

## 異なる細胞小器官が協同する新しい機構を解明

～オルガネラ病原因解明への貢献に期待～

### ポイント

- ・細胞内の小器官である「ミトコンドリア」と「エンドソーム」とが相互作用することを発見。
- ・この相互作用によりエンドソームが酸性に傾き、成熟することを解明。
- ・オルガネラ病の病態解明や治療法開発に期待。

### 概要

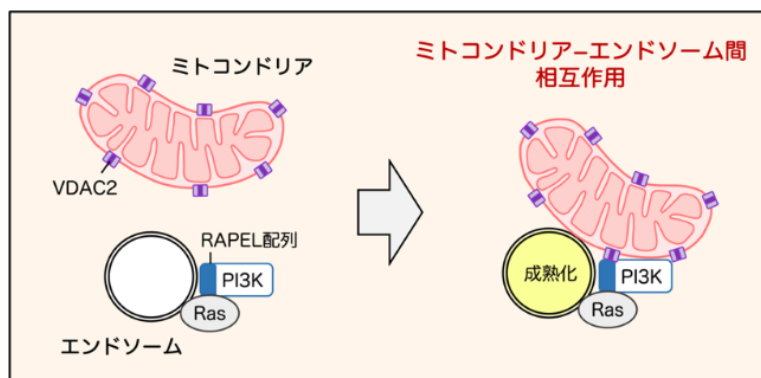
北海道大学大学院医学研究院細胞生理学教室の大場雄介教授、藤岡容一朗講師、佐藤 絢学術研究員らの研究グループは、細胞内の小器官（オルガネラ<sup>\*1</sup>）であるミトコンドリア<sup>\*2</sup>とエンドソーム<sup>\*3</sup>とが相互作用することを発見しました。そして、その相互作用を PI3K<sup>\*4</sup>と VDAC2<sup>\*5</sup>という 2 つの分子が担うこと、さらにこの相互作用により「エンドソームの成熟化」と呼ばれる現象が促進されることも見出しました。

研究グループではこれまでに、「Ras-PI3K シグナル」と呼ばれる細胞内の情報伝達経路が、細胞が外から物質を取り込む現象の一つ「エンドサイトーシス」<sup>\*6</sup>の制御に関与することと、その制御には PI3K 分子に存在する RAPEL 配列<sup>\*7</sup>が必要であることを報告しています。研究グループはこのメカニズムを明らかにするため、RAPEL 配列にどのような因子が結合するか調べたところ、予想外にも、別のオルガネラであるミトコンドリアに存在するタンパク質「VDAC2」が同定されました。

さらに、エンドソームにある PI3K とミトコンドリアの VDAC2 が RAPEL 配列を介して結合することで、Ras-PI3K 複合体をもつエンドソームがミトコンドリアに繋ぎ留められ、Ras-PI3K 複合体はエンドソームに局在できることを、バイオイメージング<sup>\*8</sup>を用いて明らかにしました。また、このミトコンドリア-エンドソーム間の相互作用により、エンドソームの成熟化が促進されることを示し、これには VDAC2 が必須であることも解明しました。

ミトコンドリアやエンドソームの機能障害が関連する疾患は、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、未だ原因不明の疾患も少なくありません。本研究成果により、これらの疾患の解明や治療困難な疾患に対する新たな知見を提供することが期待されます。

なお本研究成果は、2023 年 3 月 11 日（土）に Cell Reports 誌にオンライン掲載されました。



ミトコンドリアとエンドソームの協同。ミトコンドリア-エンドソーム間の相互作用により、エンドソームの成熟化が促進される。

## 【背景】

真核生物の細胞内には細胞小器官（オルガネラ）と呼ばれる、各々が特異的な機能を担う、特殊に分化した構造体が存在します。オルガネラのうち、エンドソームは、エンドサイトーシスによって細胞膜が細胞の内部に取り込まれてできる小胞（小さな袋状の構造体）です。受容体などの細胞膜タンパク質の細胞内への取り込みのほか、様々な外来栄養素や病原体の摂取を媒介します。物質を取り込んで間もない「初期エンドソーム」から始まり、時間経過を経た「後期エンドソーム」、さらに成熟が進んだ小胞であるリソソームへと至る分解経路では、内包物質を分解するために小胞内部の pH が徐々に低下します。ミトコンドリアは、ATP 合成や脂質代謝、カルシウムイオンの貯蔵庫として機能します。これらのオルガネラは、それぞれが真核生物の細胞にとって必須の機能を担っています。

