

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19378

研究課題名(和文)ミトコンドリアタンパク質GOS2の虚血におけるATP産生制御機構の解明

研究課題名(英文)Unraveling the mechanism by which GOS2 regulates mitochondrial ATP production under ischemia

研究代表者

加藤 久和 (Kato, Hisakazu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30589312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心臓はポンプ機能を維持するため他臓器に比して激しくATPを消費するが、虚血におけるATP産生の制御機構は明らかでない。本研究では、ATP産生制御因子GOS2がどのようにATP合成酵素を介したATP産生制御に関わっているかについて検討し以下を明らかにした。(1)GOS2はユビキチンプロテアソーム系によって分解される。(2)変異体解析から、疎水性領域のアミノ酸が分解に強く寄与する。(3)この変異体を導入した心筋細胞では、野生型に比して低酸素下のミトコンドリアATP産生低下を軽減した。これらの結果はGOS2タンパク質分解の抑制を標的としたATP産生を増強する新たな創薬への可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Heart tissue consumes more energy than other organs to maintain cardiac pump function. However, the mechanism by which mitochondrial ATP production is regulated under hypoxia is not fully understood. In this study, we revealed how GOS2 regulates mitochondrial ATP production via ATP synthase, mainly from the following experiments. (1) GOS2 is degraded by ubiquitin-proteasome system. (2) One amino acid within hydrophobic region of GOS2 is strongly involved in its protein degradation. (3) In cardiomyocytes, GOS2 mutants that have longer half-life improved the decreases in mitochondrial ATP concentration under hypoxic condition compared to wild-type. These results suggest that the enhancement of mitochondrial ATP production by inhibition of GOS2 protein degradation can lead to novel therapeutic target to ischemic heart diseases.

研究分野：分子心臓学

キーワード：ミトコンドリア 虚血 ATP合成酵素 タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血心におけるエネルギー代謝と心不全: 心臓は常に自律拍動をするため多臓器に比して莫大な ATP を消費している。心筋が虚血状態になると、ATP の供給と需要のバランスが崩れ心不全発症の大きな要因となる。しかし虚血時における ATP の供給制御メカニズムについては未だ十分に解明されていない。

(2) ミトコンドリア ATP 産生の評価と ATP 産生制御因子 G0S2 の同定: エネルギー代謝調節のメカニズムを解明する上で、細胞内 ATP 濃度を鋭敏に測定する実験系は必須である。近年開発された ATP 感受性 FRET プローブ応用して、心筋細胞ならびにゼブラフィッシュ心臓における細胞質およびミトコンドリア ATP 濃度をリアルタイムで測定できる実験系を確立した。この測定系により、新たに低酸素応答遺伝子 G0S2 が FoF1-ATP 合成酵素との相互作用を介してエネルギー飢餓状態でのミトコンドリア ATP 濃度の維持に大きく寄与していることを明らかにした。しかしながら、G0S2 がどのように FoF1-ATP 合成酵素を制御しているかについては未だ明らかでない。

(3) G0S2 の量的制御: G0S2 は短時間の低酸素刺激に対して速やかに一過性に応答することから、低酸素・虚血刺激における何らかの量的制御メカニズムが働いていると考えられる。プロテアソーム阻害剤により安定化することからユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解制御が示唆される。

2. 研究の目的

虚血における ATP 産生制御機構を解明するために、ATP 産生制御因子 G0S2 の FoF1-ATP 合成酵素との相互作用様式および量的制御機構について生化学的解析を行う。また虚血においてそのような制御機構が心筋細胞の ATP 産生とエネルギー代謝にどのように関わっているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) G0S2 による FoF1-ATP 合成酵素の制御メカニズムの解明

G0S2 が FoF1-ATP 合成酵素のどのサブユニットと相互作用しているかを明らかにするために、最近開発された光反応性を有する非天然型アミノ酸と遺伝暗号の改変を用いた部位特異的光クロスリンク法を応用して、G0S2 と直接的に結合する FoF1-ATP 合成酵素のサブユニットを同定し、結合部位の特定を行う。

(2) G0S2 の低酸素応答における量的制御メカニズムの解明

どのような分解システムが関与して

いるかを明らかにし、種々の変異体作成により分解に寄与するアミノ酸を探索し、G0S2 タンパク質の分解に関する相互作用因子の同定を行う。

(3) 心筋細胞における G0S2 変異体のエネルギー代謝への影響

FoF1-ATP 合成酵素サブユニットとの相互作用に関わる部位、G0S2 の量的制御に関わる部位についての変異体を作成し、これらの変異体を導入した心筋細胞を用いて、ミトコンドリア ATP 濃度のリアルタイム動態や ATP 合成活性を検討する。

