

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07045

研究課題名(和文)小胞体膜タンパク質BAP31が制御するミトコンドリア機能と神経障害の関連性の解明

研究課題名(英文) Mitochondrial function regulated by the endoplasmic reticulum membrane protein BAP31 is associated with neurological disorders.

研究代表者

難波 卓司 (Namba, Takushi)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・准教授

研究者番号：10729859

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)：小胞体膜タンパク質BAP31がミトコンドリア膜タンパク質Tom40と小胞体-ミトコンドリア接触領域で相互作用し、特定のミトコンドリアタンパク質のミトコンドリア内への輸送を促進することでミトコンドリアの恒常性維持をおこなっている。さらに、BAP31-Tom40複合体はストレスによりその相互作用を解消して、ミトコンドリアタンパク質の輸送をストップすることでミトコンドリアの活性調整をおこなっていることを明らかにした。本研究により小胞体により新たなミトコンドリアの恒常性維持機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体やミトコンドリアの正常な機能は私たちの健康を維持するために重要である。本研究により、小胞体とミトコンドリアがストレスに反応してどのように機能を超しているのか、どのように機能が破綻していくのかについてのメカニズムの一端が明らかになった。この成果をもとに新たな創薬のターゲットが見つかることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum membrane protein BAP31 interacts with the mitochondrial membrane protein Tom40 in the endoplasmic reticulum-mitochondria contact site to promote the transport of specific mitochondrial proteins into the mitochondria to maintain mitochondrial homeostasis. Furthermore, the BAP31-Tom40 complex dissociates upon stress and regulates mitochondrial activity by stopping the transport of mitochondrial proteins. This study reveals a new mechanism of mitochondrial homeostasis by the endoplasmic reticulum.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 小胞体 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの恒常性の破綻は神経障害など様々な疾患に関与することが明らかになり、その破綻を制御する機構を解明することは疾患の新たな治療ターゲットの発見に重要である。近年の細胞イメージングや顕微鏡の技術発展により小胞体は種々のオルガネラと物理的に接触していることが分かってきた。特に小胞体とミトコンドリアの接触領域では Ca^{2+} の受け渡し、ミトコンドリアの分割や脂質の交換など様々な生命現象が起きていることが報告され、情報伝達のハブとしての機能解明が期待されている。代表的な例として Mitofusin2 は小胞体とミトコンドリアに局在するタンパク質で、このタンパク質が結合することでミトコンドリアと小胞体の接触を維持し、互いの Ca^{2+} 濃度を維持している (Bito OM et al., Nature, 2008) IP3R と VDAC はともに Ca^{2+} トランスポーターであり、GRP75 によりお互いが接近し、効率的な Ca^{2+} のやり取りを行っている (Szabadkai et al., J Cell Biol, 2006)。 Drp 1 を介した小胞体とミトコンドリアの接触面からミトコンドリアの分割が誘導される (Friedman JR et al., Science, 2011)。このように小胞体とミトコンドリアの接触領域を介した小胞体とミトコンドリアのシグナル交換はお互いの恒常性維持に重要な役割をはたしていることが考えられ、オルガネラコミュニケーションに関する研究は新たな研究分野として大きく飛躍することが期待されている。

一方我々はこれまでに核のストレス状態により活性化する p53 により小胞体の機能調整が行なわれ、そのシグナルがミトコンドリアに伝達されること (Namba T et al., Oncotarget. 2015)、小胞体膜タンパク質 BAP31 がミトコンドリアに局在するタンパク質と相互作用して、アポトーシスのシグナルを小胞体からミトコンドリアへ伝達することでミトコンドリア経路を介したアポトーシスの誘導経路を活性化させることを発見した (Namba T et al., Cell reports. 2013)。しかしながら BAP31 がミトコンドリアの機能を調整するメカニズムの全容は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、BAP31 が相互作用するミトコンドリアタンパク質に注目してより詳細な BAP31 の機能解析を行い、小胞体とミトコンドリアのクロストークを介したミトコンドリアの機能調整機構を解明することを目的とする。

現在、小胞体とミトコンドリアの情報交換機構とその意義については急速に解析が進んでおり、本研究は小胞体膜タンパク質がミトコンドリアの呼吸活性を調整しているという新たな小胞体-ミトコンドリア接触領域の機能を明らかにできる可能性がある。一方、これまで核でコードされているミトコンドリアタンパク質が細胞質から TOM 複合体に受け渡されるメカニズムは不明であった。本研究結果より BAP31 が核でコードされているミトコンドリアタンパク質の細胞質から TOM 複合体への移行を促進していることが明らかになれば、核でコードされているミトコンドリアタンパク質のミトコンドリアへの移行メカニズムの全容が明らかになる。加えて実験動物を用いて BAP31 の機能を解析することで、末梢神経障害の発症や進行のメカニズムを理解することができ、本研究から新たな治療薬のターゲット発見が期待される。