近年の研究により、オルガネラはこれらの個別の機能に加えて、協同して新たな細胞機能を担うことが分かってきています。小胞体<sup>9</sup>–ミトコンドリア、小胞体–エンドソーム、ミトコンドリア–エンドソームなどのオルガネラ間の相互作用が、生物学的に重要であることが認識されつつあります。しかし、異なるオルガネラ間の相互作用の機能や分子メカニズムの多くはまだ謎に包まれています。

研究グループは、これまでの研究において、Ras と PI3K というタンパク質の複合体が、増殖因子依存的に細胞膜からエンドソームに移行し、エンドサイトーシスを促進することを報告しています。また、Ras-PI3K 複合体がエンドソームに局在し、エンドサイトーシスを制御するために必須な PI3K の配列（Ras-PI3K endosomal localization, RAPEL 配列）を同定しています。しかし、Ras-PI3K 複合体は RAPEL 配列を介してどのようなメカニズムでエンドソームに局在し、その制御に関与するのかは、未解明の課題でした。

## 【研究手法】

蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより、Ras-PI3K 複合体、ミトコンドリア、エンドソームなどの挙動を詳細に観察し、得られた顕微鏡画像を定量的に解析することで上記のメカニズムを明らかにしました。ミトコンドリア–エンドソーム間の相互作用とエンドソームの pH 低下を同時にリアルタイムで観察するのは難題でしたが、近年のカメラの高感度化や超解像顕微鏡<sup>10</sup> 技術により鮮明に捉えることができました。また、光遺伝学<sup>11</sup> という技術を用いて、人為的にミトコンドリアとエンドソームを相互作用させることにも成功しました。

## 【研究成果】

まず、PI3K の RAPEL 配列結合因子として、ミトコンドリアタンパク質の VDAC2 を同定しました。増殖因子刺激後に PI3K の RAPEL 配列を介して Ras-PI3K 複合体が VDAC2 と結合することで、Ras-PI3K 複合体があるエンドソームがミトコンドリアに繫留され、Ras-PI3K 複合体はエンドソームに長時間滞在できることが明らかになりました。また、この時に形成されるミトコンドリア–エンドソーム間相互作用により、エンドソーム内の pH が低下することを見出しました（図 1）。

さらに、光によりミトコンドリアとエンドソームの相互作用を誘導することで、両者の相互作用がエンドソームの pH 低下を促進すること（図 2 左）、この現象には VDAC2 が必須であることも示しました（図 2 右）。

## 【今後への期待】

本研究で Ras-PI3K 複合体がエンドソームに局在するメカニズムの一端を明らかにすることができました。「ミトコンドリア–エンドソーム間相互作用によるエンドソーム pH 低下のメカニズム」につ

いては、VDAC2 のどのような機能がそれを担うのかという疑問が残っています。しかしこの疑問も、日進月歩の蛍光イメージング技術革新により、近い将来解明されるものと期待できます。

正常な細胞機能に重要なオルガネラは、その破綻により多くの疾患の原因にもなり得ます。ミトコンドリアやエンドソームの機能障害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、未だ発症機序が不明な疾患も多く含まれます。本研究はミトコンドリアとエンドソームの相互作用により発揮される新たな機能を明らかにしたので、異種オルガネラ間相互作用という新しい視点から、疾患の原因解明や新たな治療法の開発に繋がることが期待できます。

## 【謝辞】

Venus と SECFP の cDNA を提供してくださった国立研究開発法人理化学研究所の宮脇 敦博士、p110 $\gamma$  の cDNA を提供してくださった英国 Babraham Institute の Len Stephen 博士、GFP に対するウサギ抗血清を提供してくださった京都大学の松田道行博士、pEGFP-C1-Rab5 を提供してくださった東京大学の坪井貴司博士、mitoATeam1.03 の発現ベクターを提供してくださった東京大学の野地博行博士、京都大学の今村博臣博士、pGBKT7 及び pGADT7 を提供くださった北海道大学の宮崎忠昭博士、pCold-GFP<sub>1-10</sub> 及び pCold-Smac-GFP<sub>11</sub> を提供くださった東京大学の小澤岳昌博士、並びに pCXpuro-CRY2-cRaf を提供くださった基礎生物学研究所青木一洋博士に感謝申し上げます。また、当研究室の学術研究員として長く勤められた菊池歩美氏の継続的なサポートに感謝します。

