因子の 1 つであるミトコンドリア外膜タンパク質のノックダウンによりミトコンドリアとエンドソームの相互作用が減少した（図 2）。これまでに、ミトコンドリア外膜タンパク質のノックダウンでエンドサイトーシスが抑制されたことが明らかになっており、エンドソームとミトコンドリアの相互作用がエンドサイトーシスを制御することが示唆された。また、ミトコンドリア外膜タンパク質がエンドソームの酸性化に寄与する VATPase と結合することが明らかとなり、ミトコンドリアとエンドソームは PI3K-ミトコンドリア外膜タンパク質-VATPase 複合体を足場にした直接接触を介して、ATP やプロトンのやり取りを行うのではないかと考えた（図 3）。

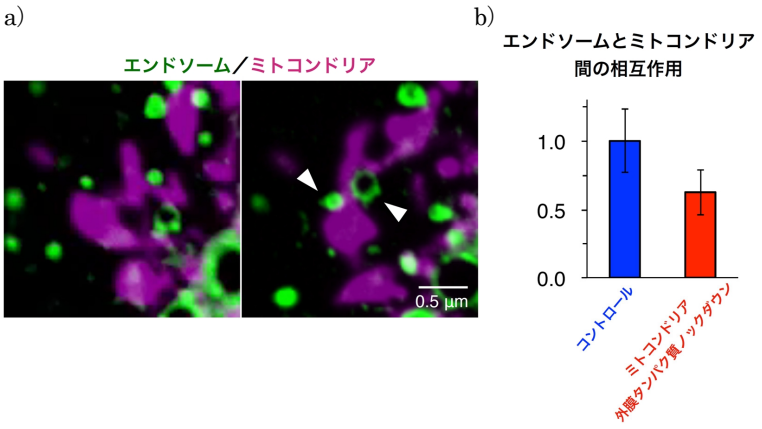


図 2. エンドソームーミトコンドリア間相互作用

a）ライブセルイメージングにより、培養細胞におけるエンドソーム（緑）とミトコンドリア（マゼンタ）を可視化した際の代表的な例を示した。バーは 0.5 μm。

b）ミトコンドリア外膜タンパク質を発現抑制した際のエンドソーム–ミトコンドリア相互作用を定量化した。

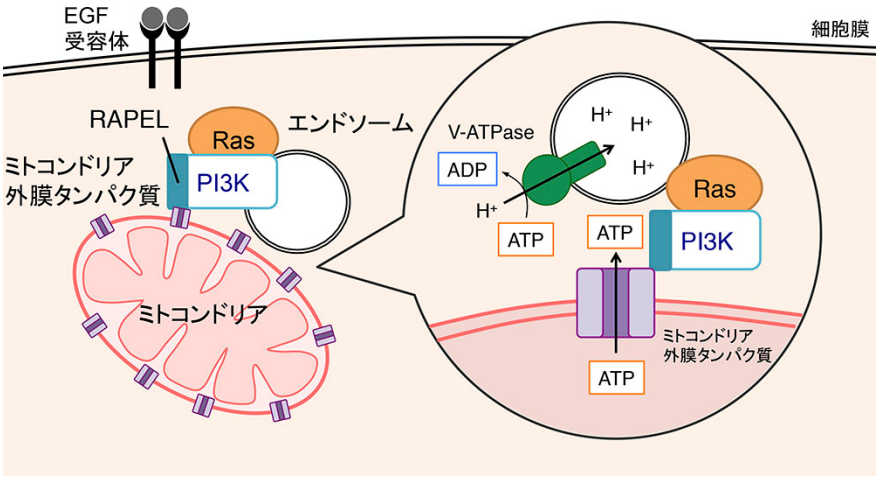


図 3. エンドソームーミトコンドリア間相互作用を介したエンドソーム酸性化機構
ミトコンドリアとエンドソームが相互作用する際に、PI3Kーミトコンドリア外膜タンパク質ー VATPase 複合体が相互作用インターフェースを形成する。

2. オプトジェネティクスによりエンドソームーミトコンドリア間相互作用を誘導した

そこで、光遺伝学（オプトジェネティクス）で人為的に異種オルガネラ相互作用を誘発したときのエンドソーム内の pH 変化を評価した。CRY2 に iRFP とエンドソーム局在配列である FYVE domain を付加し、エンドソームに局在させた。一方、CIB1 には RFP とミトコンドリア外膜タンパク質 TOM20 を付加し、ミトコンドリアに局在させた。細胞を 473 nm の光で照射し、CRY2-CIB1 結合に伴ったエンドソームーミトコンドリア相互作用が誘導されるか検証した（図 4）。観察開始から 5 分後に 473 nm の光を照射したところ、エンドソームがミトコンドリアに集積する様子が確認された。画像解析ソフト Metamorph を用いてエンドソームとミトコンドリアの構造を抽出し、それらの共局在を定量した。その結果、光照射後すぐにエンドソームのミトコンドリアの共局在が生じることが明らかとなり、青色光照射でエンドソーム—ミトコンドリア間相互作用を誘導できることが示された（図 5）。

