

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15115

研究課題名(和文)ミトコンドリア局在タンパク質の翻訳後修飾と全身代謝制御

研究課題名(英文) Post-translational modifications of a mitochondria-resident protein and its role in systemic regulation

研究代表者

一條 秀憲 (ICHIJO, Hidenori)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：00242206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内のエネルギー代謝を語る上でミトコンドリアの存在は欠かせない。ミトコンドリア内膜の電子伝達系を用いて膜電位を形成し、ATP産生を行う一連のプロセスは、生命維持に必須である。ミトコンドリアに局在するPGAM5の解析を進めた我々は、熱産生に重要な褐色脂肪細胞における新たな機能を明らかにするに至った。すなわち、PGAM5は何らかのストレスを感知し、熱産生に関与する遺伝子発現の負の制御を介した上で、エネルギー代謝の調節に寄与していた。本研究において我々は、ミトコンドリア局在のPGAM5が、核内の転写を介してミトコンドリアにおけるエネルギー代謝調節を行うという新たな側面を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)： Mitochondria is indispensable for energy metabolism within the cell, which is also essential for whole-body energy metabolism. PGAM5, a mitochondria-resident protein, has newly clarified as a metabolism regulator in brown adipocytes. PGAM5 somehow senses environmental stresses and conveys signals into the nucleus resulting in the alteration of transcriptome, which includes the suppression of several thermogenic genes. We hereby discovered a novel mechanism that a mitochondria-resident protein regulates mitochondrial energy metabolism through the gene expression regulation in the nucleus.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：ミトコンドリア PGAM5 翻訳後修飾 代謝制御

1. 研究開始当初の背景

生命体を構成する個々の細胞は生きるために ATP を作り続けている。あらゆる生命活動のエネルギー源となる ATP が産生されている場合は、細胞内小器官のひとつであるミトコンドリアである。ミトコンドリア内膜に局在する電子伝達系がプロトン勾配を作り出すことが ATP 産生の源であることは周知の事実だが、他のミトコンドリア局在タンパク質の「エネルギー代謝」への関与は不明な点が多い。

ストレス応答性リン酸化シグナル経路の活性化因子として我々が同定した PGAM5 は、ミトコンドリア内膜に局在する脱リン酸化酵素である。特筆すべきことに、PGAM5 はミトコンドリア膜電位低下と共に膜内切断を受けることが知られており、ある環境下ではこの膜内切断が細胞死の誘導に関与する。しかしながら、(1) 脱リン酸化酵素活性および (2) 膜内切断の生理的意義に関する知見には乏しい。

PGAM5 の個体における生理的意義を解明すべく我々は、全身性の PGAM5 欠損マウスを作製し、表現型解析を進めた。その結果、驚くべきことに、低温ストレスに対する抵抗性を認めた。すなわち、PGAM5 欠損マウスは低温環境下における体温維持能力が増強されていた。個体の体温維持は数多くの組織によって担われているが、当然のことながら各細胞のエネルギー代謝能に依存する。このことは、ミトコンドリアに局在する PGAM5 が何らかのシステムを介して、ミトコンドリアのエネルギー代謝を増強し、個体レベルでのエネルギー代謝亢進を導いていることを示唆する。

2. 研究の目的

ミトコンドリア局在タンパク質である PGAM5 がどのように全身のエネルギー代謝を制御しているか、そのメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

あくまで研究対象を PGAM5 に絞るが、本研究の主題は、ミトコンドリア局在タンパク質による、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝調節を介した、全身エネルギー代謝調節機構の一端を明らかにすることである。細胞内小器官におけるマイクロなシステムにより生み出されるマクロなインパクトを見出すことで、より広い視点で「エネルギー代謝」領域に新たな示唆を与えることを目的としている。

3. 研究の方法

当研究室で作製済みの全身性 PGAM5 欠損マウスを用いて、マウス個体における PGAM5 の重要性を明らかにする。具体的には、全身のエネルギー代謝に深く関わる組織

