

133. 発生におけるミトコンドリア膜局在リガーゼの機能解明

長島 駿

東京薬科大学 生命科学部 再生医科学研究室

Key words : ミトコンドリア, ユビキチンリガーゼ, 細胞分化, MITOL/MARCHF5

緒言

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー産生、脂質産生、細胞死の制御などシグナル伝達の間としても機能するオルガネラである。ミトコンドリアは臓器や細胞によって形態が異なり、その役割も異なっている。ミトコンドリア形態はミトコンドリアの機能と密接な関係があり、ミトコンドリア形態制御機構の破綻はミトコンドリア機能だけでなく、細胞分化に影響を与えることが知られている。正常なミトコンドリアの働きが個体発生に重要であることは明らかであるが、その詳細な分子メカニズムは未解明な部分が多い。

MITOL はミトコンドリア外膜に 4 回膜貫通型のユビキチンリガーゼであり、細胞質側に RING ドメインを有するユビキチンリガーゼである。これまでに MITOL はミトコンドリア外膜においてさまざまなタンパク質をユビキチン化し、そのタンパク質の分解促進や活性制御を行うことが報告されている [1]。MITOL はミトコンドリア分裂因子である Drp1 やミトコンドリア外膜の Drp1 受容体である Mid49 をユビキチン化し、分解を促進することによりミトコンドリアのサイズを制御すること、ミトコンドリアに集積する変性タンパク質の分解を促進し、変性タンパク質からミトコンドリアを保護すること、ミトコンドリアと小胞体の接着 (MERCs : mitochondria-ER contacts) を制御する Mitofusin2 (Mfn2) をユビキチン化し、活性化することにより MERCs を増加させること、ミトコンドリアと小胞体の接着部位において、小胞体上の IRE1 α を制御して細胞死を抑制することが報告されている。加えて、我々は神経特異的 MITOL ノックアウトマウス、海馬・大脳皮質特異的 MITOL ノックアウトマウス、心筋特異的 MITOL ノックアウトマウスを解析し、MITOL の欠損がさまざまな障害を引き起こすことを報告してきたが、発生における MITOL の役割は不明な点が多く残っている。MITOL を全身で欠損させたマウスが胎生致死であることから、MITOL が個体の発生や細胞の分化を制御する可能性が示唆されている。本研究では、発生における MITOL の役割の解明を目指し研究を行った。

方法

1. MITOL knockout (KO) 気管支上皮細胞の作製と解析

ヒト気管支上皮細胞由来の 16HBE14o-細胞に Crispr Cas9 システムを用いて MITOL KO 細胞を作製し、2 つの MITOL KO 16HBE14o-細胞 (clone #10, #12) を得た。16HBE14o-細胞をトランスウェルに播種し、タイトジャンクション形成など気管支細胞様の細胞へ分化誘導を行った。経上皮電気抵抗 (Transepithelial Electric Resistance : TER) の測定は Millicell ERS-2 を用いた。細胞から NucleoSpin RNA (TAKARA) を用いて RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を調製し、KAPA SYBR Fast qPCR キット (NIPPON Genetics) を用いて定量的 RT-PCR を行い、mRNA 量を測定し、細胞分化の状態を比較した。

2. ヒト iPS 由来のガストロイドへの分化誘導

ヒト iPS 細胞を GSK3 阻害剤である Chiron で初期化させ、低接着 96 well プレートに 1 well あたり 200~800 細胞播種した。低速度の遠心で細胞をプレート中心に集め、ガストロイド形成培地で 24 時間毎に培地交換を行ない、ガストロイドへの分化誘導を行った。免疫染色法を用いて、ガストロイドへの分化誘導ができていないか確認を行った。また、簡便に細胞の分化状態を観察するために、CRISPR-Cas9 システムと電気穿孔法を用いて *SOX17* (内胚葉マーカー) 遺伝子の下流に蛍光タンパク質を発現する細胞の樹立を行った。

