

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03096

研究課題名(和文)ミトコンドリアタンパク質分解機構の破綻を指標にした疾病・老化マーカーの探索

研究課題名(英文)Functional analysis of the proteases in mitochondrial matrix.

研究代表者

松島 雄一 (Matsushima, Yuichi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20571342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア機能異常が老化・疾病に関与していること、またミトコンドリア傷害タンパク質は老化・疾病によって蓄積することが知られている。ミトコンドリアマトリクスにはLon、ClpXP、m-AAAの3種のプロテアーゼが存在し、これらはバクテリアからヒトまで広く保存されている。これらたった3種のプロテアーゼがミトコンドリアマトリクスの局在するタンパク質を分解することで傷害タンパク質の蓄積などを防ぎ、ミトコンドリア機能を正常に保っていると考えられている。本研究ではこのミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼについて解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは細胞のエネルギーを作り出す器官であり、ミトコンドリアの機能異常は老化や疾病を引き起こします。ミトコンドリア内部のタンパク質は細胞質から輸送され、最終的には3種類のプロテアーゼによって消化されます。これらの酵素は白血病の治療薬のターゲットとしても注目されています。本研究では3種類のプロテアーゼのうち、LonとClpXPがどのようなタンパク質を分解しているのかについて解析をしました。LonとClpXPでは分解するタンパク質により好みがあることなどが判明しました。このような基礎的な研究の積み重ねが、やがて老化の予防や白血病の治療に役立つと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Dysfunctional protein quality control in mitochondria is emerging as a key pathogenic mechanism for aging and various diseases. Consistent with an important role in maintaining mitochondrial protein quality control, inherited mutations in proteases and chaperons in mitochondria matrix are associated with various diseases. Lon, m-AAA and ClpXP are ATP-dependent proteases that contribute to the degradation of all mitochondrial matrix proteins. As well as their proteolytic role for impaired protein, these proteases contribute for highly regulated proteolytic reactions that are important in mitochondrial function. We describe here the functional analysis of the proteases localized in the mitochondrial matrix.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア プロテアーゼ ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

タンパク質分解機構の破綻は様々な疾患や老化を引き起こすことが知られている。ヒトの細胞には1万種類を越えるタンパク質が存在するが、これらを分解するタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)も約 600 種類存在し、その分解経路は複雑に入り組んでいる。

近年、ミトコンドリア機能異常が老化に関与していること、またミトコンドリア機能低下が癌や糖尿病、動脈硬化など生活習慣病発症の引き金となることが示唆されている。ミトコンドリアは外膜と内膜の2つの膜に包まれた構造を持ち、内膜の中はマトリクスと呼ばれる区画となっている(図1)。ミトコンドリアマトリクスは様々な代謝反応が行われる重要な場所であるが、そこにはミトコンドリア独自の DNA(mtDNA)が存在する。哺乳類の mtDNA には 13 の呼吸鎖サブユニットとその翻訳に必要な rRNA と tRNA がコードされているだけで残りのタンパク質は全て核ゲノムにコードされ、それらは細胞質で翻訳された後にミトコンドリアの各区画へと運ばれ最終的にミトコンドリア内で分解される。ミトコンドリアの内膜で覆われたマトリクス内には内膜の膜タンパク質も含め千種類近くのタンパク質が存在する。ミトコンドリアは強い酸化ストレスにさらされているためミトコンドリアマトリクスのタンパク質は傷害を受ける。このミトコンドリア傷害タンパク質は加齢によってマトリクス内に蓄積・凝集すると考えられており、一方でミトコンドリア機能は加齢とともに低下する。また、ミトコンドリア機能低下を原因とする疾患でも同様の報告がある。従って、このような傷害タンパク質の蓄積・凝集はミトコンドリア機能低下の指標となりうる可能性がある。

