

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03180

研究課題名（和文）老化・疾病をもたらすミトコンドリア機能障害を鋭敏に捕らえる手法の開発

研究課題名（英文）Exploration of phenomena indicative of mitochondrial dysfunction and its applications

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア機能異常が老化や生活習慣病発症の引き金となることが示唆されている。しかしATP合成低下などのミトコンドリア機能異常を簡便に再現性良く評価する手法は見つかっていない。本研究ではミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼLONP1に着目し、LONP1はATP加水分解に依存して機能していること、その機能低下はミトコンドリアマトリクスでのタンパク質凝集体の蓄積を引き起こすことを明らかにした。このことから、タンパク質凝集体の蓄積がミトコンドリアマトリクス内のATP量の低下を伴うミトコンドリア機能異常の指標となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はミトコンドリア機能異常をタンパク質凝集体の蓄積を介して評価するというこれまでとは全く異なるミトコンドリア機能解析法の可能性を示したものである。また、LONP1の機能低下に伴うミトコンドリアマトリクスでのタンパク質凝集体の蓄積はLONP1の変異が引き起こす「脳・眼・歯・耳介・骨格症候群」でも観察され現象であり、本研究成果は「脳・眼・歯・耳介・骨格症候群」の病態解明にも寄与する。

研究成果の概要（英文）：It has been suggested that mitochondrial dysfunction triggers the onset of aging and lifestyle-related diseases. However, a simple and reproducible method to evaluate mitochondrial dysfunction such as decreased ATP synthesis has not been found. In this study, we focused on LONP1, a protease localized in the mitochondrial matrix, and found that LONP1 functions in a manner dependent on ATP hydrolysis and that its dysfunction causes the accumulation of protein aggregates in the mitochondrial matrix. This indicates that the accumulation of protein aggregates may be an indicator of abnormal mitochondrial function accompanied by a decrease in the amount of ATP 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 タンパク質凝集

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはクエン酸回路や 酸化など、細胞内で起こるさまざまな代謝の場であり、特に呼吸鎖複合体によるアデノシン三リン酸(ATP)の産生は細胞内のエネルギー供給に欠かせない重要な役割を果たしている。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異常が糖尿病、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。これらはミトコンドリア機能の異常がヒトにとってさまざまな悪影響を及ぼすことを意味し、ミトコンドリア機能の評価は診断をはじめ、病態や加齢の進行をモニターする上で有益な情報をもたらすことを示唆している。しかしミトコンドリア機能の評価するには筋肉組織塊など高い侵襲性を伴うサンプルが必要であることや、熟達を必要とする複雑な手技を要するため作業員間の値のばらつきが非常に大きいことなどから、一般的な検査のように多検体を再現性良く解析することは実質不可能な状態にある。ミトコンドリア機能異常時にはミトコンドリアでの ATP 合成は低下するが解糖系が亢進するため細胞や組織中の総 ATP 量は大きく変化しないと考えられており、ミトコンドリアを単離して ATP 量を直接測定しても単離過程で ATP が排出/漏出するためミトコンドリア機能を正確に反映し得ない。このような状況から、これまでとは異なるミトコンドリア機能異常の検出法が求められている。そこで、本研究ではミトコンドリア機能異常により引き起こされるミトコンドリアマトリクス内の ATP 量の低下により影響を受けると考えられる ATP 依存性プロテアーゼ LONP1 に着目した。

LONP1 はバクテリアからヒトまで広く保持されている樽型の多量体として機能するプロテアーゼで、これまでの研究から LONP1 は単なるプロテアーゼとしてだけではなく ATPase 活性を介したシャペロン様機能を持つ可能性が示唆されている。LONP1 は 6 量体として機能しており、CODAS 症候群 (Cerebral, Ocular, Dental, Auricular, Skeletal anomalies : 脳・眼・歯・耳介・骨格症候群) の原因遺伝子であることが明らかにされている。CODAS 症候群の患者由来細胞では、ミトコンドリアマトリクス内にタンパク質凝集体が蓄積することが示されており、この現象は LONP1 の機能異常によって引き起こされると考えられているが、この凝集体蓄積のメカニズムは不明であった。また、LONP1 はミトコンドリアマトリクス内の ATP をエネルギーとして機能することから、LONP1 の機能がミトコンドリア機能異常に伴うマトリクス内の ATP 濃度を反映している可能性があるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的を以下に示す。

