

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06910

研究課題名(和文)ミトコンドリアストレス応答におけるGCN1L1の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of GCN1L1 in mitochondrial stress response

研究代表者

葛西 秋宅 (Kasai, Shuya)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：20609664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物で広く保存されるリボソーム結合タンパク質Gcn1はアミノ酸飢餓に応答した翻訳抑制およびアミノ酸合成促進に必須の分子である。Gcn1ノックアウトマウスは胎生期の成長遅延により致死となることから、本研究ではタモキシフェン誘導性CreおよびGcn1 floxマウスを用いて、成獣での条件付きGcn1ノックアウトマウスを作製して表現型を解析した。その結果、タモキシフェン投与による顕著な体重減少を示し、血糖値の低下と肝臓脂肪および白色脂肪組織の減少が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類におけるGcn1はアミノ酸飢餓応答だけでなく、非飢餓状態においても細胞周期の進行や胎児期での成長にも関わることを明らかにしたが、その分子機構は不明である。本研究では成獣マウスにおけるGcn1のノックアウトにより、Gcn1がタモキシフェン毒性による異化代謝亢進を抑制している可能性が示唆された。近年、ミトコンドリア脱共役剤であるBAM15によっても同様の現象が報告されており、Gcn1がミトコンドリア機能維持に関わる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gcn1 is ribosome binding protein which mediates translational attenuation and amino acid synthesis in response to amino acid starvation. Since Gcn1 knockout mice show embryonic growth retardation and lethality, current study analyzed the phenotype of conditional Gcn1 knockout (CKO) mice employing tamoxifen-inducible Cre and Gcn1 flox mice. Gcn1 CKO mice generated by tamoxifen administration showed decrease in the body weight and accompanying decreases in blood glucose, liver weight and lipid content, and white adipose tissue weight. These data implicates Gcn1 is involved in resistance to tamoxifen toxicity and metabolic homeostasis.

研究分野：分子生物学

キーワード：Gcn1 アミノ酸飢餓応答 統合的ストレス応答 タモキシフェン 体重減少

1. 研究開始当初の背景

リボソーム結合タンパク質 *Gcn1* はアミノ酸飢餓に応答した翻訳抑制とアミノ酸合成促進の誘導に必須の分子である。*Gcn1* と結合するプロテインキナーゼ *Gcn2* はアミノアシル化されていない tRNA と結合することで翻訳開始因子 eIF2 α をリン酸化し、翻訳を抑制する。一方、転写因子である ATF4 は mRNA 上流にコードされる ORF がスキップされることで翻訳が促進され、アミノ酸合成酵素やトランスポーターの発現を誘導する。eIF2 α -ATF4 経路はミトコンドリア異常によっても活性化し、ミトコンドリアの酸化還元状態の維持やグルタチオン合成を促進する報告がある。この経路の活性化には *Gcn2* に加え、PERK や HRI といった他の eIF2 α キナーゼの関与が報告されているが、これらの経路がいかんしてミトコンドリア異常を認識し活性化しているか不明であった。

また、*Gcn1* ノックアウトマウスは胎児期の成長遅延により致死となるが、*Gcn2* ノックアウト (KO) マウスは通常飼育下では出生や成長に異常は見られない。これらの表現型の違いから、*Gcn1* は *Gcn2* 活性化のほか *Gcn2* と独立した経路を介して個体の成長を制御している可能性が見出された。

2. 研究の目的

申請者はミトコンドリアストレス応答経路における *Gcn1* の役割を明らかにするため、下記の2点を目的に研究を行った。

(1) 培養細胞を用いてミトコンドリアストレスに応答した ATF4 活性化経路において *Gcn1* の機能を明らかにする。

(2) タモキシフェン誘導性 Cre による成獣での *Gcn1* 条件付きノックアウト (CKO) マウスを作製し、表現型を明らかにする。*Gcn1* CKO マウスにおいて表現型に違いが見られない場合、ミトコンドリアストレス誘導剤を投与し感受性を比較する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリアストレスに応答した ATF4 活性化経路における *Gcn1* の機能については、ヒト一倍体白血病細胞株 HAP1 の野生型細胞および *GCN1* KO 細胞を用いて、ミトコンドリアの翻訳阻害剤 Doxycycline および ATP 合成酵素阻害剤 Oligomycin による ATF4 活性化を評価した。

