

研究終了報告書

「ミトコンドリア形態の包括的数理モデリング」

研究期間:2020年12月～2024年3月

研究者:立川正志

1. 研究のねらい

本研究の目的は、数理モデルを用いて、ミトコンドリア形態の制御原理をその力学から解き明かすことにある。

ミトコンドリアは内膜・外膜の二重の脂質膜で構成されたオルガネラで、成長分裂を繰り返すことで細胞内で増殖し、モーター分子によって移動することで細胞内に配置される。内膜のプロトン勾配を利用したATP生産の役割を担っており、アポトーシスやカルシウムイオン濃度の調節など重要な細胞機能にも関与する。

多くの模式図においてミトコンドリアは楕円形として描かれているが、実際の細胞では長軸方向に伸びたチューブ形態をとる場合も多く、その長さはバラエティに富む一方、太さは均質に制御されている。内膜は外膜に沿って広がる境界膜と、境界膜から内側に突出したクリステを構成するクリステ膜に分けられる。クリステはチューブ・平板状の膜構造で、分岐を繰り返し複雑なネットワーク形態をミトコンドリア内部に構成している。

ミトコンドリアがどのように形作られているかについては不明な部分が多い。まず、その概形がなぜチューブ状となるのか、解明されていない。浸透圧や膜電位の変化に対し変形応答するなど、化学的状態と形態の相関を示す実験はある一方、その根本原理は手付かずのままである。チューブ状の膜構造を成形するためには、側面の曲がった膜を安定化させる(曲げ弾性エネルギーを下げる)必要がある。小胞体では、タンパク質が曲がった膜を安定化してチューブ構造を生み出しているが、ミトコンドリアにはそのようなタンパク質は報告されておらず、どのようにチューブ形態を安定化しているのか、確固たるモデルは提出されていない。

本研究では、ミトコンドリアの外膜・境界膜・クリステに作用する力を精査し、その力学バランスを通してミトコンドリア形態がどのように制御されるかを数理モデルによって記述し、そのメカニズムの解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

ミトコンドリアをチューブ形に成型する作用として『クリステを伸長する力』を提唱し、この力に加え、ミトコンドリアに作用している、曲げ弾性力、浸透圧、モータータンパク質による牽引力に基づいた自由エネルギーを設計した。この自由エネルギーが極小となる形態を、解析計算および数値シミュレーションを用いて解析した。解析計算では、円筒の両端を半球で閉じた単純な幾何形態のミトコンドリアを設定し、そのチューブ径がミトコンドリアサイズおよび力学パラメータにどのように依存するかしらべ、①あるサイズより小さいミトコンドリアは球形が唯一安定な形態となること、②中間のサイズでは球形とチューブが双安定となり、より大きいサイズでチューブのみが安定となること、③十分大きいミトコンドリアある一定のチューブ半径に収束すること、を示した。また、ミトコンドリアを成形する3つの力はどれもチューブ状態を安定化さ

せ、チューブ半径を小さくさせることが分かった。このモデルにラグランジュ未定乗数法を適用することで安定形態における外膜の張力を推定し、浸透圧の大きい状態では張力が負になり、力学的な不安定化がおきることを示した。

数値シミュレーションでは、膜形態を三角ポリゴンとして表現する **Dynamical Triangulation Membrane** の手法を用い、解析モデルにおいて示されたチューブ形態および球形の形成を確認し、また、中間のパラメータ領域では、大きくゆらぐ中間的な形態も観察された。また、数理解析において推定された負の外膜張力が現れる浸透圧の大きい状態において、チューブ解が不安定化し、ディスク形態とストマトサイト形態が現れることを確認した。

『クリステを伸長する力』の起源としてクリステ局在分子の非平衡運動が生み出すクリステの膨張効果を提唱し、クリステ局在分子を溶質、脂質分子を溶媒、クリステジャンクションを半透膜に対応させた浸透圧モデルを構成し、検証した結果、クリステ局在分子の非平衡運動を環境より高い有効温度としてクリステ伸長力を表現できること、クリステ面積が大きい場合は外乱に対してクリステ伸長力がロバストであり、クリステ面積が小さい場合は外乱に対してクリステ伸長力が強く応答するため、ミトコンドリア形態変化が小さく抑えられることを示した。