また、本研究の一部は、以下の競争的資金の支援を得て実施されました。

文部科学省科学研究費助成事業（科学研究費補助金）

- 新学術領域研究（研究領域提案型）細胞機能を司るオルガネラ・ゾーンの解読（公募研究）  
「エンドゾームとミトコンドリアの連携ゾーンの解析」（18H04850；研究代表者：大場雄介）
- 同「エンドソームとミトコンドリアの連携ゾーンによる細胞生理機能制御機構の解明」（20H04895；研究代表者：大場雄介）
- 新学術領域研究（研究領域提案型）ネオウイルス学：生命源流から超個体、そしてエコ・スフィアへ（公募研究）「ウイルス感染超初期過程におけるウイルス-宿主共生機構の解析」（19H04823；研究代表者：藤岡容一郎）
- 学術変革領域研究(A)マテリアルシンバイオシスための生命物理化学（計画研究）  
「弱い相互作用のインターフェースの可視化と生体応答の同時イメージング」（20H05872；研究代表者：大場雄介）

日本学術振興会科学研究費助成事業（科学研究費補助金）

- 若手研究(A)インフルエンザウイルス受容体タンパク質の同定とその標的化合物の探索（16H06227；研究代表者：藤岡容一郎）
- 基盤研究(B)エンドソームとミトコンドリアの物理的相互作用と機能連関による細胞機能の調節機構（17H04016；研究代表者：大場雄介）

日本学術振興会科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）

- 若手研究「ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用によるエンドソーム成熟化メカニズムの解明」（20K16115；研究代表者：佐藤 絢）
- 挑戦的萌芽研究「バイオイメージングによるエンドソーム-ミトコンドリア相互作用の生理的意義の解明」（15K15023；研究代表者：大場雄介）

## 論文情報

論文名	Interaction Between PI3K and the VDAC2 Channel Tethers Ras-PI3K-positive Endosomes to Mitochondria and Promotes Endosome Maturation (PI3K と VDAC2 チャンネルの相互作用により、Ras-PI3K 陽性エンドソームをミトコンドリアにつなぎとめ、エンドソームの成熟を促進する)
著者名	佐藤 絢 <sup>1,3</sup> 、藤岡容一朗 <sup>1,2,3</sup> 、柏木彩花 <sup>1,2,3</sup> 、吉田藍子 <sup>1,2,3</sup> 、藤岡真理 <sup>1,3</sup> 、笹島 仁 <sup>1 (当時)</sup> 、南保明日香 <sup>1 (当時)</sup> 、天野麻穂 <sup>1,2,3</sup> 、大場雄介 <sup>1,2,3</sup> (1 北海道大学大学院医学研究院、2 北海道大学国際連携研究教育局・バイオサーフィス創薬グローバルステーション、3AMED-CREST)
雑誌名	Cell Reports (細胞生物学の専門誌)
DOI	10.1016/j.celrep.2023.112229
公表日	2023 年 3 月 11 日 (土) (オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院医学研究院 教授 大場雄介 (おおばゆうすけ)

