

平成 31 年 6 月 23 日

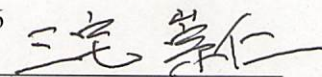
海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 H30 年度

受付番号 201860056

氏 名



(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: サンフランシスコ(国名: 米国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

パッチクランプを基盤としたミトコンドリア温度感受性イオンチャネルの機能解明

3. 派遣期間: 平成 30 年 5 月 1 日 ~ 平成 30 年 11 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

University of California, San Francisco, Department of Physiology

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究・調査実施状況】

申請者は、ミトコンドリアパッチクランプ法を世界で初めて開発した本人である University of California, San Francisco の Yuriy Kirichok 教授率いる研究室へ留学した。ミトコンドリアパッチクランプ法とは、通常の細胞を用いたパッチクランプ法と基本的な装置等に差はないが、ミトコンドリアの外膜を破壊し、内膜を露出させ、そこに電極を当て、内膜を破ることによって、ホールセルパッチクランプ状態によく似たホールミトプラストパッチクランプ状態を形成することができる(右写真)。この方法は、電気生理学のすべての特長、すなわち、高い時間分解能と高い検出感度をミトコンドリア内膜に適応することができるため、従来の間接的にミトコンドリアの機能を評価する方法では見えないような変化を捉えることができる。

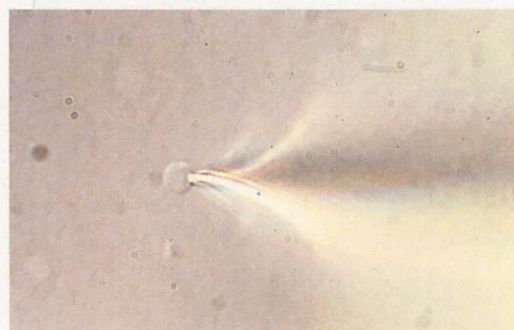


写真: ホールミトプラストパッチクランプ測定中の顕微鏡視野写真。右端から入り込んでいる影がガラス電極、その先端にある円形の半透明のものがミトプラスト(ミトコンドリア内膜)である。なお、ミトプラスト上端に白く見えるものはミトコンドリア外膜である。

そこで申請者はこの技術を習得し、ミトコンドリアに発現する分子同定されていない膜電流の分子実体の解明について、以下の2つの課題に特に着目して行ってきた。なお、両研究課題とも現在までに学会や論文等で公表しておらず、申請者が留学を終えた後も Kirichok 研究室で研究が一部進んでいる、あるいは、論文投稿準備中であるため、多くの部分を明らかにすることができない。

1. ミトコンドリア内膜における温度感受性電流の機能解析

[背景]

ミトコンドリアはATPを合成し、細胞にエネルギーを供給する非常に重要なオルガネラとして現在まで広く認識されている。その一方で、ATP合成とは直接関連の無い、熱産生や細胞内カルシウム濃度感受・制御機構、および活性酸素種の産生をはじめとしたミトコンドリアの役割についても、近年注目が集まっている。例えば、ミトコンドリア電子伝達系の不調によって発生するとされる活性酸素種は、生理学的・病理学的両方の場面においてシグナル分子として働くことが示されている。申請者も留学以前に、ミトコンドリアより発生する活性酸素種が脳内免疫担当細胞ミクログリアの遊走能を制御することや (Miyake *et al.*, *Glia*, 2015)、冷たい刺激によってミトコンドリアが活性酸素種を産生し、それが抗ガン剤投与によって特異的に惹起される冷刺激過敏障害に結びつくことを示してきた (Miyake, *et al.*, *Nature Communications*, 2016)。このうち後者において、冷刺激がミトコンドリアからの活性酸素種の産生を誘発する点は、申請者を含め複数の研究者が報告しているにもかかわらず、その具体的メカニズムはわかっていなかった。そこで申請者は、ミトコンドリアは膜電位が健常時よりも深くなると活性酸素種を出すという知見に従って、ミトコンドリアに温度によって活性化するイオンチャネルが存在し、それが温度低下に伴って活動変化を起こすことで、膜電位が深くなり、活性酸素種を出すのではないかと仮説を立て、そのメカニズムの解明に取り組んだ。

[結果]

ミトコンドリアをマウスより単離し、フレンチプレスを用いた加圧によってミトプラストを作成し、電気生理学的な測定に用いた。測定には、測定環境において30–40 MΩとなるように作成したガラス電極を用いた。ホールミトプラストパッチクランプを行うために、まずミトプラストを、塩化カリウムをベースとした還流液中に浮遊させ、その内膜に対して電極を近づけ、吸気によって電極先端とミトプラスト内膜を密接させることでギガオームシールを形成し、電圧パルス(400–500 mV・10 ms)を与えることで膜を破壊し、ホールミトプラスト状態を形成した。その後、当時目的としたイオンのみを主なイオン組成として含む溶液に灌流液を置換し、インラインヒーターによって実験環境の温度を上げ、その際に起きる電流の変化を観察した。

すると、温度刺激によって外向き電流および内向き電流が増加することがわかった。その分子を同定するためにいくつかの薬理学的実験を行った結果、外向き電流と内向き電流では異なる薬理学的な性質を持つことがわかった。さらに、ある遺伝子欠損マウスより単離したミトコンドリアより同様にミトプラストを調整し、電流を測定すると、野生型マウス由来のミトコンドリアとは異なる薬理学的性質を示すことがわかった。

[考察]

