



Title	Study on regulatory mechanisms of mitochondrial morphology focusing on mitochondrial nucleoid and Ca2+ in intermembrane space
Author(s)	觀音, 裕考
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101927
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

様式3

論文内容の要旨

氏名（観音裕考）	
論文題名	Study on regulatory mechanisms of mitochondrial morphology focusing on mitochondrial nucleoid and Ca ²⁺ in intermembrane space (ミトコンドリア核様体と膜間腔のカルシウムイオンに着目したミトコンドリア形態制御機構の研究)
論文内容の要旨	
<p>ミトコンドリアはエネルギーを産生する重要な細胞小器官であり、その二重膜は融合と分裂を繰り返している。細胞内共生を起源としており、内部に独自のDNAであるミトコンドリアDNA (mtDNA) を有している。数コピーのmtDNAはTFAMをはじめとしたDNA結合タンパクと結合し、核様体を形成しており、哺乳動物細胞において小さい輝点状の構造として観察される。近年、我々のグループではミトコンドリア膜と核様体が協調的に制御されていることを見出しが、制御因子が十分に明らかになっていないことや解析手法の不足から、核様体の分子基盤や生理的意義については明らかになっていない。</p> <p>まず、TFAMのDNA結合ドメインと光変換型蛍光タンパク質KikGRを用いた新規核様体観察プローブを構築し、このプローブは従来のSYBR Green Iを用いた染色に比べより長時間核様体を標識することができた。加えて、KikGRの光変換できる性質を用いた単一の核様体の動態を観察することができた。</p> <p>次に、核様体形態を制御する因子を同定するために、ミトコンドリアに関連する1,164遺伝子に対するsiRNAスクリーニングを行った結果、ミトコンドリアのカルシウムイオン (Ca²⁺) チャネルであるMCUを核様体形態に関連する新規遺伝子として同定した。RNAiによるMCUの発現抑制では、大きく凝集した核様体が観察されるだけでなく、ミトコンドリア呼吸機能の低下と、ミトコンドリア膜の伸長が観察された。詳細解析のために、ゲノム編集によりMCU KO HeLa細胞を樹立し、この細胞でも同様の核様体やミトコンドリアの形態変化が見られた。MCU KO細胞ではミトコンドリアの膜融合が亢進しており、また、融合因子の発現抑制によるミトコンドリア膜の断片化に伴い核様体が分散した。このことは、MCUを介したCa²⁺の取り込みがミトコンドリア膜形態の制御を介して核様体形態を変化させていることを示唆している。</p> <p>MCU KO細胞では定常状態における膜間腔のCa²⁺濃度が上昇していた。加えて、試験管内反応において内膜融合因子OPA1の融合活性がCa²⁺によって亢進した。これらのことから、MCU KO細胞では、膜間腔のCa²⁺がOPA1を介したミトコンドリア膜融合を亢進させ、ミトコンドリアの伸長と核様体の凝集を引き起こしていることが示唆された。加えて、このミトコンドリア融合の生理学的意義を明らかにするために、ストレス誘導性ミトコンドリア過融合 (SIMH) に着目した。これは翻訳抑制などの細胞ストレスによりミトコンドリアが過剰に融合する現象である。SIMHを誘導することで膜間腔のCa²⁺濃度は上昇し、また、MCUの過剰発現によりSIMHが抑制された。このことから、MCUは膜間腔のCa²⁺を介してSIMHを制御することを示唆している。以上の結果から、本研究では細胞ストレス条件下におけるMCUを介した新規のミトコンドリア膜形態機構や核様体形態変化機構を見出すことができた。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名（観音 裕考）		
論文審査担当者	(職)	氏名
	主査 教授	石原 直忠
	副査 教授	小布施 力史
	副査 准教授	中川 拓郎

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアは酸化呼吸によるエネルギー生産に重要な役割を果たす細胞小器官であり、培養哺乳類細胞を蛍光顕微鏡で観察するとミトコンドリアの二重膜は頻繁に融合と分裂を繰り返している。このような動的なミトコンドリア形態変化はその機能制御や品質管理、さらに細胞応答・分化や老化等の様々な生命現象や病態にも関与している。また、ミトコンドリアは細胞内の主要なカルシウムイオン (Ca^{2+}) 貯蔵庫としての機能も持っている。 Ca^{2+} は細胞シグナリングのみならず、呼吸活性や細胞死等のミトコンドリアに関連する機能・反応の制御にも関与することが知られている。MCUはミトコンドリア内膜に存在するカルシウムユニポーター複合体の孔形成に関わる必須サブユニットであり、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みに機能する主要な因子であることが知られているが、その制御や細胞内での生理機能に関してはまだ多くは不明である。学位申請者は今回、ミトコンドリアの構造の制御機構とその意義の研究を行うことを目指して、新規関連遺伝子の検索を行い、その結果として得られた遺伝子の解析を行うことで、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みによる新しい細胞機能制御を見出した。

本研究ではまず、哺乳類培養細胞のミトコンドリア形態に影響を与える因子の同定を目指した siRNA スクリーニングを行った。このスクリーニングにおいては、ミトコンドリア DNA を含む核様体構造の生細胞観察を活用することで効率的に遺伝子同定を進め、その結果として MCU を見出した。MCU の詳細解析を行うため MCU 欠損細胞を構築し解析したところ、ミトコンドリアの伸長が誘導されること、また更なる生細胞イメージングによりミトコンドリアの融合が促進されることを明らかにした。

次に、ミトコンドリアの様々な区画における Ca^{2+} 濃度を検出するプローブを用いて計測を行ったところ、ミトコンドリアの外膜と内膜の間（膜間腔）を標的とした Ca^{2+} センサーを用いた解析から、MCU 欠損細胞では膜間腔の Ca^{2+} レベルが上昇することが示された。ミトコンドリア内膜の融合に機能する OPA1 タンパク質はその機能に重要な GTPase ドメインを膜間腔に露出していることから、試験管内でのミトコンドリア融合反応の再構成実験を用いて解析したところ、OPA1 による膜融合活性が Ca^{2+} レベルの上昇により増強されることを見出した。これらの結果から、MCU による膜間腔の Ca^{2+} レベルの制御がミトコンドリア融合を活性化する可能性が示唆された。

さらに、生細胞観察実験を行い、細胞ストレス条件下におけるミトコンドリア融合促進環境において膜間腔の Ca^{2+} レベルの上昇が起こること、またその応答は MCU の外来性発現によって抑制されることを見いたした。これらの結果から、MCU による膜間腔の Ca^{2+} レベルの調節がミトコンドリア膜融合を介したストレス応答系に関与している可能性が示された。

これらの研究成果は、ミトコンドリアの関わる細胞生物学・生命科学の研究において新しい見解をもたらすものであり、さらに今後の本研究分野の発展に大きな寄与することも期待されるものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。