結果および考察

1. *MITOL* の欠損は気管支上皮細胞の分化に異常を引き起こした

ヒト気管支上皮細胞由来の 16HBE14o-細胞は、タイトジャンクションの形成などの正常な気管支細胞への分化能を保持した細胞である。気管支上皮細胞における *MITOL* の役割を検証するために、*MITOL* KO 16HBE14o-細胞を作製した。Western Blot 法を用いて、*MITOL* が欠失していることを確認した (図 1a)。*MITOL* KO16HBE14o-細胞は細胞増殖に優位な違いは認められなかった。*MITOL* の欠損が 16HBE14o-細胞の分化能に与える影響を確認するために、細胞をトランスウェル上に播種し、細胞の分化誘導を行った。16HBE14o-細胞は分化誘導が進むとタイトジャンクションを形成し、管腔側と基底膜側との間でイオンの透過が制限されるため TER が生じる。タイトジャンクションの形成によって生じるバリア機能を TER の測定により評価した結果、野生型の 16HBE14o-細胞と比較して *MITOL* 欠損細胞では TER の減少が認められた (図 1b)。

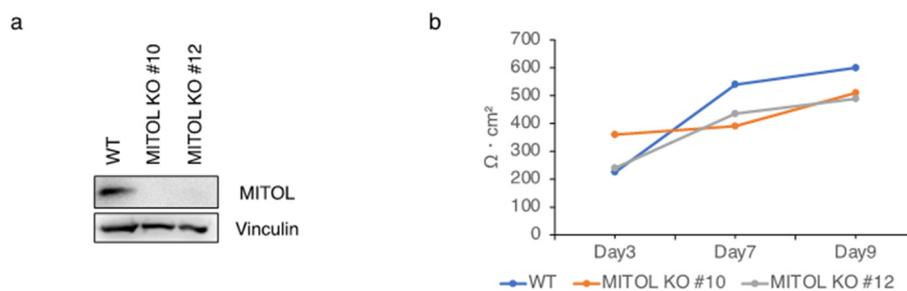


図 1. *MITOL* 欠損は 16HBE14o-細胞の分化異常を示す

- MITOL* タンパク質の欠失。野生型 16HBE14o-細胞 (WT) と *MITOL* 欠損細胞#10 (*MITOL*KO #10) と#12 (*MITOL*KO #12) の細胞抽出液を SDS-PAGE によってタンパク質を分離し、Western Blot 法にて表記のタンパク質を抗体で検出した。
- MITOL* 欠損による TER の低下。16HBE14o-細胞を分化誘導し、分化誘導 3 日後 (Day3)、7 日後 (Day7)、9 日後 (Day9) に TER を測定した。

分化誘導 9 日後に細胞から RNA を抽出し、タイトジャンクションに関わる *CLDN1*、*CLDN4*、*Occludin*、*ZO-1* の減少が認められた (図 2a)。気管支上皮細胞は粘液を分泌し、粘液は気管支に入ってきた異物を補足し、異物の排除を助けている。16HBE14o-細胞は分化に伴い気道粘液の成分である高分子糖タンパク質ムチンの発現量の増加が認められた。*MITOL* 欠損細胞では野生型の 16HBE14o-細胞と比較して *MUC1*、*MUC4*、*MUC16* の mRNA 量の減少が認められた (図 2b)。以上より、*MITOL* の欠損はタイトジャンクションの形成や粘液分泌の低下が認められることから、気管支上皮細胞への分化に異常を引き起こすことが示唆された。

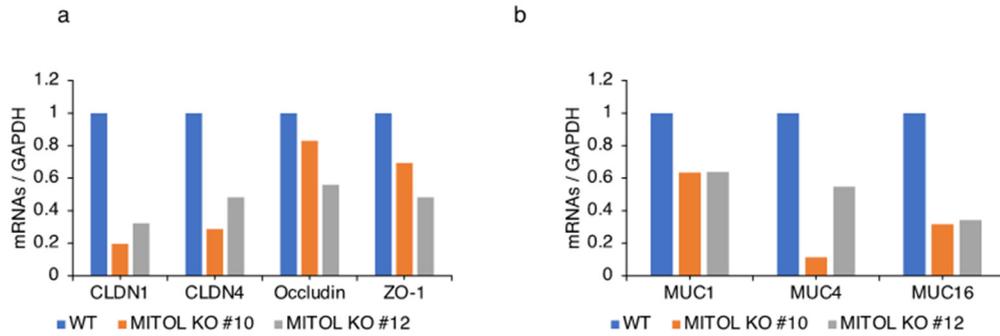


図 2. *MITOL* 欠損はタイトジャンクション形成因子の減少を引き起こす

- a) *MITOL* 欠損によるタイトジャンクション関連因子の減少。分化誘導 9 日後に 16HBE14o-細胞から RNA を抽出し、定量 PCR で mRNA を測定した。
- b) *MITOL* 欠損による粘液関連因子の減少。分化誘導 9 日後に 16HBE14o-細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR で mRNA を測定した。