(2) 詳細

ミトコンドリアをチューブ形に成型する作用として『クリステを伸長する力』を提唱し、この力に加え、ミトコンドリアに作用している、曲げ弾性力、浸透圧、モータータンパク質による牽引力に基づいた自由エネルギーを設計した。クリステ伸長力を内膜の膜張力として定義し、クリステ膜面積をかけるとエネルギーの次元を持つ。クリステ伸長力による自由エネルギーとしては、クリステ膜面積が増加するに応じて減少する必要があり、負符号となる。また、内膜全体の面積が保存される仮定を用いると、クリステ膜の増加面積は境界膜の減少面積と一致し、境界膜は外膜とぴったりくっついていることから、境界膜の面積変化は外膜の曲率から計算できる。この仮定に基づいた自由エネルギー項を、基本的な生体膜自由エネルギーに加えることで、ミトコンドリア形態を制御する自由エネルギーモデルが構成される。

$$F = \frac{\kappa}{2} \int c^2 da - \sigma w \int c da - pV - \tau L$$

ここで、 κ , c , σ , w , p , V , τ , L は、曲げ弾性定数、外膜の平均曲率、クリステ張力、外膜の境界膜の間の距離、浸透圧、体積、モーター張力、長軸の長さ、である。また積分は、外膜全体について行う。

ミトコンドリア概形を、長さ l 、半径 r の円筒の両端を半径 r の半球でふさいだ単純幾何形態としてモデル化すると、この自由エネルギーを具体的に書き下すことができる。さらに l を外膜の面積 a で置き換え、 κ で全体を無次元化したものを解くと、面積、チューブ半径、力学パラ

メータの間の関係が求まる。この解を表示すると図1のようになり、①あるサイズより小さいミトコンドリアは球形が唯一安定な形態となること、②中間のサイズでは球形とチューブが双安定となり、より大きいサイズでチューブのみが安定となること、③十分大きいミトコンドリアはある一定のチューブ半径に収束することが分かった。チューブ解が存在する面積の範囲は力学パラメータに依存して変化し、負の浸透圧などチューブ解が存在しない力学パラメータの領域が存在することが分かった。

また、外膜の張力を未定乗数 λ としたラグランジュ未定乗数法を自由エネルギーに適用することで、内膜と外膜の張力の和 ($\sigma + \lambda$) が満たす式が求まる。膜形態が安定であるためには張力が正となる必要がある。この和を負とする不等式から、上でチューブ解が存在する力学パラメータ領域でも力学的に不安定であることが示唆される。

この単純幾何形態モデルに対する数理解析から、チューブ解が存在しない領域、チューブ解が力学的に不安定な領域を図示すると、図2のようになる。クリステ張力とモーター牽引力はともに大きくなるにつれチューブ解が安定である領域を大きくするのに対し、浸透圧は大きくても小さくてもチューブ解を不安定させることがわかる。また細胞生物学的考察から、モーター牽引力はモーター分子の個数に応じて不連続に変わる事、分裂イベントや運動状態の変化と連動する事から、安定的な力の供給元とは考えにくく、クリステ伸長力がミトコンドリアのチューブ化に必要であることが示唆される。

上で定義した自由エネルギーのもとで、実際の生体膜に近いより自由な形態を仮定してどのような形態が安定化するか調べるために、膜形態を三角ポリゴンとして表現する **Dynamical Triangulation Membrane** の手法を用いて、モンテカルロシミュレーションを行った。結果、数理解析と同様に小さい膜面積では球形が安定で、膜面積を増やすとある所でチューブ形態が生成されることを確認した(図1B)。また、そこでのチューブ径は数理解析から推定したものとよく一致した。