を抽出し、RNA-seq による遺伝子発現解析を行う。

続いて、RNA-seq 解析に供した組織を構成する細胞種の単離培養細胞系を用いて、*in vitro* の系において PGAM5 の生理的意義を明らかにする。その際には、PGAM5 が持つ重要な特徴である、(1) 脱リン酸化酵素活性、および、(2) 膜電位低下に伴う膜内切断、の 2 点の関与を検討する。

4. 研究成果

これまでに我々は、PGAM5 欠損マウスが低温ストレスに対して抵抗性を持つことを明らかにしている。すなわち、低温環境下で飼育された PGAM5 欠損マウスは、野生型のマウスに比べて体温維持能が高い。個体の体温維持には数多くの組織が関与するが、その中でも特に褐色脂肪組織に着目した。その理由のひとつとして、PGAM5 欠損マウスの褐色脂肪組織の組織像を観察した結果、脂肪滴の蓄積抑制が認められたことが挙げられる(図 1)。この観察結果は、PGAM5 欠損マウスの褐色脂肪組織において、中性脂肪の分解が促進していること、ひいては、エネルギー代謝が亢進していることを示唆する。

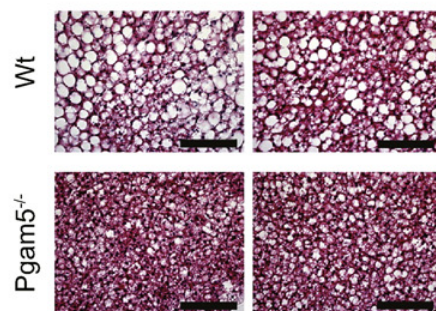


図1 褐色脂肪組織像 (HE染色)
EBioMedicine 5, 82-92 (2016) より転載

そこで我々は、野生型と PGAM5 欠損マウスの褐色脂肪組織を用いて RNA-seq 解析を行うことで、トランスクリプトームの変化を検討した。その結果、褐色脂肪細胞の熱産生に関わる複数の遺伝子発現が PGAM5 欠損褐色脂肪組織において亢進していることが明らかとなった。この結果は、引き続き行った定量 RT-PCR 法やウエスタンブロット法による検討によっても確認されている。

続いて、本結果が褐色脂肪細胞内で自律的に生じる現象であるかを検討すべく、初代培養褐色脂肪細胞系を用いた。本細胞は、新生児より未分化細胞単離し、各種薬剤を用いて分化させたものである。組織を用いた検討結果と同様、褐色脂肪細胞系においても PGAM5 自身のタンパク発現は顕著に認められた。そこで、PGAM5 欠損マウス由来の細胞における遺伝子発現パターンを野生型由来のものと比較したところ、PGAM5 欠損細胞における熱産生関連遺伝子の発現上昇が

確認された。すなわち、褐色脂肪内の PGAM5 が直接的に遺伝子発現プログラムを制御していることが示唆された。

これまでに我々は、脱リン酸化不活性化型変異体や切断耐性型変異体の作製に成功している。そこでこれら変異体を用いた検討を行ったところ、熱産生に関わる遺伝子発現の調節に対するこれら活性の必要性が示唆された。これまで、PGAM5 の脱リン酸化能や切断の意義に関する知見には非常に乏しく、本研究結果の重要性は高い。

以上の結果から、ミトコンドリアに局在する PGAM5 は、脱リン酸化能や自身の切断という翻訳後修飾を介して、核内の転写を制御することで、熱産生およびエネルギー代謝に寄与することが明らかとなった。あくまで本研究においては、トランスクリプトームの変化を介した制御メカニズムに注視したため、PGAM5 がミトコンドリア上で直接的にエネルギー代謝を制御するメカニズムに関しては、今後の検討が必要である。