- (1) CODAS 症候群の患者由来細胞では、ミトコンドリアマトリクス内にタンパク質凝集体が蓄積するが、このタンパク質凝集体蓄積のメカニズムを明らかにすること。
- (2) タンパク質凝集体の蓄積が LONP1 の ATP 加水分解に依存しているかどうかを明らかにすること。
- (3) ミトコンドリアマトリクス内の ATP 量の低下と LONP1 機能低下によるタンパク質凝集体の蓄積との関係性の解析すること。

### 3. 研究の方法

本研究ではヒト培養細胞(HeLa 細胞及び HEK293 細胞)を用いて研究を行った。

LONP1 に対する遺伝子ノックダウン法及び ATPase 活性不活化変異体や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 LONP1 の機能を阻害させた細胞を実験に用いた。

各細胞や単離したミトコンドリアを可溶性画分と不溶性画分 (= 凝集体) に分離し解析を行った (図 1)。

### 4. 研究成果

LONP1 をノックダウンした培養細胞 (HeLa 細胞や HEK293 細胞) 及びその細胞から単離したミトコンドリアを図 1 に示した方法により可溶性画分と不溶性画分 (= 凝集体) に分離し解析したところ、LONP1 をノックダウンした細胞ではミトコンドリアマトリクスに同存在する特定のタンパク質が不溶化 (= 凝集) することが明らかとなった(図 2)。また HEK293 細胞や HepG2 細胞などの他の培養細胞を用いて同様の実験を行い得られた凝集タンパク質の比較を行ったところ、HeLa 細胞の場合とほぼ同じタンパク質が凝集す

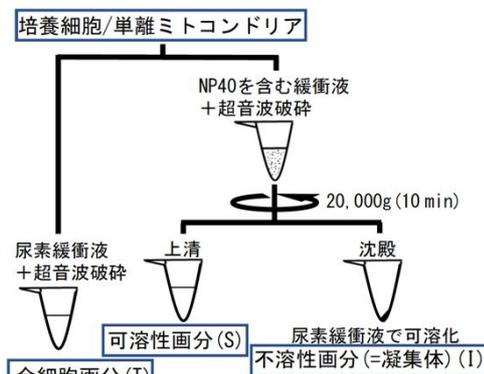


図 1 タンパク質凝集体分離方法

ることが明らかになった。この凝集タンパク質の中にはミトコンドリアリポソームタンパク質などのミトコンドリア翻訳関連因子、ミトコンドリア呼吸鎖複合体のサブユニット、ミトコンドリアシャペロンなどのタンパク質が含まれていたが、この凝集に伴いそれらの可溶性タンパク質が著しく減少することが明らかとなった(図3)。もし“プロテアーゼ”LONP1の枯渇によって単純に特定のタンパク質の分解が抑制された結果としてタンパク質凝集体が生じるのであればそれらの可溶性タンパク質量には直接大きな影響を与えないと考えられるため、単にLONP1の

“プロテアーゼ活性”以外の機能が抑制された結果としてタンパク質凝集体が生じたのではないかと考えられた。また、前述の通りこれらのタンパク質凝集体にはミトコンドリアマトリクスに局在するシャペロンタンパク質が複数含まれていたが、これらシャペロンタンパク質をノックダウンにより枯渇させてもタンパク質凝集体は生じなかった(図4)。また複数のシャペロンタンパク質を同時にノックダウンした場合でもタンパク質凝集体は生じなかったため、可溶性シャペロンタンパク質の減少がこの凝集体形成の主な原因ではないと考えられた(図4)。

興味深いことに、マトリクスへのタンパク質輸送に関わるシャペロンタンパク質(mtHSP70)とLONP1とを同時にノックダウンすると凝集体の形成が著しく減少した(図4)。さらに、マトリクスへのタンパク質輸送に関わる他の因子(TIMM44、TOMM40、図5)とLONP1を同時にノックダウンした場合でも凝集体の形成が著しく減少した。これらの結果から、LONP1枯渇による凝集体の形成には、ミトコンドリアマトリクスへのタンパク質輸送が関わっていることが示唆された。