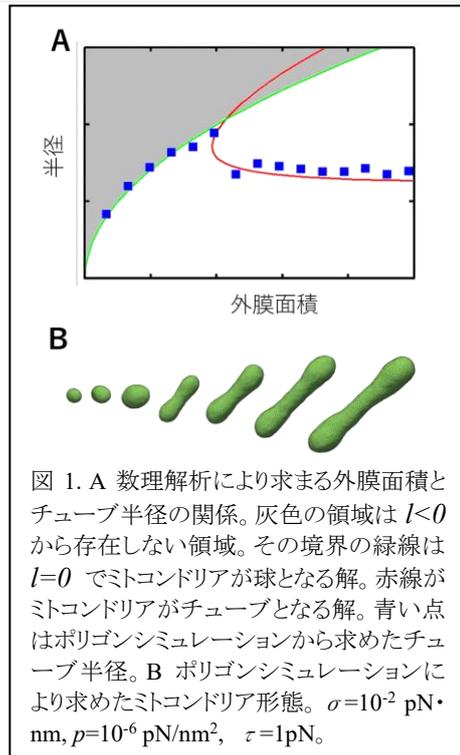


図1. A 数理解析により求まる外膜面積とチューブ半径の関係。灰色の領域は $l < 0$ から存在しない領域。その境界の緑線は $l = 0$ でミトコンドリアが球となる解。赤線がミトコンドリアがチューブとなる解。青い点はポリゴンシミュレーションから求めたチューブ半径。B ポリゴンシミュレーションにより求めたミトコンドリア形態。 $\sigma = 10^{-2}$ pN \cdot nm, $p = 10^{-6}$ pN/nm 2 , $\tau = 1$ pN。

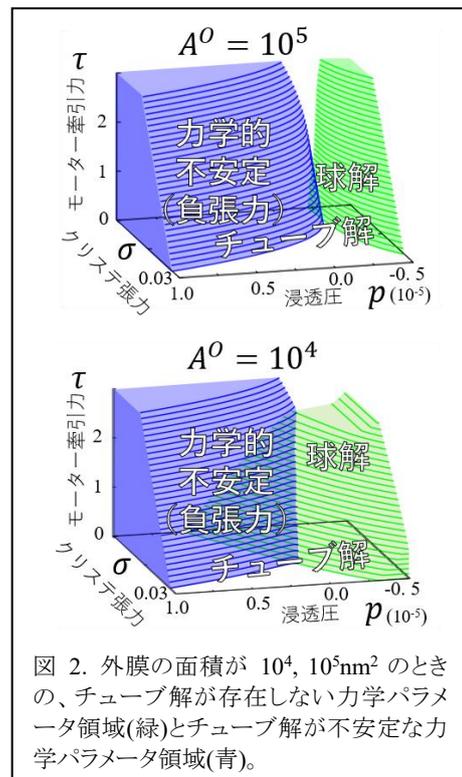


図2. 外膜の面積が $10^4, 10^5$ nm 2 のときの、チューブ解が存在しない力学パラメータ領域(緑)とチューブ解が不安定な力学パラメータ領域(青)。

また、膜面積を固定して力学パラメータを様々に変化させ、モンテカルロシミュレーションを行うことでミトコンドリア形態の相図を作成した(図3)。この相図から数理解析と同じ傾向である、クリステ張力とモーター牽引力はともに大きくなるにつれチューブ状態を安定化させ、浸透圧は中程度でチューブ状態を安定化させること、浸透圧が小さい場合は球状のミトコンドリアが見られることが示された。また、数理解析において力学的不安定とされた力学パラメータ領域では、やはりチューブ形態が不安定化し、ディスク形態およびストマトサイト状の形態が形成されることを示した。

モーター分子の牽引力が強い場合に、ミトコンドリアから本体より細い管状の膜構造が伸びる現象が知られている。本体のチューブ形態とこの管構造の関係を調べるために、数理解析モデルに管構造を追加

し、管が伸びる条件を調べた。結果、浸透圧が一定で内腔体積が変化できる条件では管構造は生成されない事、体積一定の条件でモーター牽引力が大きい場合に管構造が形成されることが分かった。体積一定の条件は、内部体積の変化が追いつかない短い時間スケールの現象であることを意味し、実際のミトコンドリアにおいても多くの場合この管構造が一過的に形成されることから、整合している。また、この結果からモーター牽引力が大きくなると本体のチューブ形態を不安定化させることが示された。また、モンテカルロシミュレーションにおいて、浸透圧一定の条件下で安定なチューブ形態を作成した後、力学条件を体積一定かつモーター牽引力上昇に切り替えたところ、管構造が形成されることを確認し、数理解析の結果を実際の生体膜に近いより自由な形態に対しても確認した。