(4) ゼブラフィッシュを用いた虚血心におけるミトコンドリア ATP の動態解析

ゼブラフィッシュ個体でミトコンドリア ATP 濃度をリアルタイムで測定できるトランスジェニックゼブラフィッシュ (Mit-ATeam TG) を作成した。この Mit-ATeam TG フィッシュを用いて、虚血時の心臓においてミトコンドリア ATP の動態を検討する。

(5) ヒトミトコンドリア病サンプルでの変異解析

国立精神・神経医療研究センターとの共同研究によりヒトミトコンドリア病患者由来の血液サンプルを用いて G0S2 の遺伝子変異の探索を行う。

4. 研究成果

(1) G0S2 による FoF1-ATP 合成酵素の制御メカニズムの解明

部位特異的光クロスリンクを培養心筋細胞で効率的に行うために、アデノウイルスでの発現系の構築を試みた。特に非天然アミノ酸をコードする tRNA プロモーターの選択が重要であり、それにより発現量が大きく異なることが明らかとなった。tRNA あるいは aaRS の発現量の最適化の後光クロスリンクを行った結果、いくつかの部位でのクロスリンクにて結合タンパクとみられるバンドを検出した。これらのバンドを質量分析にて解析したところ、G0S2 の多量体化に関わる部位を同定した。この多量体化が FoF1-ATP 合成酵素との相互作用にどのように影響を及ぼすか、現在検討中である。

また、アデノウイルス発現系では非天然アミノ酸の導入効率が低く、多量体化した G0S2 以外のバンドを検出できていないため、レンチウイルスを用いた発現系を新たに構築中である。

(2) G0S2 の低酸素応答における量的制御メカニズムの解明

G0S2 の量的制御メカニズムの解明の

ため、まず培養心筋細胞において、タンパク質合成阻害剤 cycloheximide を用いた G0S2 タンパク質の寿命の検討。G0S2 がユビキチン化修飾を受けているかについて検討を行った。その結果、G0S2 タンパク質は、その半減期が 15~20 分程度と非常に短いことがわかり、ユビキチン化を示すラダー状のバンドも認められたことから、細胞内において G0S2 がユビキチン化修飾を受けてプロテアソームにて分解されていることが明らかとなった(図1)。

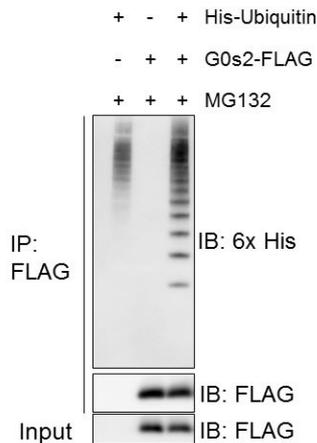


図1: G0S2はユビキチン化される

さらに、G0S2 タンパク質分解に寄与するアミノ酸を同定するために、N 末端欠損変異体、C 末端欠損変異体、疎水性領域のアラニン置換変異体を作成した。これらの変異体を細胞に導入し、プロテアソーム阻害によるタンパク質の蓄積を検討したところ、疎水性領域のアラニン置換変異体(HDA)において、プロテアソームを阻害しても蓄積の変化を認めず、cycloheximide によるタンパク質半減期の延長を認めた(図2)。

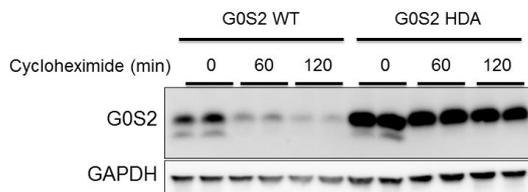


図2 G0S2 HDA変異体はタンパク質寿命が延長される

(3) 心筋細胞における G0S2 変異体のエネルギー代謝への影響

G0S2 のタンパク質分解が抑制される HDA 変異体および野生型 G0S2 を心筋細胞にレンチウイルスを用いて導入した。この細胞において低酸素下での FRET プローブによるミトコンドリア ATP 濃度の動態を検討した。

その結果、これまでの報告どおり G0S2 野生型を導入した細胞はコントロールに比して、低酸素下におけるミトコンドリア ATP 産生の低下の軽減を認めた。一方 HDA 変異体導入細胞では、野生型と同様コントロールに比して、低酸素下におけるミトコンドリア ATP 産生の低下の軽減を認めたのみならず、野生型に比してより顕著に ATP 産生の低下を改善することが明らかとなった(図3)。