T E L 011-706-5158 F A X 011-706-7877 メール yohba@med.hokudai.ac.jp

U R L <https://cp.med.hokudai.ac.jp>

## 配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

## 【参考図】

緑:エンドソーム 紫:ミトコンドリア

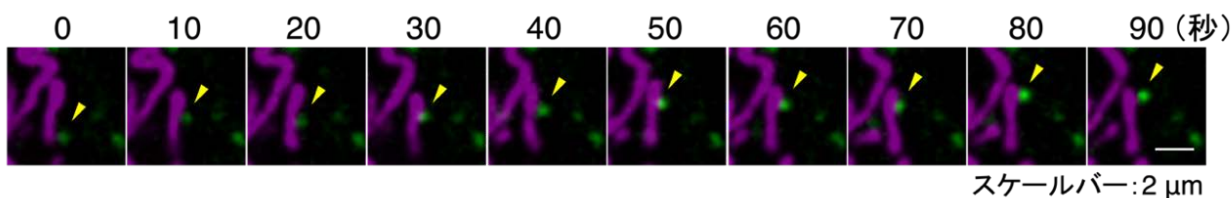


図 1. ミトコンドリア-エンドソーム間相互作用後にエンドソームの pH が低下する様子。ミトコンドリアとエンドソームを蛍光色素で可視化し、10 秒毎に蛍光顕微鏡で撮影した。エンドソームは pH の低下に伴い蛍光強度が増加する色素で染色した。図中の矢頭は、ミトコンドリア (紫) と相互作用後にエンドソーム (緑) の色素が次第に明るくなり、pH が低下して酸性化する様子を示している。

緑:エンドソーム 紫:ミトコンドリア

拡大図

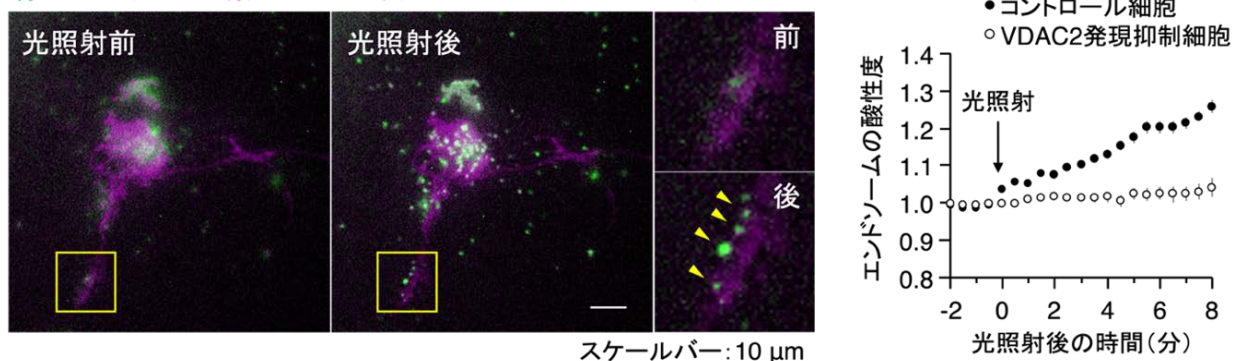


図 2. 光によるミトコンドリア-エンドソーム間相互作用の誘導とエンドソームの pH の測定。光遺伝学の技術を用いて光でミトコンドリア (紫) とエンドソーム (緑) の相互作用を誘導し、照射前後のエンドソームの pH を測定した。照射後にエンドソームの蛍光強度が増加、すなわち pH が低下して酸性化する様子を捉えた (拡大図中の矢頭)。VDAC2 発現抑制細胞では照射後の酸性化が認められなくなった (左のグラフ)。

### 【用語解説】

- \* 1 オルガネラ … 細胞内で特異的機能を持つ構造体の総称。
- \* 2 ミトコンドリア … 細胞内でエネルギー合成などを担うオルガネラ。
- \* 3 エンドソーム … 袋状の構造をしたオルガネラ。細胞内で様々な物質を輸送する。
- \* 4 PI3K … 細胞がシグナル伝達を介して機能を発揮するために必要な、脂質の代謝酵素の 1 つ。細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たす Ras と結合する。
- \* 5 VDAC2 … ミトコンドリアタンパク質。物質を透過する穴のような役割をもつ。
- \* 6 エンドサイトーシス … 細胞が外部からの栄養物などを取り込み、エンドソームを使って物質を輸送する機構。
- \* 7 RAPEL 配列 … PI3K が持つ Ras-PI3K 複合体がエンドソームに局在するために必須なアミノ酸配列。
- \* 8 バイオイメージング … 細胞内の物質や現象を可視化し画像化する技術。
- \* 9 小胞体 … 細胞内でタンパク質合成などを担うオルガネラ。
- \* 10 超解像顕微鏡 … 回折限界を超えた分解能を発揮できる顕微鏡。
- \* 11 光遺伝学 … 光で変化するタンパク質を用いて生体内の物質などを光で操作する技術。