2. *MITOL* 欠損気管支上皮細胞の分裂状態のミトコンドリアの増加が認められた

MITOL はミトコンドリアの形態を制御することが報告されているが、細胞種によって *MITOL* 欠損時のミトコンドリアの形態変化に差異が認められる。これまでに気管支上皮細胞における *MITOL* 欠損時のミトコンドリアの形態変化に関する研究報告はされていない。*MITOL* を欠損した 16HBE14o-細胞のミトコンドリアの形態を観察すると、野生型の 16HBE14o-細胞と比較して小さな分裂状態のミトコンドリアを持つ細胞の増加が認められた (図 3a)。野生型の 16HBE14o-細胞では分裂状態のミトコンドリアを示す細胞が 10%程度であることに対し、*MITOL* 欠損細胞では 70%以上の細胞が分裂状態のミトコンドリアを示すことが明らかとなった (図 3b)。*MITOL* はこれまでにミトコンドリア分裂因子である Drp1 などをユビキチン化し、分解を促進することが報告されている。*MITOL* 欠損によりミトコンドリア分裂因子が蓄積し、分裂状態のミトコンドリアの増加が引き起こされたか確認するために、Western Blot 法を用いて、ミトコンドリア分裂因子や融合因子のタンパク質の量を比較した。ミトコンドリア分裂因子である Drp1 や融合因子である Mfn1、Mfn2 の発現量に大きな違いは認められなかった。次に Drp1 のミトコンドリア外膜上の受容体である Mid49、Mid51、Mff の発現量を比較した結果、Mid49 のみ顕著な増加が認められた (図 3c)。以上より、*MITOL* の欠損は Mid49 の蓄積を引き起こし、Drp1 をミトコンドリアにリクルートすることによりミトコンドリアを分裂させることが示唆された。現時点では、*MITOL* 欠損により引き起こされるミトコンドリア分裂と気管支上皮細胞の分化異常との関連があるかの検証まで至らなかった。今後の研究で Mid49 蓄積によるミトコンドリアの分裂と気管支上皮細胞の分化の関連を解明したい。