次に、LONP1の野生型、ATPase不活性型(K529A)、プロテアーゼ不活性型(S855A)を発現するHEK293細胞株を樹立し、各細胞株のミトコンドリア凝集タンパク質の解析を行った。LONP1は6量体として機能するため、変異体を過剰発現させるとドミナントネガティブ効果を示す。興味深いことに、ATPase不活性型を過剰発現させると凝集体が生じるのに対し、プロテアーゼ不活性型の過剰発現では凝集体はほとんど生じなかった。さらにこの条件下で内在性LONP1を選択的にノックダウンした場合でも同様の結果であった(図6)。この結果は、LONP1の凝集体形成抑制機能はATP加水分解活性に依存していることを示しており、またLONP1の機能低下に伴う凝集体形成の主な原因はマトリクス移行後に「古くなった」又は「傷ついた」タンパク質がLONP1によって分解されなくなるのではなく、LONP1の持つATP加水分解活性に依存したシャペロン様活性の低下であることが示唆

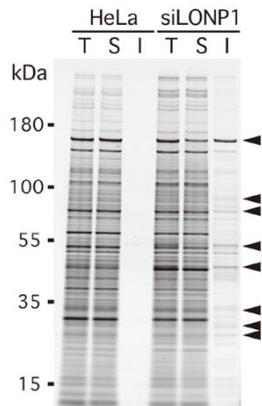


図2 ミトコンドリアタンパク質のゲル染色像。LONP1ノックダウンHeLa細胞からミトコンドリアを単離し、全ミトコンドリア(T)、可溶性(S)、不溶性(I)の各タンパク質を電気泳動後染色した。典型的な不溶性タンパク質を矢頭で示した。

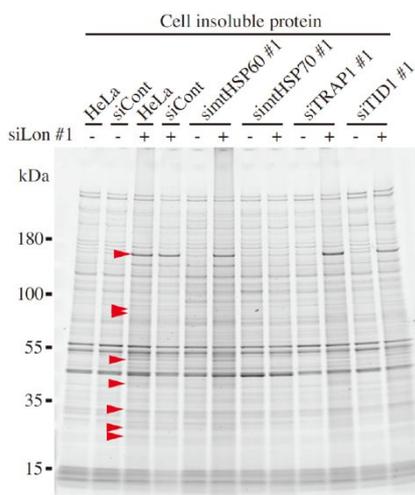


図4 LONP1及びミトコンドリアシャペロンタンパク質に対するノックダウン細胞から得た凝集タンパク質のゲル染色像。各細胞の不溶性タンパク質を電気泳動後染色した。LONP1ノックダウンによって生じる典型的な不溶性タンパク質を矢頭で示した。

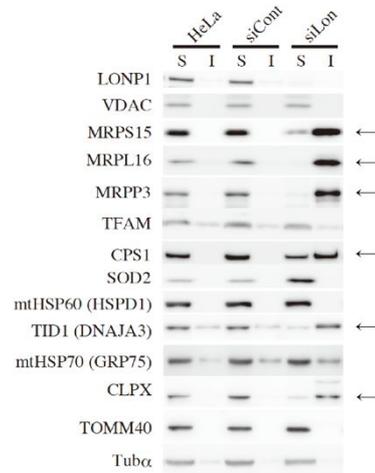


図3 LONP1ノックダウンHeLa細胞から得た可溶性(S)及び不溶性(I)タンパク質を用いミトコンドリアマトリクスタンパク質に対するウエスタンブロット解析を行った。タンパク質が凝集し可溶性タンパク質が減少したものを矢印で示した。

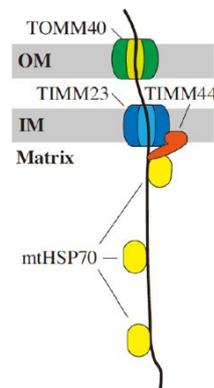


図5 マトリクスへのタンパク質輸送モデル。輸送には、mtHSP70の他に、TIMM44、TIMM23、TOMM40などが必要である。

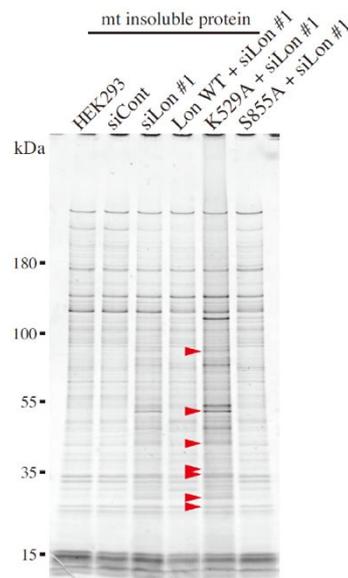


図6 内在性LONP1を選択的にノックダウンしたLONP1野生型、ATPase不活性型(K529A)、プロテアーゼ不活性型(S855A)発現細胞株から得た不溶性タンパク質の比較。LONP1ノックダウンやATPase不活性型の発現によって生じる典型的な不溶性タンパク質を矢頭で示した。