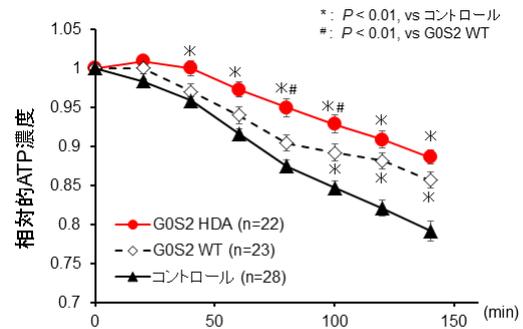


図3 タンパク質寿命を延ばす G0S2 変異体は低酸素下の ATP 産生低下を改善する

(4) ゼブラフィッシュを用いた虚血心におけるミトコンドリア ATP の動態解析

ゼブラフィッシュ個体でミトコンドリア ATP 濃度をリアルタイムで測定できる Mit-ATeam TG フィッシュを用いて、虚血時の心臓においてミトコンドリア ATP の動態を検討する。まず、ゼブラフィッシュ G0S2 遺伝子をクローニングし、G0S2 が発現すると mCherry 蛍光を発するコンストラクトを作成した。Mit-ATeam TG 個体から得られた受精卵に前述のコンストラクトを顕微注入した。2~3 日後の個体をアガロースで固定して Dual CCD カメラを装備した蛍光顕微鏡にて観察した。さらにこの個体を低酸素(5%O₂)に曝露した条件下で心臓のタイムラプス観察を行ったところ、G0S2 遺伝子が発現する領域(mCherry 蛍光陽性)では、発現しない領域に比してミトコンドリア ATP 濃度の低酸素による低下が減弱していた。この結果は培養心筋細胞で行った結果と一致するものである。現在 HDA 変異をゼブラフィッシュ G0S2 遺伝子に導入し、今後 Mit-ATeam TG フィッシュに発現させミトコンドリア ATP 濃度の変化について検討する予定である。

(5) ヒトミトコンドリア病サンプルでの変異解析

当研究室は数年前から国立精神・神経医療研究センターと共同研究を行っておりヒトミトコンドリア病患者由来の血液サンプルの解析を続けている。核ゲ

ノムにコードされている遺伝子変異がミトコンドリア病の病因であることが報告されており、G0S2 遺伝子についても前述の成果から遺伝子変異を伴っている可能性が示唆され、血液サンプルを用いて G0S2 の遺伝子変異の探索を行っている。未だ変異の発見には至っていないが引き続き継続して探索を行う予定である。

以上の結果から、G0S2 はミトコンドリア ATP 産生能を増強させる一方、ユビキチン・プロテアソーム系によってそのタンパク質量が制御されていることが明らかとなった。さらにタンパク質分解が抑制される変異体を導入した細胞では、野生型に比してミトコンドリア ATP 産生の増強を認めることから、G0S2 タンパク質分解を標的として、虚血における ATP 産生を増強させる新たな創薬展開への可能性が示唆された。

以上の成果について現在論文作成中である。

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 4 件)

Kondo H, Maksimova N, Otomo T, **Kato H**, Imai A, Asano Y, Kobayashi K, Nojima S, Nakaya A, Hamada Y, Irahara K, Gurinova E, Sukhomyasova A, Nogovicina A, Savvina M, Yoshimori T, Ozono K, Sakai N. Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. *Hum Mol Genet.* 2016. pii: ddw377. doi: 10.1093/hmg/ddw377. (査読有)

Masumura Y, Higo S, Asano Y, **Kato H**, Yan Y, Ishino S, Tsukamoto O, Kioka H, Hayashi T, Shintani Y, Yamazaki S, Minamino T, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S, Sakata Y. Btg2 is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy through a Decrease in Cytosolic RNA. *Sci Rep.* 2016;6:28592. doi: 10.1038/srep28592. (査読有)

Kanzaki M, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Oiki E, Nishida T, Asanuma H, **Kato H**, Oka T, Ohtani T, Tsukamoto O, Higo S, Kioka H, Matsuoka K, Sawa Y, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S, Sakata Y. A Development of Nucleic Chromatin Measurements as a New Prognostic Marker for Severe Chronic Heart

Failure. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148209. doi: 10.1371/journal.pone.0148209. eCollection 2016. (査読有)

Ihara M, Asanuma H, Yamazaki S, **Kato H**, Asano Y, Shinozaki Y, Mori H, Minamino T, Asakura M, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. An interaction between glucagon-like peptide-1 and adenosine contributes to cardioprotection of a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor from myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015; 308(10):H1287-97. doi: 10.1152/ajpheart.00835.2014. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

第 64 回 日本生化学会 近畿支部例会
神窪謙太、**加藤久和**、高島成二
ミトコンドリア ATP 産生を制御因子 G0s2 の量的制御に関する機能解析
2017 年 5 月 27 日、大阪(口頭発表、ポスター)

第 5 回若手研究フォーラム
加藤久和、木岡 秀隆、高島成二
A screening assay development for the identification of compounds regulating proteasome-dependent protein degradation
2015 年 9 月 15 日、大阪(ポスター)

GE Life Sciences Day 2015
加藤久和、木岡 秀隆、高島成二
プロテアソーム依存的タンパク質分解を制御する化合物スクリーニング系の構築
2015 年 7 月 24 日、横浜(ポスター)

〔その他〕

ホームページ等
大阪大学大学院医学系研究科医化学講座
<http://medbio.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
加藤 久和 (Kato Hisakazu)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 30589312