(2) タモキシフェン誘導性 Cre による成獣での *Gcn1* CKO マウスを作成するため、*Rosa26-CreERT2* Tg マウスおよび *Gcn1* exon 2 floxed マウスを交配し、6 週齢でタモキシフェンの腹腔内投与により各組織での *Gcn1* ノックアウト効率を評価した。また、体重および各臓器の重量変化、組織学的解析および生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) HAP1 細胞におけるミトコンドリアストレス応答について、Doxycycline および Oligomycin 処理により ATF4 の標的遺伝子であるアスパラギン合成酵素 (ASNS) の発現誘導を RT-qPCR により解析した。アミノ酸飢餓を誘導する Histidinol 処理では *Gcn1* 依存的な ASNS の発現誘導が確認できた。Doxycycline による ASNS 誘導は *GCN1* KO 細胞で低下する結果が得られた (図 1)。GCN2 活性化による自己リン酸化および eIF2 α のリン酸化をウェスタンブロットで検出した結果、*GCN1* KO では Histidinol によるリン酸化が抑制される一方で、Doxycycline 処理では *Gcn2* 自己リン酸化の抑制が見られたものの、eIF2 α リン酸化の低下は部分的であり、ASNS mRNA の結果と一致する結果であった (図 2)。しかしながら、これらの結果は継代が進むと Doxycycline による ASNS 誘導に差は見られず、限られた条件でしか再現できなかった。原因は不明であるものの Doxycycline 処理による誘導が部分的であることを考えると、GCN2 および別の eIF2 α キナーゼを介して活性化シグナルが補完されている可能性が考えられた。

通常の高グルコース培地に対して、グルコースをガラクトースに置換しグルタミン濃度を上げた OxPhos 培地を用いて、ミトコンドリア呼吸を促進する培養条件で 3 日間培養したところ、