3. 研究の方法

遺伝子のノックアウトには CRISPER-Cas9 システムを使用した。タンパク質の発現解析はウエスタンブロット法と p-PCR 法で調べた。タンパク質の相互作用については免疫沈降法とそれぞれの特異的な抗体を用いた細胞免疫染色による Duolink 法を使用した。ミトコンドリアの活性については mitotracker による形態解析、ATP の測定、ミトコンドリアの酸素消費量測定は MitoXpress Xtra-Oxygen Consumption assay kit を用いた。タンパク質の細胞内局在はパーコールを用いたグラジエント超遠心により検討した。

4. 研究成果

まず BAP31 の機能を解析するために、CRISPER-Cas9 システムを使用して BAP31 ノックアウト細胞を樹立した。この細胞を電子顕微鏡により詳細に観察したところ、細胞内でオートファジーが誘導されていること、およびミトコンドリアの構造に異常があることが示唆された。そこで、mitotracker を使用してミトコンドリアの形を検討したところ、BAP31 のノックアウトによりミトコンドリアの長さが短くなり、ATP 産生が減少していることから、ミトコンドリアの機能が障害されていることが示唆された。そこで BAP31 のノックアウトにより ATP 産生を

担うミトコンドリアの呼吸活性が減弱しているかを MitoXpress Xtra-Oxygen Consumption assay kit を用いて検討すると、BAP31 のノックアウトによりミトコンドリアでの酸素消費が減少していること、さらにこれは呼吸鎖 complex I の活性が減少していることが明らかになった。以上のことから小胞体膜タンパク質である BAP31 はミトコンドリア機能の恒常性を維持するために重要な機能を果たしていることが示唆された。次にミトコンドリアの品質が低下しているかを検討するためにマイトファージの誘導を調べたところ、マイトファジーよりもオートファジーが強く誘導され、これは細胞内 ATP の減少により活性化する AMPK 経路により誘導されることが示唆された。

次になぜ BAP31 がミトコンドリアの機能を制御しているかを解明するために、網羅的に BAP31 と結合するタンパク質を探索した結果、BAP31 はミトコンドリアに局在する NADH コピキノン酸化還元酵素 18kDa サブユニット(NDUFS4)と Translocase of outer mitochondrial membrane 40(Tom40)と相互作用する可能性が示唆された。これらの相互作用が生理学的条件下でも存在していることを免疫沈降法、およびそれぞれの特異的な抗体を用いた細胞免疫染色による Duolink 法を用いて確認した。

NDUFS4 は核でコードされ、細胞質を経てミトコンドリア外膜上で Tom40 が構成する TOM 複合体を通り抜けてミトコンドリア内腔へ移行し、呼吸鎖 Complex I に組み込まれる。そこで BAP31-Tom40 複合体が NDUFS4 のミトコンドリア内腔への移行を促進しているかを検討した。まず、細胞質、小胞体、ミトコンドリア、小胞体-ミトコンドリア接触領域に細胞分画を行わない BAP31、Tom40 と NDUFS4 の細胞内局在を検討したところ、正常な細胞では BAP31、Tom40 と NDUFS4 は小胞体-ミトコンドリア接触領域に局在して、加えて BAP31 は小胞体、Tom40 と NDUFS4 はミトコンドリアに局在していた。そこで BAP31 ノックアウト細胞においてそれぞれの局在を調べたところ、NDUFS4 の小胞体-ミトコンドリア接触領域とミトコンドリアでの局在が減少していることが分かった。以上の結果から BAP31、NDUFS4 と Tom40 が小胞体-ミトコンドリア接触領域で一時的に複合体を形成し、NDUFS4 をミトコンドリアへ移行させている可能性が示唆され、この機構により BAP31 はミトコンドリアの恒常性維持に寄与していると考えられる。さらに小胞体ストレスにより BAP31 の何が変化してこの複合体が崩壊するかを、細胞免疫染色法により BAP31 の細胞内局在を詳しく調べたところ、小胞体での BAP31 の局在が通常状態では滑面小胞体と粗面小胞体の両方にあったものが、小胞体ストレスによりその局在が粗面小胞体のみになった。これは滑面小胞体がミトコンドリアとの接触に重要であるため、そこから BAP31 の局在が減少することで、BAP31-Tom40 複合体が崩壊している可能性を示唆する結果である。