ミトコンドリアマトリクス内のタンパク質分解はたった種類のプロテアーゼ(Lon, m-AAA, ClpXP)によって行われ、タンパク質分解経路として代表的なユビキチン・プロテアソーム経路は存在しない(図1)。しかし、これらのプロテアーゼの基質特異性や分解機能の破綻に伴う異常などについての情報は乏しかった。

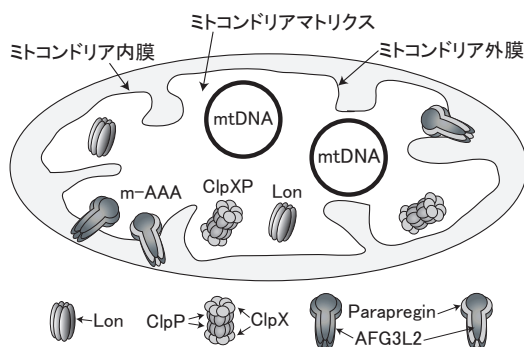


図1 ミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ

2. 研究の目的

本研究の目的を以下に示す。
 (1)ミトコンドリアマトリクス内に存在するプロテアーゼの基質特異性を明らかにすること。
 (2)ミトコンドリアマトリクス内に蓄積・凝集するタンパク質について解析を行うこと。
 以上のことを明らかにすることで、疾病や老化によってミトコンドリアマトリクス内に蓄積・凝集するタンパク質の解明に資することである。

3. 研究の方法

本研究ではヒト培養細胞とショウジョウバエ培養細胞を用いて研究を行った。

主に、遺伝子ノックダウン法及びプロテアーゼ活性不活化変異体を誘導発現させるドミナントネガティブ法によって各プロテアーゼの機能を過失させた細胞を実験に用いた。

4. 研究成果

・ ClpXP の解析

ClpXP は ClpP と ClpX の2つのサブユニットから構成され、ClpP が7量体のリング状構造を2つ重ねた14量体構造をとり、その両端に6量体リング状構造を取った ClpX がそれぞれ配置されている(図1)。ClpP はプロテアーゼ領域を持ちタンパク質分解に寄与し、一方 ClpX はシャペロン様活性(ATPase 活性)を持ち基質の選択や効率的なタンパク質分解に寄与している。

ショウジョウバエ培養細胞を用いて ClpP ノックダウン細胞株を作成した。この ClpP ノックダウン細胞株では(A)一部のミトコンドリア mRNA 量の上昇に加え、(B)未切断のミトコンドリア RNA の異常な蓄積、(C)ミトコンドリア翻訳の低下が観察された(図2)。またドミナントネガティブ型プロテアーゼ活性欠損型 ClpP の過剰発現させた細胞株やシャペロンサブユニットの ClpX をノックダウン細胞株でも同様の表現型を示した。次にこれらの細胞を詳しく解析したところ、ミトコンドリア RNA 結合タンパク質の LRPPRC1 と SLIRP1 のタンパク量が増加していること、またそれらをコードしている mRNA 量には変化がないことが明らかとなった(図3)。もう一つのプロテアーゼである Lon のノックダウン細胞株ではこれらタンパク質の増加は観察されなかった。さらなる解析の結果、(1)LRPPRC1 と SLIRP1 は共依存の関係にあること、(2)免疫沈降法によって ClpXP と LRPPRC1 の会合が検出されることなどから、ClpXP は LRPPRC1 のみを特異的に分解していると考えられること、(3)ClpXP の機能抑制によって LRPPRC1 の分解が抑制されそのタンパク量が増加するため LRPPRC1 と共依存関係にある SLIRP1 のタンパク量が増加すること、が明らかとなった。さらに、LRPPRC1 を過剰発現させる細

胞株を用いた解析の結果(図4A)、LRPPRC1の増加に伴い(a)一部のミトコンドリア mRNA 量の増大がみられること(図4B)、(b)未切断のミトコンドリア RNA の異常な蓄積がおきること(図4B)、(c)ミトコンドリアの小リボソームと大リボソームの会合が阻害されること、(d)その結果ミトコンドリア翻訳が減少すること、が判明した。そのため、ClpXP ノックダウン細胞で観察された表現型は ClpXP の機能低下に伴う LRPPRC1 の増加に由来すると考えられた。上記の結果から、ClpXP は LRPPRC1 の特異的分解を介して mtDNA の遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