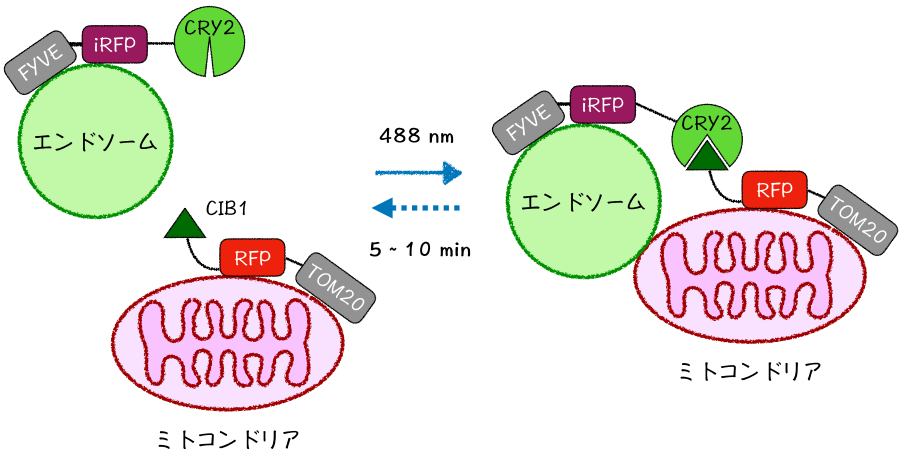


図 4. オプトジェネティクスによるエンドソームーミトコンドリア間相互作用の誘導
青色光照射によって誘導される CRY2-CIB1 結合を用いて、エンドソームとミトコンドリア間の相互作用を人為的に惹起させる。

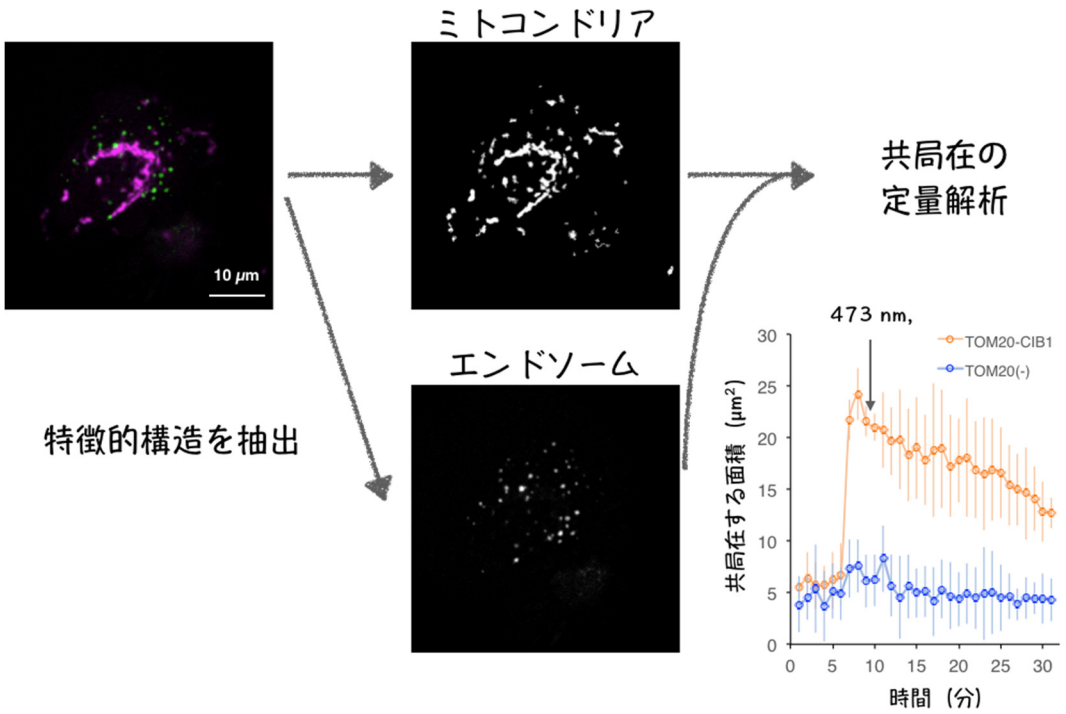


図 5. 青色光照射で誘導したエンドソーム–ミトコンドリア間相互作用の定量解析
オプトジェネティクスでエンドソーム–ミトコンドリア間相互作用を誘導した際に、エンドソームとミトコンドリアの構造をそれぞれ抽出し、共局在した面積を定量した。バーは 10 μm。