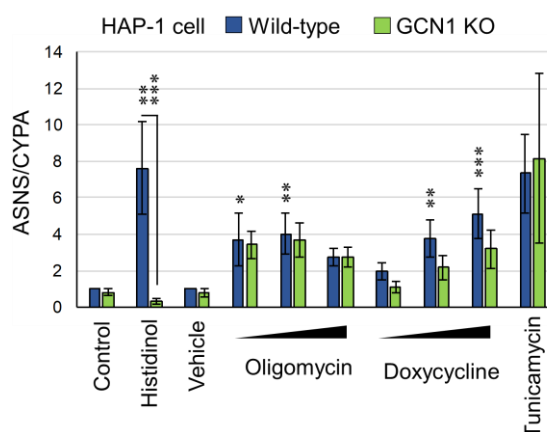


図1. HAP1細胞におけるGCN1依存的なASNS遺伝子発現誘導

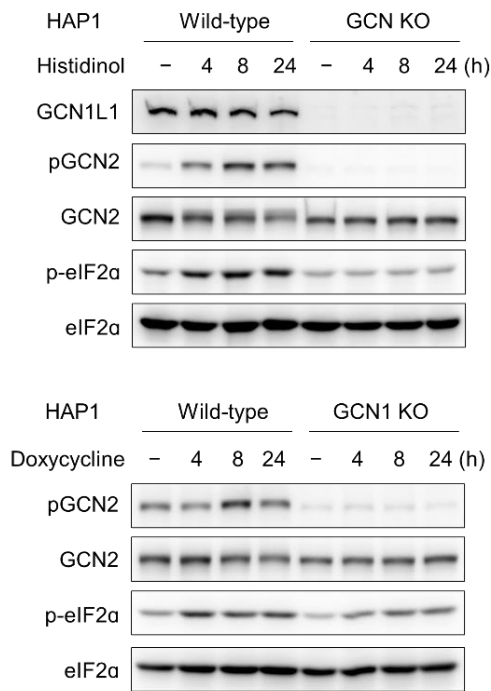


図2. アミノ酸飢餓およびミトコンドリアストレスによるGCN2-eIF2 α 経路の活性化

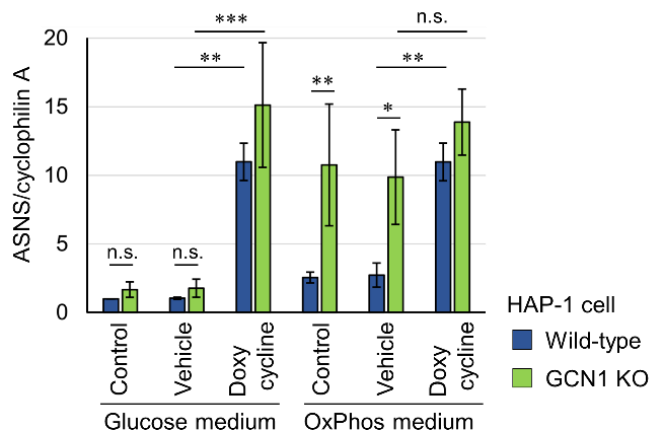


図3. OxPhos培地によるASNS発現誘導

Gcn1 KO 細胞において有意な ASNS の発現誘導が見られた(図 3)。予備的に行ったタイムコースの結果では野生型の細胞でも一過的に ASNS の誘導が見られた後にほぼ通常培地と同程度に低下する一方、*Gcn1* KO 細胞では誘導が持続し、ミトコンドリア呼吸促進によるストレスに応答する機構に *Gcn1* が関わる可能性が示唆された。

(2) タモキシフェン誘導性 *Gcn1* CKO マウスを作成し、野生型およびコントロールとして *CreERT2* なしのマウスにタモキシフェンを投与して、各臓器の *Gcn1* 発現を比較した。野生型での *Gcn1* 発現は精巣に続いて肝臓、膵臓、小腸で高く、心臓および骨格筋では発現が低かった(図 4)。無処理の野生型 (WT)、タモキシフェン最終投与から 2 日後の *Gcn1* flox マウス (NC) および *Gcn1* flox::*CreERT2* マウス (CKO) の各臓器での *Gcn1* 発現を評価した結果、肝臓や腸管での発現が顕著に見られた(図 5)。また、*Rosa26-CreERT2* は脳でほとんど発現しないという既報通り、脳では *Gcn1* 発現低下は認められなかった。