本研究結果を端的に解すると、PGAM5 は遺伝子発現を介してエネルギー代謝を負に制御していると言える。すなわち、この PGAM5 による代謝抑制メカニズムを解除することが可能となれば、エネルギー代謝亢進による新規抗肥満戦略の構築に寄与することが可能であろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Watanabe, K., Umeda, T., Niwa, K., Naguro, I. and Ichijo, H. A PP6-ASK3 module coordinates the bidirectional cell volume regulation under osmotic stress. **Cell Rep.**, 22, 2809-2817 (2018). doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.045
2. Imamura, K., Yoshitane, H., Hattori, K., Yamaguchi, M., Yoshida, K., Okubo, T., Naguro, I., Ichijo, H. and Fukada, Y. ASK family kinases mediate cellular stress and redox signaling to circadian clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 115, 3646-3651 (2018). doi: 10.1073/pnas.1719298115
3. Hirata, Y., Katagiri, K., Nagaoka, K., Morishita, T., Kudoh, Y., Hatta, T., Naguro, I., Kano, K., Udagawa, T., Natsume, T., Aoki, J., Inada, T., Noguchi, T., Ichijo, H. and Matsuzawa, A. TRIM48 promotes ASK1 activation and cell death through ubiquitination-dependent degradation of the ASK1 negative regulator PRMT1. **Cell Rep.**, 21, 2447-2457 (2017). doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.007.
4. Hattori, K., Ishikawa, H., Sakauchi, C., Takayanagi, S., Naguro, I., Ichijo, H. Cold stress-induced ferroptosis involves the ASK1-p38 pathway. **EMBO Rep.**, 18, 2067-2078 (2017). doi: 10.15252/embr.201744228.
5. Kamiyama, M., Shirai, T., Tamura, S., Suzuki-Inoue, K., Ehata, S., Takahashi, K., Miyazono, K., Hayakawa, Y., Sato, T., Takeda, K., Naguro, I. and Ichijo, H. ASK1 facilitates tumor metastasis through phosphorylation of an ADP receptor P2Y12 in platelets. **Cell Death Differ.**, 24, 2066-2076 (2017). doi: 10.1038/cdd.2017.114.
6. Chaikuad, A., Chaikuad, A., Filippakopoulos, P., Marcisin, S. R., Picaud, S., Sekine, S., Ichijo, H., Engen, J. R., Takeda, K. and Knapp, S. Structures of PGAM5 provide insight into active site dynamics and multimeric assembly. **Structure**, 25, 1089-1099.e3 (2017). doi: 10.1016/j.str.2017.05.020
7. Naik, M.-U. Patel, P., Derstine, R., Turaga, R., Chen, X., Golla, K., Neeves, K.-B., Ichijo, H. and Naik, U.-K. Apoptosis signal-regulating kinase 1 regulates platelet granule secretion, thromboxane A2 generation, and thrombus formation in mice. **Blood**, 29, 1197-1209 (2017). doi:10.1182/blood-2016-07-729780
8. Imamura, K., Izumi, Y., Watanabe, A., Tsukita, K., Woltjen, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Kondo, T., Kitaoka, S., Ohta, A., Tanaka, A., Watanabe, D., Morita, M., Takuma, H., Tamaoka, A., Kunath, T., Wray, S., Furuya, H., Era, T., Makioka, K., Okamoto, K., Fujisawa, T., Nishitoh, H., Homma, K., Ichijo, H., Julien, J.-P., Obata, N., Hosokawa, M., Akiyama, H., Kaneko, S., Ayaki, T., Ito, H., Kaji, R., Takahashi, R., Yamanaka, S. and Inoue, H. iPSC-based drug repositioning identifies the Src/c-Abl pathway as a therapeutic target for ALS motor neurons. **Sci. Transl. Med.**, 9, pii: eaf3962 (2017). doi: 10.1126/scitranslmed.aaf3962.
9. Koizumi, S., Irie, T., Hirayama, S., Sakurai, Y., Yashiroda, H., Naguro, I., Ichijo, H., Hamazaki, J. and Murata, S. The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. **eLIFE**, 5, pii: e18357 (2016). doi: 10.7554/eLife.18357.
10. Hattori, K., Naguro, I., Okabe, K., Funatsu, T., Furutani, S., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK1 signaling regulates brown and beige adipocyte function. **Nat. Commun.**, 7:11158 (2016). doi: 10.1038/ncomms11158
11. Sekine, S., Yao, A., Hattori, K., Sugawara, S., Naguro, I., Koike, M., Uchiyama, Y., Takeda, K. and Ichijo, H. The ablation of mitochondrial protein phosphatase Pgam5 confers resistance against metabolic stress. **EBioMedicine**, 5, 82-92 (2016). doi: 10.1016/j.ebiom.2016.01.031