また、ヒト培養細胞において ClpP ノックダウンさせると LRPPRC が増加することから、ヒトにおいても LRPPRC が ClpXP が特異的基質である可能性を示した。

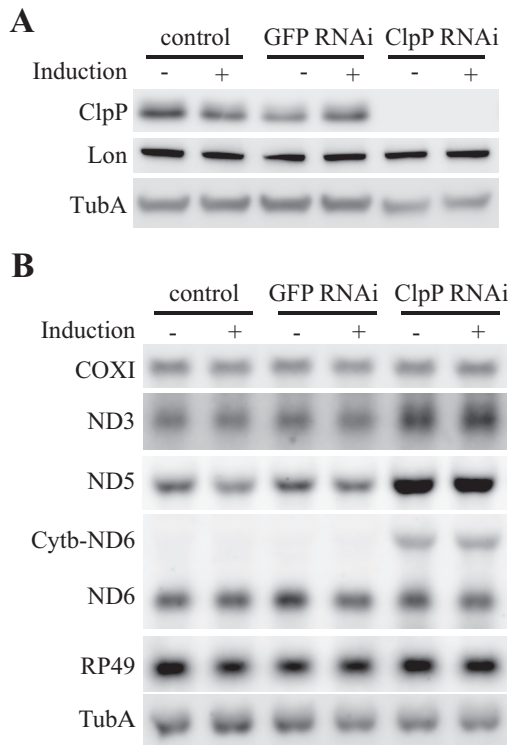


図2
A. ClpP ノックダウン細胞のウエスタン解析
B. ClpP ノックダウン細胞のノーザン解析

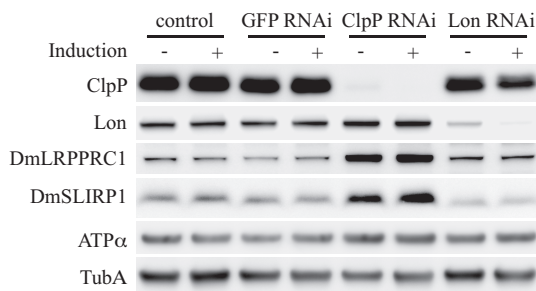


図3 ClpP ノックダウン細胞のウエスタン解析

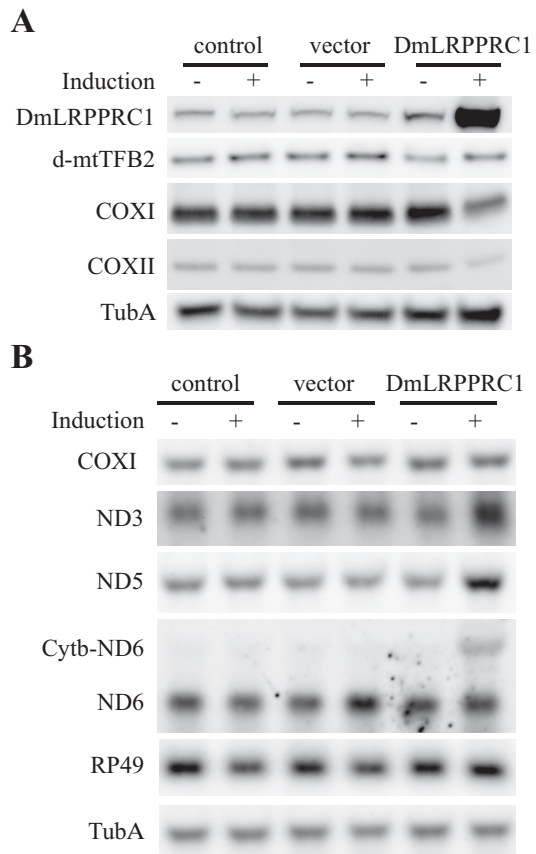


図4
A. LRPPRC1 過剰発現細胞のウエスタン解析
B. LRPPRC1 過剰発現細胞のノーザン解析

・Lon の解析

Lon が特異的に分解している新たなタンパク質を探索するため、siRNA により Lon をノックダウンしたヒト培養細胞(HeLa 細胞)を用いて実験を行った。コントロール細胞に比べ Lon ノックダウン細胞では不溶化画分に移行するタンパク質が増加した(図5)。また、Lon のドミナントネガティブ型プロテアーゼ活性欠損型を過剰発現させた細胞株でも同様の結果を得た。これら不溶化タンパク質の顕著な増加は m-AAA のサブユニット AFG3L2 や ClpXP の ClpP サブユニットのノックダウンでは観察されなかった(図5)。増加した質量分析装置を用いて解析の結果、コントロール細胞の不溶化画分にはミトコンドリア由来タンパク質がほぼ検出されないのに対し、Lon ノックダウン細胞の不溶化画分には多数のミトコンドリアタンパク質が検出された。この中には多くのミトコンドリアリボソームタンパク質(MRPs)が含まれていた(図6)。