クリステ伸長力の起源としてクリステ局在分子の非平衡運動が生み出すクリステの膨張効果を提唱し、クリステ局在分子を溶質、脂質分子を溶媒、クリステジャンクションを半透膜に対応させた浸透圧モデルを構成し、検証した。ここまでのモデルでは、定常状態としてのクリステ伸長力(内膜張力)とクリステ膜面積から自由エネルギーを構成したが、ここではクリステ伸長力はクリステの膜面積 A_c と局在分子の量 N 、活性 K からクリステ伸長力 Σ が求まるとして、自由エネルギーを再モデル化し、ミトコンドリア形態とクリステ伸長力の計算を行った。ここでクリステ伸長力は引力のないファンデルワールス気体のモデルを用いている。

結果、クリステ局在分子の非平衡運動を環境より高い有効温度としてクリステ伸長力を表現できること、クリステ面積が大きい場合は外乱に対してクリステ伸長力がロバストであり、クリステ面積が小さい場合は外乱に対してクリステ伸長力が強く応答するため、ミトコンドリア形態変化が小さく抑えられることを示した。クリステ伸長力がロバストであるとは、外乱に対し各クリステにかかる張力変化と、それに応答するクリステ局在分子の密度変化が少ないことを意味し、外乱がクリステの物理化学的環境に影響を与えにくいと解釈できる。この場合、ミトコンドリアの重要な機能である ATP 合成が外乱によらず一定の状態を保つことが予想される。一方、クリステ面積が小さい場合は、クリステの物理化学的環境が外乱に影響を受けやすくなるが、

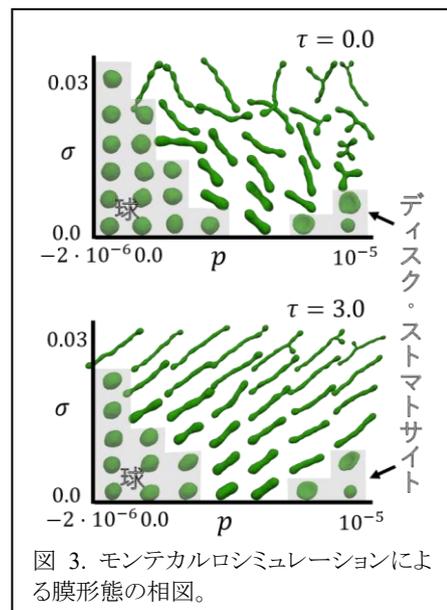


図 3. モンテカルロシミュレーションによる膜形態の相図。

ミトコンドリア形態は維持される。単位サイズミトコンドリアあたりのクリステ量は細胞種類ごとにおおきく異なるが、本結果はその適応的意義の一つを示唆するものである。

3. 今後の展開

ミトコンドリア形態の包括的数理モデルの理解は進み、十分にその挙動と細胞における意味を説明できる段階となったため、現在主論文を執筆中である。ミトコンドリア概形がなぜチューブ型をとるかに対する有効な説明はこれまでなかったため、本論文は質的に新しい議論を喚起することを期待している。本研究に続いて、すでに議論を始めているミトコンドリア実験研究者(平林雄介博士、石原直忠博士、小柴琢己博士)と、本研究で提案したモデルの検証を含めたミトコンドリア形態と力学の関係を精緻に理解するための共同研究を進める予定でいる。また様々な疾患において細胞のミトコンドリア形態が変化することが知られており、そのような疾患における細胞の状態を力学的に理解するための基本となるモデルとなるよう、本研究の成果を発展させていくことを目指す。

4. 自己評価

本研究のテーマであるミトコンドリア形態の包括的数理モデルについては、研究実施期間を通して数理解析およびシミュレーション手法を用いて十分に解析した。数理解析による力学的安定性解析については、当初研究計画を超えて深く理解することができ、ミトコンドリア形態の壊れ方とその力学条件についてシンプルな数式による定式化に辿り着いた。シミュレーションによるより詳細な形態解析はこの数理解析の結果と一致し、その妥当性の議論も十分に行った。本研究で提案したモデルは、モーター分子により生じる管構造なども含めてミトコンドリアの主な形態を説明するモデルとして、「包括的数理モデル」として提唱するに足るものとなっていると自負しており、この結果は数理的な研究にとどまらず、多くのミトコンドリア実験研究者にその是非を問うべく、発表準備を進めている。