観察した温度感受性電流は、外向きと内向きで異なる薬理学的な性質を示したことから、この2つの電流は異なるタンパクより生まれる電流である可能性が高い。また、ある遺伝子欠損マウスを用いることでその薬理学的な性質が変わることより、その遺伝子がコードするタンパクがこの温度感受性電流に大きく関与することが予想される。興味深いことに、このタンパクはミトコンドリア膜電位の制御に大きく関与することを、Kirichok 研究室の研究者が既に明らかにしているため(未発表)、そのタンパクの生理学的な役割あるいは制御因子のひとつとして、この温度感受性が挙げられると考えられる。

2. 新規ミトコンドリアイオンチャネルの分子同定

【背景】

これまでミトコンドリアには数多くのイオンチャネルが存在すると示されてきた。例えば、カルシウム選択性の非常に高い mitochondrial calcium uniporter (MCU)や、ミトコンドリア内向き整流カリウムチャネル (mitoKir) が挙げられる。しかし、ミトコンドリア内膜に発現するイオンチャネルの機能解析手法として最もふさわしいホールミトプラストパッチクランプは、その技術の難しさのため、あまり普及しておらず、その結果、ミトコンドリア内膜に存在するイオンチャネルの直接的な機能解析はあまり進んでいない。そこで申請者はホールミトプラストパッチクランプ法を確立した Yuriy Kirichok 研究室の熟練した経験を活かし

(Kirichok *et al.*, *Nature*, 2004; Fedorenko *et al.*, *Cell*, 2012; Fieni *et al.*, *Nature Communications*, 2012; Bertholet *et al.*, *Cell Metabolism*, 2017)、未だに同定されていない電流の分子実体の同定に取り組んだ。

【結果】

マウスの臓器 A および臓器 B よりミトコンドリアを単離し、それぞれよりフレンチプレスを用いた加圧によってミトプラストを作成し、電気生理学的な測定に用いた。測定には、測定環境において 35–45 MΩ となるように作成したガラス電極を用いた。ホールミトプラストパッチクランプを行うために、まずミトプラストを、塩化カリウムをベースとした還流液中に浮遊させ、その内膜に対して電極を近づけ、吸気によって電極先端とミトプラスト内膜を密接させることでギガオームシールを形成し、電圧パルス (450–550 mV · 10 ms) を与えることで膜を破壊し、ホールミトプラスト状態を形成した。その後、当時目的としたイオンのみを主なイオン組成として含む溶液に灌流液を置換し、電流を観察した。

はじめに、臓器 A のミトコンドリアと臓器 B 由来のミトコンドリアとを用いて、該当イオン電流の大きさを比較すると、臓器 A の方がより大きな電流を呈することがわかったため、その後の実験にはすべて臓器 A 由来のミトコンドリアを用いた。その後、既存のイオンチャネル阻害薬や、その阻害薬と化学構造の類似した化合物の、該当イオン電流に対する影響を調べると、ある薬物がミトコンドリア内膜にある他の電流へ影響を見せずに、特異的に該当イオン電流を抑制することがわかった。これを用いて、薬物感受性電流に関する逆転電位を調べたところ、確かにこの電流は該当イオンによって大部分が形成されていることがわかった。さらにこの阻害薬を用いて、当時目的としたイオンと同じ電気的価数を有し、原子半径の異なるイオンがもたらす電流についても調べると、ほぼ全てが同じような薬理学的な性質を呈した。また、日本の某研究室の合成した化合物 (非売品) が該当イオン電流を抑制することを見出したため、その研究室と共同研究を行い、日本の研究室が合成した化合物を用いてタンパクをバイオチン化・精製することに成功し、液体クロマトグラフィー-質量分析法を用いた解析を行ったところ、その分子実体はあるタンパクである可能性が高いことがわかった。

【考察】

該当イオン電流の薬理学的な性質は、従来報告されているいかなるミトコンドリアイオンチャネルに関する薬理学とも一致しなかった。また、その電気生理学的特性 (整流性・イオン選択性・電位依存性) についても、既報のいかなる電流とも一致しなかった。つまり、研究対象とした未知ミトコンドリアイオンチャネルは、従来報告されている分子とは異なる可能性が高い。従来までの報告のほとんどは、ミトコンドリアの膜間電位や細胞の呼吸等を指標とした、ミトコンドリアイオンチャネルの間接的な評価しか行ってこなかった。そのため、今回の申請者の得た結果とは異なる知見が得られてきた可能性もあるが、さらなる検討が必要である。また興味深いことに、薬理学的実験で用いた薬物のうち数種類は、既にミトコンドリアの活性に対して作用があることが報告されている。そのため、今回のイオンチャネルがミトコンドリアの活性 (電子伝達系や脱共益等) を制御するために重要である可能性がある。また、臓器 A と臓器 B を比較した際に臓器 A の方がより大きな電流を見せたことから、このイオンチャネ

ルの遺伝子変異は、臓器 A の機能不全をより顕著にもたらす可能性がある。さらに、日本の某研究室に合成いただいた化合物を用いた液体クロマトグラフィー-質量分析法による解析では、ミトコンドリア内膜に存在する興味深いタンパクを検出した。しかし、そのタンパクに対する既存の阻害薬では、この該当イオン電流を抑制することはできなかった。この結果は、ひとつのタンパクが少なくとも 2 つの機能を有し、それぞれに対する阻害薬も異なる可能性も考えられるが、今後さらなる詳細な検討が必要である。

【研究成果発表】

論文投稿準備中である。

【関連学会への参加】

発表： なし

参加： Neuro2018 (2018 年 7 月 26 日～29 日、神戸)