これらミトコンドリアリボソームタンパク質(MRPs)が特異的に分解される条件下において Lon をノックダウンするとこの分解が阻害されること、ClpXP のプロテアーゼサブユニットである ClpP のノックダウンではその分解が阻害されないことから、ミトコンドリアリボソームタンパク

質はLonにより特異的に分解されていることが示唆された。

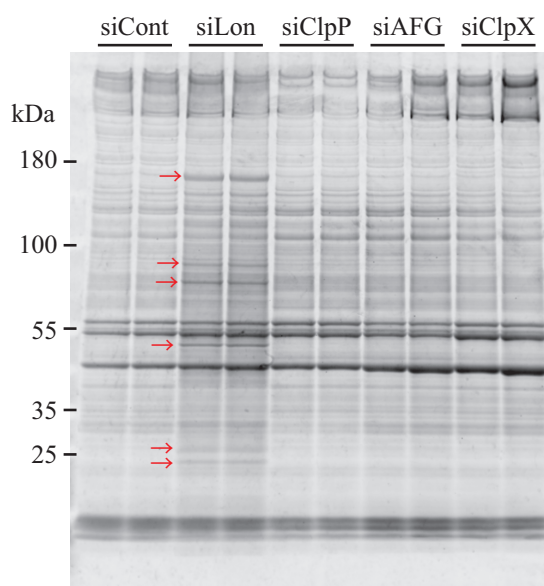


図5 各ノックダウン細胞の不溶化タンパク質
主なLonノックダウン特異的なタンパク質を
矢印で示した

ミトコンドリアリボソームタンパク質
ATP シンターゼサブユニット
シトクロームオキシダーゼサブユニット
ストレスタンパク質
代謝酵素(尿素回路、TCA回路など)

図6 Lonノックダウン細胞の不溶化画分
に含まれる主なミトコンドリアタンパク質

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5件)

(1) Keisuke Monji, Takeshi Uchiumi, Saki Hoshizawa, Mikako Yagi, Matsumoto, Takashi, Daiki Setoyama, Yuichi Matsushima, Gotoh Kazuhito, Rie Amamoto, Dongchon Kang. Serum depletion induced cancer stem cell-like phenotype due to nitric oxide synthesis in oncogenic HRas transformed cells. *ONCOTARGET*, 7(46) 75221-75234, 2016 査読あり DOI: 10.18632/oncotarget.12117.