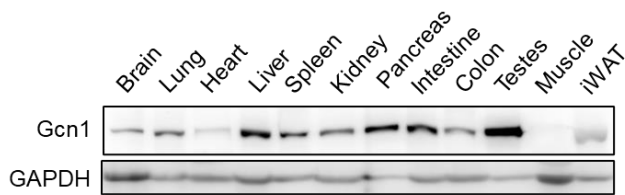


図4. 野生型マウスの各臓器におけるGcn1の発現

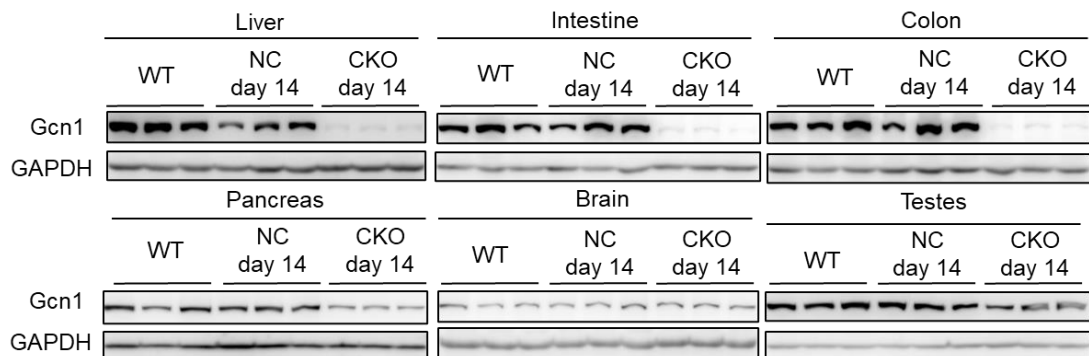


図5. タモキシフェン誘導性*Gcn1*条件付きノックアウト (CKO) におけるGcn1発現低下

Gcn1 CKO マウスではタモキシフェン投与後、有意な体重減少が見られ、コントロールとしてタモキシフェンを投与した *Gcn1* flox マウスや CreERT2 マウスでは有意な体重減少は見られなかった (図6)。また、*Gcn1* CKO マウスにおいて食餌や水の摂取の減少は見られなかった。

各組織の重量を測定したところ、肝臓および白色脂肪組織の低下が見られた。血清を用いた生化学検査では肝障害マーカーである AST および ALT の上昇が見られたが有意ではなく、HE 染色でも形態的な異常は見られなかった。また、PAS 染色および定量キットによりグリコーゲン量を解析したものの、コントロールと CKO でグリコーゲンの減少に差は見られなかった。また Oil Red O 染色による肝臓での脂肪滴を検出したところ、有意な低下が認められた (図7)。

タモキシフェンはエストロゲン受容体のアゴニストおよびアンタゴニストとしての作用のほか、ミトコンドリア DNA の減少や呼吸鎖複合体の阻害、脱共役作用の報告がある。肝臓におけるミトコンドリア DNA コピー数および ATP 濃度を測定したが、いずれも差が見られなかったほか、COX-SDH 活性染色も行ったが異常は認められなかった。生体内での脱共役作用は直接解析できないため、今後生体および初代培養細胞を用いた酸素消費速度の解析を行う必要がある。

LC-MS により血中タモキシフェンおよびその代謝物の濃度を測定した結果、*Gcn1* CKO マウスでエンドキシフェンの低下が見られたものの、他の代謝物は同程度であったことから、*Gcn1* CKO マウスはタモキシフェンおよび代謝物の濃度が高いために毒性が見られた可能性は否定された。*Gcn1* CKO マウスの体重減少が *Gcn1* 欠失単独の効果か、*Gcn1* 欠失とタモキシフェン毒性の複合的な効果か明らかにするため、*Gcn1* CKO マウスを作製し1ヶ月後に再度タモキシフェンまたは溶媒を投与し体重変化を測定した。その結果、*Gcn1* CKO マウスにタモキシフェンを投与した場合のみ体重減少が見られ、*Gcn1* の欠失によってタモキシフェン感受性になっていることが示された。

興味深いことにミトコンドリア脱共役剤である BAM15 を投与による肥満抑制の報告でも摂食行動に影響せず体重減少および白色脂肪組織の減少、および肝臓における脂肪低下と脂肪酸代謝の亢進が報告されており、タモキシフェンによる脱共役作用が *Gcn1* CKO マウスで見えている可能性がある。また、*Gcn1* KO マウス由来の線維芽細胞では細胞増殖が低下することから、腸管上皮細胞を含めた細胞増殖への影響および栄養素の消化吸収についても解析し論文にまとめる。