3. エンドゾーム–ミトコンドリア相互作用時にエンドソーム酸性化が促進した

そこで、エンドソームーミトコンドリアが相互作用した際に、エンドソーム内で酸性化が促進するか検証するために、酸性化に伴い蛍光強度が上昇する色素が付加したデキストラン（Acidi-Dx）の取り込み量を評価した。その結果、青色光を照射した細胞で Acid-Dx 由来の蛍光強度が上昇した（図 6）。すなわちエンドソームーミトコンドリア間相互作用により、エンドソームの酸性化が促進したことが示唆された。以上から、PI3K-ミトコンドリア外膜タンパク質-VATPase を介したエンドソームーミトコンドリア間相互作用が、エンドサイトーシスを制御することが示唆された。

今後は、プロトン以外のイオンや ATP の変化を検証するとともに、エンドソームーミトコンドリア間相互作用の詳細な分子メカニズムを明らかにしていきたい。

ミトコンドリアやエンドサイトーシスが関連する疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、がんなど多岐にわたり、その原因が明らかにされていないものも多い。本研究によりミトコンドリア–エンドソーム間相互作用の生理学的意義が解明されることで、新たな切り口でこれらの疾患に対してアプローチでき、将来的には疾患原因の解明、新たな治療法や予防法の開発に繋がり、社会への貢献も期待される。

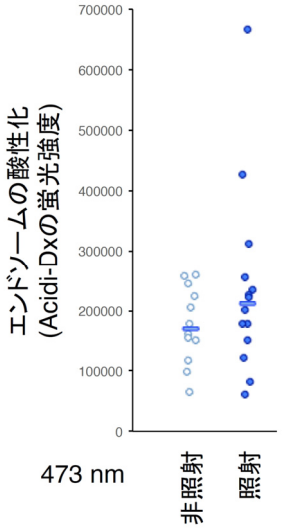


図6. エンドソーム–ミトコンドリア間相互作用を誘導した際のエンドソーム酸性化
オプトジェネティクスでエンドソーム–ミトコンドリア間相互作用を誘導した細胞に、酸性化で蛍光強度が増加する色素で標識したデキストラン取り込ませ、蛍光顕微鏡で観察した。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究院細胞生理学教室の教授大場雄介と同教室大学院生佐藤絢である。

文　献

1) Fujioka Y, Utsumi M, Ohba Y, Watanabe Y. Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology. 2007 Sep;48(9):1243-1253. PMID: 17675322
2) Tsutsumi K, Fujioka Y, Tsuda M, Kawaguchi H, Ohba Y. Visualization of Ras-PI3K interaction in the endosome using BiFC. Cellular Signalling. Elsevier Inc; 2009 Nov;21(11):1672-1679. PMID: 19616621
3) Fujioka Y, Tsuda M, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y. The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. Park M-S, editor. PLoS ONE. Public Library of Science; 2011 Jan 20;6(1):e16324. PMCID: PMC3024431
4) Fujioka Y, Tsuda M, Nanbo A, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y. A Ca2+-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. Nat Commun. Nature Publishing Group; 2013;4:2763-13. PMID: 24434940
5) Fujioka Y, Nishide S, Ose T, Suzuki T, Kato I, Fukuhara H, Fujioka M, Horiuchi K, Satoh A , Nepal P, Kashiwagi S, Wang J, Horiguchi M, Sato Y, Paudel S, Nanbo A, Miyazaki T, Hasegawa H, Maenaka K and Ohba Y. A Sialylated Voltage-Dependent Ca2+ Channel Binds Hemagglutinin and Mediates Influenza A Virus Entry into Mammalian Cells. Cell Host & Microbe. 2018 Jun; 23(6):809-818. PMID: 29779930
6) Inuzuka T, Fujioka Y, Tsuda M, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Tanaka S, Ohba Y. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. Sci Rep. Nature Publishing Group; 2016 Feb 9;6(1):21613–11. PMCID: PMC4746669
7) Yamada T, Tsuda M, Wagatsuma T, Fujioka Y, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Totsuka Y, Haga H, Tanaka S, Shindoh M, Ohba Y. Receptor activator of NF. Sci Rep. Nature Publishing Group; 2016 Mar 17;:1-16. PMCID: PMC4806381