12. Maruyama, J., Kobayashi, Y., Umeda, T., Vandewalle, A., Takeda, K., Ichijo, H. and Naguro, I. Osmotic stress induces the phosphorylation of WNK4 Ser575 via the p38MAPK-MK pathway. **Sci. Rep.**, 60, 95-104 (2016). doi: 10.1038/srep18710
13. Fujisawa, T., Takahashi, M., Tsukamoto, Y., Yamaguchi, N., Nakoji, M., Endo, M., Kodaira, H., Hayashi, Y., Nishitoh, H., Naguro, I., Homma, K. and Ichijo, H. The ASK1-specific inhibitors K811 and K812 prolong survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Hum. Mol. Genet.**, 25, 245-253 (2016). doi: 10.1093/hmg/ddv467
- [review article]
14. Galluzzi, L., Vitale, I. et al. (the 72th in 169 people) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ.**, 25, 486-541 (2018). doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
15. Kamiyama, M., Naguro, I. and Ichijo, H. mASKing cancer cells in a tumor microenvironment. **Cell Cycle**, (commentary), 17, 139-140 (2018). doi: 10.1080/15384101.2017.1407402.
16. Hattori, K. and Ichijo, H. Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 in Regulated Necrosis. **Cell Cycle**, 17, 5-6 (2018). doi: 10.1080/15384101.2017.1397330.
17. Hayashi, Y., Homma, K. and Ichijo, H. SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. **Adv. Biol. Regul.**, 60, 95-104 (2016). doi: 10.1016/j.jbior.2015.10.006
18. Zhou, X., Naguro, I., Ichijo, H., Watanabe, K. Mitogen-activated protein kinases as key players in osmotic stress signaling. **Biochem. Biophys. Acta**, 1860, 2037-2052 (2016). doi: 10.1016/j.bbagen.2016.05.032
19. Tsubota, A., Ichijo, H., Homma, K. Mislocalization, aggregation formation and defect in proteolysis in ALS **AIMS Molecular Science**, 3, 246-268 (2016). doi: 10.3934/molsci.2016.2.246

[学会発表] (計 113 件, 内招待講演のみ記載)

1. Ichijo, H., Tsubota, A., Homma, K., Fujisawa, T., Physiological and pathophysiological roles of SOD1 under Zinc deficiency, ISZB 5th meeting, in collaboration with Zinc-Net, 2017.6.18-22, Pyla, Cyprus.

2. 一條秀憲, ストレスシグナルのメカニズム解明から創薬へ, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台市.
3. Ichijo, H., ASK family kinases in Stress Signaling and Cancer, The 15th KICancer Retreat, 2016.9.26-27, Stockholm, Sweden.

[図書] (計 1 件)

Ichijo, H. and Naguro, I. (Guest Editors), *Advances in Biological Regulation “ASK family kinases and stress response in physiology and pathology”* Elsevier, 総ページ数 90 (2017).

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一條 秀憲 (ICHIJO, Hidenori)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号 : 00242206