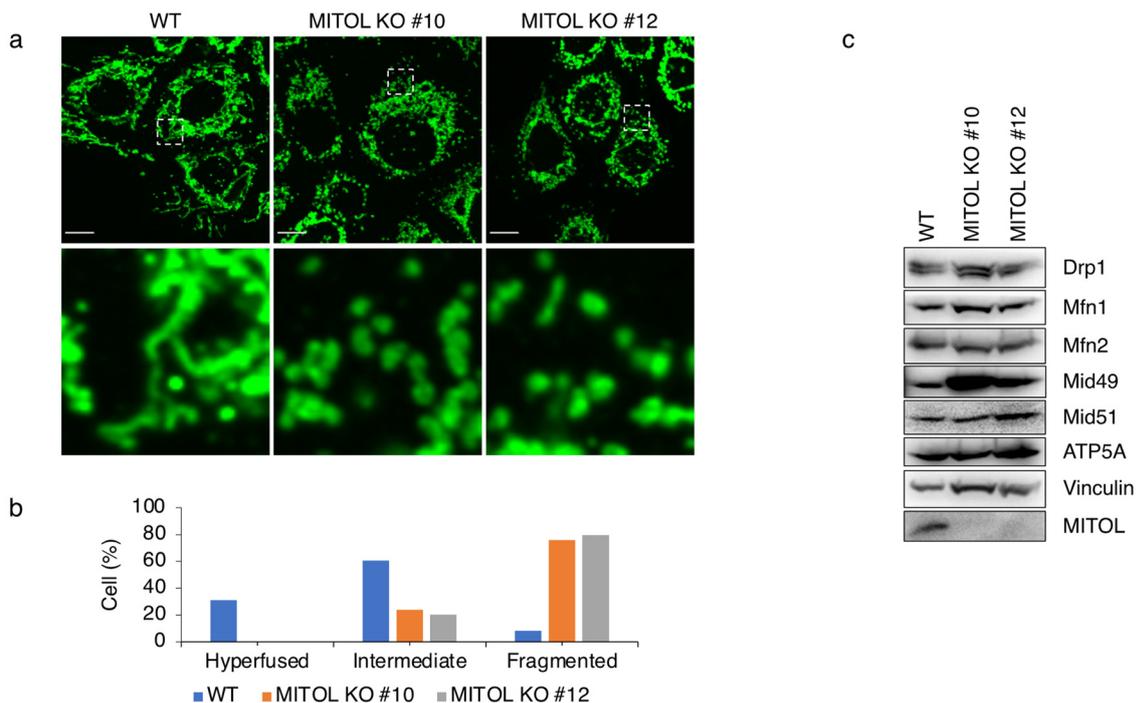


図 3. *MITOL* 欠損はミトコンドリア分裂を亢進する

- 16HBE14o-細胞を固定した後、anti-Tom20 抗体を用いて免疫染色を行い、ミトコンドリアの形態を観察した。スケールバー：10 μ m。
- ミトコンドリア形態を解析し、細胞の割合をグラフで示した。
- 野生型 16HBE14o-細胞 (WT) と *MITOL* 欠損細胞#10 (*MITOL* KO #10) と #12 (*MITOL* KO #12) の細胞抽出液を SDS-PAGE によってタンパク質を分離し、Western Blot 法にて表記のタンパク質を抗体で検出した。

3. ヒト iPS 細胞からのガストロイドへの実験系の構築

気管支上皮細胞において *MITOL* 欠失による細胞分化の異常が示唆された。*MITOL* はユビキタスに発現するにも関わらず、*MITOL* 欠損は神経細胞や褐色脂肪細胞の分化には大きな影響を与えないとの結果が得られており、*MITOL* が特定の細胞の分化を選択的に制御する可能性が想定される。また、マウス胎仔線維芽細胞を iPS 細胞にリプログラミングすると *MITOL* の発現量は増加することや、*MITOL* は胚性幹細胞の多能性の維持を担う因子として報告されていることから [2]、*MITOL* が初期発生に関与することが推察される。初期発生における *MITOL* の役割を解明するために、近年報告されたヒト iPS 細胞からヒト人工疑似胚であるガストロイドを分化する実験系の構築を行った [3]。ガストロイドへ分化誘導させるヒト iPS 細胞株の選定、chiron 濃度の条件検討の結果、70%程度の割合でガストロイドへの分化誘導が可能な実験系の構築に成功した。細胞分化の変化を観察するために内胚葉マーカーである *SOX17* 遺伝子の下流に蛍光タンパク質を発現する細胞を樹立した。今後、構築したガストロイドの分化誘導系を用いて、*MITOL* が初期発生を制御する分子メカニズムを明らかにすることが今後の課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京薬科大学生命科学部再生医科学研究室の山口智之、志村宥哉、遠藤久美香、鈴木翔磨、近澤桃菜、東京薬科大学薬学部薬物動態制御学教室の岸本久直である。ご協力に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Nagashima S, Ito N, Shiiba I, Shimura H, Yanagi S. Ubiquitin-mediated mitochondrial regulation by MITOL/MARCHF5 at a glance. *J Biochem.* 2022 Dec 27;173(1):1-11. PMID: 36346121 DOI: 10.1093/jb/mvac092.
- 2) Gu H, Li Q, Huang S, Lu W, Cheng F, Gao P, Wang C, Miao L, Mei Y, Wu M. Mitochondrial E3 ligase March5 maintains stemness of mouse ES cells via suppression of ERK signalling. *Nat Commun.* 2015 Jun 2;6:7112. PMID: 26033541 DOI: 10.1038/ncomms8112.
- 3) Moris N, Anlas K, van den Brink SC, Alemany A, Schröder J, Ghimire S, Balayo T, van Oudenaarden A, Martinez Arias A. An in vitro model of early anteroposterior organization during human development. *Nature.* 2020 Jun;582(7812):410-415. PMID: 32528178 DOI: 10.1038/s41586-020-2383-9. Epub 2020 Jun 11.