された。

次に LONP1 枯渇細胞で凝集するミトコンドリアタンパク質は、マトリクス移行後どのようなタイミングで凝集体が生じるかを調べた。LONP1 を枯渇させた細胞にミトコンドリア移行シグナルを付加した外来タンパク質を発現させ解析した。すると、タンパク質発現直後のタイミングでもその多くが既にミトコンドリアマトリクスで凝集していること、タンパク質の半減期よりも遥かに短い時間でその大半が不溶化することが判明した。さらに、LONP1 枯渇細胞から単離したミトコンドリアと合成したミトコンドリアタンパク質を用いて *in vitro* で行ったミトコンドリア輸送実験でも、マトリクス移行後に極めて短時間で不

溶化することが確認された(図7)。さらに、免疫沈降実験の結果からミトコンドリアマトリクス輸送複合体が LONP1 と共沈することが確認された。これらのことは輸送中のタンパク質を介して LONP1 と輸送複合体が会合していることを示しており、LONP1 はそのシャペロン様活性を介してマトリクス移行後に特定のタンパク質が正しい構造を取ることをアシストしている可能性が示唆された(図9)。

また、LONP1 ノックダウン細胞では、いくつかのタンパク質でミトコンドリア移行シグナルが未切断のものが観察された。LONP1 枯渇細胞ではミトコンドリア移行シグナル切断酵素が凝集し可溶性酵素が減少していたが、この切断酵素を単独で枯渇させても未切断のものは観察されなかった。しかし、LONP1 と切断酵素を共に枯渇させると未切断のものが多く検出された。以上の結果から、LONP1 はそのプロテアーゼ活性によりミトコンドリア移行シグナル未切断の不良タンパク質を特異的に分解していると考えられた(図8、図9)。

以上のように LONP1 は特定の新規輸送タンパク質の可溶性に寄与する一方で、新規にミトコンドリアマトリクスに輸送された不良タンパク質の分解にも寄与することから、LONP1 は特定の新規輸送タンパク質にとって“門番”の役割を果たしていることを示した(図9)。しかし、LONP1 機

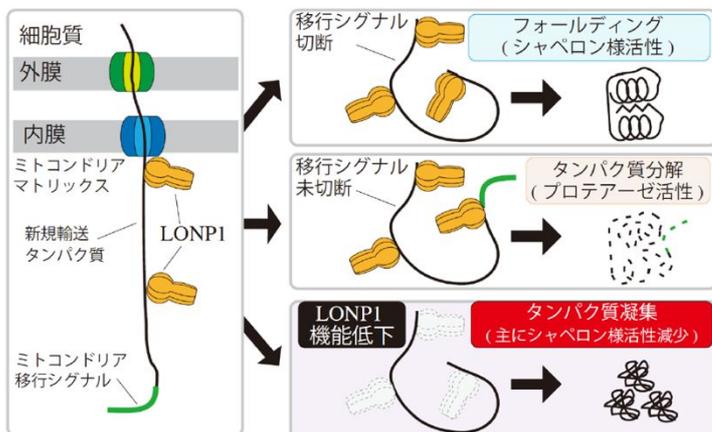


図9 新規にミトコンドリアマトリクスに輸送された特定のタンパク質は“門番”であるLONP1のフォールディング機能によって正しいフォールディングが行われる。またLONP1はミトコンドリア移行シグナルが切断されなかった新規輸送タンパク質の分解も行っている。LONP1機能低下細胞では一部のミトコンドリアマトリクスタンパク質が不溶化するが、これは主にフォールディング機能が失われることに起因している。このフォールディング機能にはミトコンドリアマトリクスのATPが必要である。