実際の生理学的条件下では BAP31 ノックアウト細胞で見られた変化は起きているのかを検討した。小胞体は小胞体ストレス(低栄養や低酸素など)によりその機能低下がおき、様々なシグナル応答が誘導されるが BAP31 が小胞体ストレスに応答するかは分かっていない。そこで、BAP31 と Tom40, NDUFS4 の結合について小胞体ストレスにより変化するかを調べたところ、BAP31 の遺伝子発現は変化しないが、この複合体の結合が崩壊してミトコンドリアの機能が低下することが分かった。以上の結果より、BAP31-Tom40 複合体がストレスセンサーのように機能することで、小胞体ストレスに応答してその結合状態を変化させてミトコンドリアタンパク質の細胞質からミトコンドリアへの輸送をコントロールすることで、ミトコンドリアの呼吸活性を制御している可能性が考えられた。

これまでにヒトで BAP31 の欠損がある場合にニューロパチーの症状が発症し、若年で死亡することが報告されている。そこで BAP31 が生体内、特に神経細胞でどのような機能を果たしているかを検討した。まず Cre/loxP システムを用いた BAP31 コンディショナルノックアウトマウス(cKO)を作成し、BAP31cKO と全身に Cre を発現するマウスを掛け合わせることで BAP31 ノックアウトマウスを構築した。しかし、BAP31 ノックアウトマウスは生まれてすぐ胎生致死であることが分かった。そこで神経細胞特異的にタモキシフェン投与により活性化する Cre を発現する BAP31cKO を作成し、胎生期 E9.5、または E10.5 にタモキシフェンを投与することで BAP31 をノックアウトしようとしたが、これ以降の正常な発育は見られず、そのまま耐性致死となり、マウスにおいては BAP31 が神経細胞の生育と形成に重要な働きがあることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kayo Machihara, Takushi Namba	4. 巻 527
2. 論文標題 Kuanoniamine C stimulates bortezomib-induced cell death via suppression of glucose-regulated protein 78 in osteosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 289-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.04.109	査読の有無 有
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 Namba Takushi	4. 巻 5
2. 論文標題 BAP31 regulates mitochondrial function via interaction with Tom40 within ER-mitochondria contact sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaaw1386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aaw1386	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 Machihara Kayo, Namba Takushi	4. 巻 8
2. 論文標題 BAP31 Inhibits Cell Adaptation to ER Stress Conditions, Negatively Regulating Autophagy Induction by Interaction with STX17	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1350 ~ 1350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8111350	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 Shohei Ueda, Haruo Ikeda, Takushi Namba, Yukinori Ikejiri, Yuri Nishimoto, Masayoshi Arai, Takuya Nihira & Shigeru Kitani	4. 巻 46
2. 論文標題 Identification of biosynthetic genes for the -carboline alkaloid kitasetaline and production of the fluorinated derivatives by heterologous expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology	6. 最初と最後の頁 739 ~ 750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10295-019-02151-z	査読の有無 有
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 Yoshioka Takuya, Igarashi Yasuhiro, Namba Takushi, Ueda Shohei, Pait Ivy Grace Umadhay, Nihira Takuya, Kitani Shigeru	4. 巻 74
2. 論文標題 Lavencidin, a polyene macrolide antibiotic from <i>Streptomyces lavendulae</i> FRI-5	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 359 ~ 362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-020-00404-z	査読の有無 有
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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takushi Namba
2. 発表標題 Bap31 Regulates Mitochondrial Function In ER-Mitochondria Contact Site.
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting. P539/B552. Washington, DC. December 7-11 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kayo Machihara, Takushi Namba
2. 発表標題 BAP31 Inhibits Cell Adaptation to ER Stress Conditions, Negatively Regulating Autophagy Induction by Interaction with STX17.
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting. P539/B552. Washington, DC. December 7-11 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takushi Namba, Kayo Machihara, Hiroyasu Iwahashi
2. 発表標題 Rejuvenating effect of lotus germ extract on senescent fibroblast via DAPK1-Becn1 pathway induced autophagy
3. 学会等名 6th International Cell Senescence Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 難波卓司、町原加代、岩橋弘恭
2. 発表標題 ハス胚芽エキスはDAPK1-Bec1 in1経路を介したオートファジー誘導により老化線維芽細胞の機能を回復させる
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石原直忠ほか 82名 難波卓司(p35-40)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 458
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アンチエイジング剤およびその製造方法	発明者 難波卓司、町原加代	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-092585	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

高知大学 農林海洋科学部海洋資源科学科海洋生命科学コース 難波 研究室 http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~t-namba/
--

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	東 洋一郎 (Higashi Youichiro) (80380062)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・講師 (16401)	

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			
米国	マサチューセッツ総合病院			