(2) Yuichi Matsushima, Yuta Hirofuji,

Masamune Aihara, Yue Song, Takeshi Uchiumi, Laurie S Kaguni, Dongchon Kang. Drosophila protease ClpXP specifically degrades DmLRPPRC1 controlling mitochondrial mRNA and translation. *SCIENTIFIC REPORTS*, 16;7(1):8315 (2017) 査読あり DOI: 10.1038/s41598-017-08088-6.

(3) Toshiro Saito, Takeshi Uchiumi, Mikako Yagi, Rie Amamoto, Daiki Setoyama, Yuichi Matsushima, Dongchon Kan.

Cardiomyocyte-specific loss of mitochondrial p32/C1qbp causes cardiomyopathy and activates stress responses *CARDIOVASCULAR RESEARCH*, 113(10) 1173-1185 (2017) 査読あり DOI: 10.1093/cvr/cvx095.

(4) Mikako Yagi, Takeshi Uchiumi, Noriaki Sagata, Daiki Setoyama, Rie Amamoto, Yuichi Matsushima, Dongchon Kang. Neural-specific deletion of mitochondrial p32/C1qbp leads to leukoencephalopathy due to undifferentiated oligodendrocyte and axon degeneration. *SCIENTIFIC REPORTS*, 7(1):15131 (2017) 査読あり DOI: 10.1038/s41598-017-15414-5.

(5) Doxycycline induces apoptosis via ER stress selectively to cells with a cancer stem cell-like properties □ Importance of stem cell plasticity. Takashi Matsumoto, Takeshi Uchiumi, Keisuke Monji, Mikako Yagi, Daiki Setoyama, Rie Amamoto, Yuichi Matsushima, Masaki Shiota, Masatoshi Eto, Dongchon Kang. *Oncogenesis*, 6(11):397 (2017) 査読あり DOI: 10.1038/s41389-017-0009-3.

[学会発表] (計 7件)

(1) ヒトミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon の特異的基質の探索 松島雄一、高橋和也、瀬戸山大樹、康東天 2017年度生命科学系学会合同年次大会 神戸 2017/12/6-9

(2) ヒトミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon の特異的基質の探索 松島雄一、高橋和也、瀬戸山大樹、康東天 第17回日本ミト

- コンドリア学会大会 京都市 2017/11/22-23
- (3) ヒトミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon の特異的基質の探索 松島雄一、高橋和也、瀬戸山大樹、康東天 オルガネラ研究会 2016 岡崎市 2017/7/28-29
- (4) ClpXP によるミトコンドリア DNA 遺伝子発現制御の解析 松島雄一、廣藤雄太、康東天 第 89 回日本生化学会大会 仙台市 2017/9/25-27
- (5) ClpXP によるミトコンドリア DNA 遺伝子発現制御の解析 松島雄一、廣藤雄太、康東天 第 39 回日本分子生物学会年会 横浜市 2017/11/30-12/2
- (6) ヒトミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon の特異的基質の探索 松島雄一、高橋和也、瀬戸山大樹、康東天 日本農芸化学会 2016 年度大会 札幌市 2016/3/27-30
- (7) ヒトミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon の特異的基質の探索 高橋和也、松島雄一、瀬戸山大樹、康東天 第 15 回日本ミトコンドリア学会年会 福井市 2015/11/19-20

〔図書〕(計 2 件)

- (1) ミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼの多様な機能 松島雄一、相原正宗 化学と生物, 55(4), 2017.
DOI:10.1271/kagakutoseibutsu.55.227
- (2) ミトコンドリアに局在するプロテアーゼのあらたな機能 松島雄一、相原正宗 医学のあゆみ 260(1), 55-60, 2017-01-07.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
松島雄一 (MATSUSHIMA, Yuichi)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：20571342

(2) 研究分担者
内海健 (UCHIUMI, Takeshi)

九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80253798

瀬戸山大樹 (SETOYAMA, Daiki)
九州大学・九州大学病院・助教
研究者番号：30550850

(3) 連携研究者
後藤雄一 (GOTO, Yu-ichi)
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所疾病研究第二部・部長
研究者番号：20225668