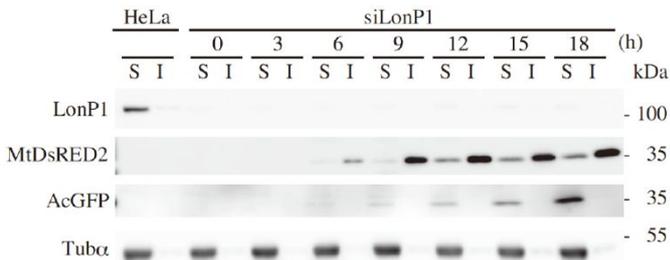


図7 LONP1ノックダウン細胞にミトコンドリアマトリクス移行型MtDsRED2と細胞質移行型AcGFPを発現するベクターをトランスフェクションし一過的に発現させた。トランスフェクション後の各時間ごとに細胞を回収し、それらから得た可溶性(S)、不溶性(I)の各タンパク質を用いてウエスタンブロット解析を行った。トランスフェクション後6時間でMtDsRED2が検出されるが、その殆どは不溶性画分(=凝集)に移行していた。一方、細胞質移行型AcGFPは可溶性画分でのみ検出された。このことは、タンパク質発現直後のタイミングでもMtDsRED2の多くがミトコンドリアマトリクスで凝集していることを示している。

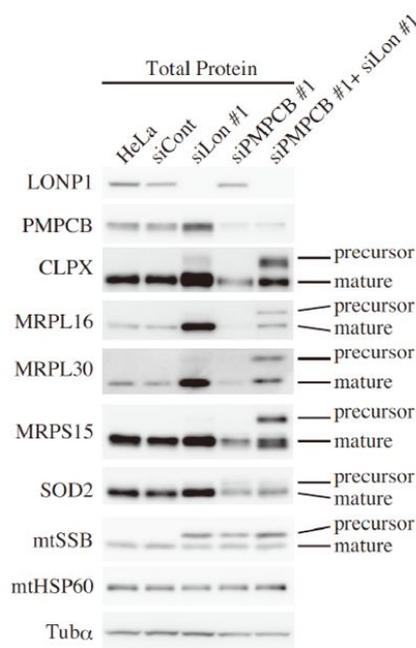


図8 LONP1及びミトコンドリア移行シグナル切断酵素PMPCBをノックダウン HeLa細胞から得た全細胞画分を用いウエスタンブロット解析。PMPCB単独のノックダウンではほとんど検出されないミトコンドリア移行シグナル未切断 (precursor) のものが、LONP1とのダブルノックダウンでは強く検出された。このことは、ミトコンドリア移行シグナルが切断されない不良タンパク質をLONP1が分解していることを示している。

能低下によるタンパク質凝集体の蓄積がミトコンドリアマトリクス内の ATP 量の低下の指標となりうるかについては本研究の研究期間までに結論を得ることができなかったため、今後の課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsushima Yuichi, Takahashi Kazuya, Yue Song, Fujiyoshi Yuki, Yoshioka Hideaki, Aihara Masamune, Setoyama Daiki, Uchiumi Takeshi, Fukuchi Satoshi, Kang Dongchon	4. 巻 4
2. 論文標題 Mitochondrial Lon protease is a gatekeeper for proteins newly imported into the matrix	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02498-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsushima Yuichi	4. 巻 2281
2. 論文標題 Selective Suppression of Endogenous Gene Expression Using RNAi in Schneider S2 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol .	6. 最初と最後の頁 303 ~ 312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1290-3_19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松島雄一	4. 巻 80(2)
2. 論文標題 ミトコンドリアプロテアーゼLONP1の機能低下に伴うタンパク質凝集体の生成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 126-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松島雄一
2. 発表標題 ミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼLonによるタンパク質の可溶性制御
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松島雄一
2. 発表標題 ミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼLonによるタンパク質の可溶性制御
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuichi Matsushima
2. 発表標題 Mitochondrial Lon protease is a gatekeeper for proteins newly imported into the matrix.
3. 学会等名 Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine and The 19th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀬戸山 大樹  (Setoyama Daiki)  (30550850)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	
研究分担者	相原 正宗  (Aihara Masamune)  (30748843)	九州大学・大学病院・臨床検査技師   (17102)	
研究分担者	内海 健  (Uchiumi Takesi)  (80253798)	九州大学・医学研究院・教授   (17102)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------