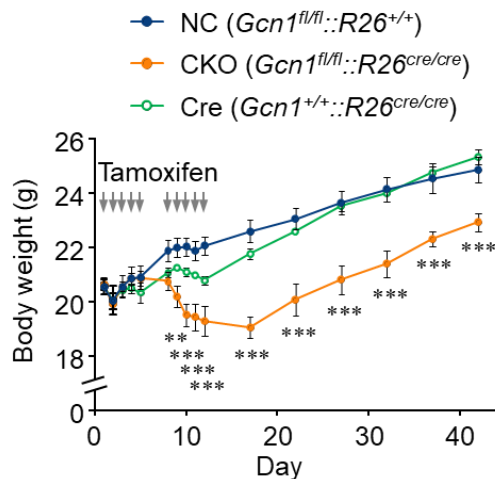


図6. *Gcn1* CKOマウスの体重変化

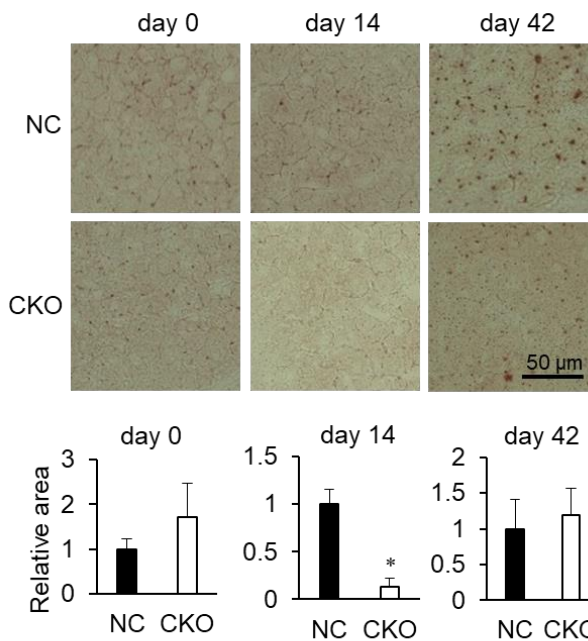


図7. *Gcn1* CKOマウスにおける肝臓脂肪の低下

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamazaki H, Kasai S, Mimura J, Ye P, Inose-Maruyama A, Tanji K, Wakabayashi K, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Sato T, Ozaki T, Cavener DR, Yamamoto M, Itoh K	4. 巻 16
2. 論文標題 Ribosome binding protein GNC1 regulates the cell cycle and cell proliferation and is essential for the embryonic development of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PloS Genet.	6. 最初と最後の頁 e1008693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008693	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 該当する

1. 著者名 Kasai Shuya, Yamazaki Hiromi, Tanji Kunikazu, Engler M? J?nos, Matsumiya Tomoh, Itoh Ken	4. 巻 64
2. 論文標題 Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcfn.18-37	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shuya Kasai, Hiromi Yamazaki, Junsei Mimura, Peng Ye, Atsushi Inose-Maruyama, Ken Itoh
2. 発表標題 Ribosome binding protein GCN1L1 knockout mice exhibit embryonic lethality with growth retardation and reduced cell proliferation
3. 学会等名 9th Biennial Meeting for the Society for Free Radical Research Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Liu, Shuya Kasai, Hiromi Yamazaki, Junsei Mimura, Ken Itoh
2. 発表標題 Body weight loss in postnatal GCN1L1 knockout mice
3. 学会等名 第1回弘前メディカルサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuya Kasai, Ken Itoh
2. 発表標題 Involvement of GCN1L1-GCN2 in mitochondrial dysfunction-induced ATF4 activation
3. 学会等名 Keystone symposia, Mitochondrial Biology in Heart and Skeletal Muscle (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛西秋宅、山崎博未、三村純正、伊東健
2. 発表標題 ミトコンドリアストレスによるATF4活性化とGCN1L1-GCN2経路の関与
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 葛西秋宅、山崎博未、三村純正、伊東健
2. 発表標題 ATF4を介したミトコンドリアストレス応答経路におけるGCN1L1-GCN2経路の関与
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会、第18回日本N0学会 合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎博未、葛西秋宅、三村純正、伊東健
2. 発表標題 リボゾーム結合因子 GCN1L1 による DRG2 を介した細胞増殖制御機構
3. 学会等名 平成30年度生理学研究所研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 葛西 秋宅、劉 君、山崎 博未、三村 純正、伊東 健
2. 発表標題 Ribosome binding protein Gcn1 knockout mice exhibit embryonic lethality with growth retardation
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
連携研究者	伊東 健 (ITO Ken) (10323289)	弘前大学・大学院医学研究科・教授 (11101)	
連携研究者	三村 純正 (MIMURA Junsei) (60344884)	弘前大学・大学院医学研究科・講師 (11101)	
連携研究者	山崎 博未 (YAMAZAKI Hiromi) (20720915)	弘前大学・大学院医学研究科・助教 (11101)	

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
---------	---------