一方、本研究のサブテーマであった、ミトコンドリアクリステ形態の数理モデルについては、クリステを構成する分子の複雑さと、未解明度合が当初の想定を上回っており、またモデル作成途中でもクリステ構成分子に関する多くの知見が追加されていったため、確定的なモデルに辿り着くことができなかった。特に、当初ミトコンドリアクリステの平板化を促進すると考えていたタンパク質 **Opal** が逆の作用を示す例を平林雄介博士の結果から知り、クリステ形態の数理モデルの構想を根本から考え直す必要が生じた。しかし、この平林博士とのやり取りをきっかけとして共同研究がスタートし、平林博士の持つクリステ3次元構造データに基づく、現象論的モデルの構築とその検証の可能性について研究を進めている。クリステ形態の実験研究者との共同研究をスタートできたことは、ミトコンドリアに対するより包括的な理解を目指すうえで大きな成果だと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件

1. Sakai Y, Koyama-Honda I, Tachikawa M, Knorr RL, Mizushima N, Modeling Membrane Morphological Change during Autophagosome Formation, *iScience* 23(9) 101466, 2020.

曲率因子による隔離膜の形態制御の数理モデルを構築し、オートファゴソーム形成における隔離膜の形態変化を解析した。その結果、隔離膜成長とともに曲率因子の膜上分布が自発的に変化することで、隔離膜の一連の形態変化を理解できることを示した。

2. Yokota H, Tachikawa M, Evaluation of loop formation dynamics in a chromatin fiber during chromosome condensation, *Progress of Theoretical and Experimental Physics* Vol 2022(5), 053J01, 2022.

染色体凝縮過程におけるクロマチンループ形成に必要なエネルギーを、配置エントロピーに基づく自由エネルギーを計算することで評価した。

3. Tachikawa M, Theoretical approaches for understanding the self-organized formation of the Golgi apparatus, *Development, Growth & Differentiation*, 12842, 2023.

ゴルジ体の形態および膜輸送の動力学を記述する平衡・非平衡モデルを、自己組織化の観点から評価した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演(国際学会・シンポジウム)

- Masashi Tachikawa, Self-organized Formation of Golgi Apparatus., RIKEN BDR Symposium 2022 (Online), 2022.3.1
- Masashi Tachikawa, Physical model simulations for understanding the structures of organelles., The 7th NanoLSI Symposium (Online), 2022.3.1
- Masashi Tachikawa, Physical modeling for the self-organization of the Golgi apparatus morphology., The 9th World Congress of Biomechanics (Online) 2022.7.10

招待講演(国内学会・シンポジウム)

- 立川正志, 物理シミュレーションを用いて細胞内膜形態を理解する試み, 顕微鏡学会第 77 回学術講演会 シンポジウム「顕微鏡ボリュームイメージングにおけるデータ解析の現状と課題」, 2021.6.15
- 立川正志, ミトコンドリアを形成する力, ERATO 水島細胞内分解ダイナミクスプロジェクト公開シンポジウム「形の細胞生物学:理論と実験で迫る」, 2021.11.11
- 立川正志, 生体膜の力学からオルガネラの形を理解する, 第 34 回バイオエンジニアリング講演会, 2022.6.25
- 立川正志, オルガネラを形作る力学, 物性研短期研究会「理論タンパク質物性科学の最前線:理論と実験との密な協働」, 2022.7.26
- 立川正志, 細胞内の力学とオルガネラの形態, 2022 年度数理生物学会年会シンポジウム「細胞内小器官ダイナミクスの数理」, 2022.9.7
- 立川正志, Dynamics of endomembrane system driven by membrane proteins, 第 95 回日本生化学会大会シンポジウム「動的な細胞内プロセスにおける膜タンパク質研究の新機軸」, 2022.11.10
- 立川正志, 膜の力学が制御するオルガネラの形, 日本植物学会第 87 回大会 シンポジウム

「動的高次構造体 “オルガネラ”の 真の姿を捉える革新的アプローチ」, 2023.9.7

- 立川正志, 数理モデルで迫るオルガネラ成形の力学バランス, 第 96 回日本生化学会大会シンポジウム「オルガネラ定量化による生命現象の理解」, 2023.10.31