

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590337

研究課題名（和文）ミトコンドリア内外の協調的翻訳機構の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular Mechanism of co-ordinately translational regulation between outer and inner mitochondria

研究代表者

内海 健 （Uchiumi Takeshi）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80253798

研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリアはエネルギー産生、代謝、老化における重要な細胞小器官である。増殖因子依存的なミトコンドリア酸化的リン酸化に關与する蛋白の発現が基本的な代謝調節に重要である。翻訳機構は種々の RNA 結合蛋白により調節されているが、その詳細な機構は明らかでない。血清刺激により核コードの酸化的リン酸化蛋白の発現が増加し ATP 産生増加が起こることを明らかにした。さらに、mRNA 結合蛋白である YB-1 が優先的に酸化的リン酸化 mRNA に結合しその翻訳調節に關与することを明らかにした。YB-1 のノックダウンによりミトコンドリア酸化的リン酸化 mRNA への結合が抑制され、その結果、翻訳が亢進すること、さらに、ミトコンドリア機能が亢進することを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Mitochondria play key roles in essential cellular functions such as energy production, metabolic pathways and aging. Growth factor-mediated expression of the mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) complex proteins has been proposed to play a fundamental role in metabolic homeostasis. Although protein translation is affected by general RNA-binding proteins, very little is known about the mechanism involved in mitochondrial OXPHOS protein translation. In the present study, serum stimulation induced the nuclear-encoded OXPHOS protein expression such as NDUFA9, NDUF8, SDHB and UQCRC1 and mitochondrial ATP production in translation-dependent manners. We also observed that the major mRNA ribonucleoprotein Y-box binding protein-1 (YB-1) preferentially bound to these OXPHOS mRNA and regulated the recruitment of mRNAs from inactive messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) to active polysomes. YB-1 depletion led to upregulation of mitochondrial function through induction of OXPHOS protein translation from mRNP release. In contrast, YB-1 overexpression suppressed the translation of these OXPHOS mRNAs through reduced polysome formation, suggesting that YB-1 regulated the translation of mitochondrial OXPHOS mRNAs through mRNA binding. Taken together, our findings suggest that YB-1 is a critical factor for translation that may control OXPHOS activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：ミトコンドリア、翻訳、酸化的リン酸化、YB-1

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはエネルギー代謝の重要な細胞内小器官である。ミトコンドリアには独自のゲノムが存在し13種類のポリペプチド、22種類のtRNA,2種類のrRNAをコードしている。この13種類のタンパクはすべて電子伝達系に関与する蛋白である。その他の数十種類の電子伝達系に関する蛋白質は核遺伝子にコードされ、サイトソールで蛋白合成、ミトコンドリア内へ移行しミトコンドリア内で翻訳された蛋白と正しく重合し内膜に局在する。一方ミトコンドリア Nucleoids ヌクレオイドは5~7個のmtDNAゲノムと複製、転写に関する蛋白質群からなる。さらにヌクレオイドの周囲には翻訳機構が存在しミトコンドリアDNA複製、転写、翻訳が協調的に行われている。エネルギー代謝に必要なミトコンドリアDNAの異常や、機能異常はパーキンソン病などの神経変性疾患や心血管系の異常、がん、糖尿病などのいわゆるCommon diseaseの発症、さらに老化に関連すると考えられている

2. 研究の目的

「ミトコンドリア外膜ポリソームとミトコンドリアヌクレオイドの翻訳は機能調節されて、ミトコンドリア内外で量的、質的に適切な翻訳制御、タンパク重合を効率的に行うコミュニケーションが存在する。さらにこのシステムはヌクレオイドでのmtDNAの複製(コピー数)転写とも協調して働く」  
上記仮説を立証するため

[1]ミトコンドリア外膜ポリソームとヌクレオイドの翻訳機能関連の解明をYB-1とp32を中心として行う。

[2]ミトコンドリア外膜のポリソームの構成因子とmRNAの探索を行う

[3]ミトコンドリアヌクレオイドの構成因子の機能-siRNAを用いた機能解析

[4] マウス個体での機能解析 (p32 ノック

アウトマウスの作製)を目的とする。

3. 研究の方法

[1] ミトコンドリア外膜ポリソームの構成因子とmRNAの網羅的解析

・RNA結合蛋白YB-1がミトコンドリア外膜ポリソームの構成因子であることを、HeLa細胞を用いて証明する。

・ミトコンドリア画分からYB-1抗体を用いた免疫沈降法によりYB-1に結合する蛋白を網羅的に解析する。解析には質量分析器により同定する。

・ミトコンドリア外膜に存在するYB-1結合mRNAの解析 ミトコンドリア画分よりYB-1抗体を用いた免疫沈降法を行い、沈降物よりmRNAを精製後、マイクロアレイによりYB1に結合するmRNAを解析する

[2] ミトコンドリアヌクレオイドの構成因子の機能-siRNAを用いた機能解析

1. mtDNAのコピー数の変化、2. ミトコンドリアrRNA, mRNAのコピー数の変化をsyber greenを用いたreal time PCR法により定量する。3. 翻訳の効率をS35 methionineを用いたin vivo labellingで比較検討する

[3] ミトコンドリア外膜ポリソームとマトリックスヌクレオイドの機能関連

・外膜ポリソームの構成因子YB-1とヌクレオイド構成因子p32に注目し、ミトコンドリア内外での翻訳の調整、ヌクレオイドへの影響を評価する。

・ヌクレオイド構成因子p32のノックダウンにより、ミトコンドリア外膜ポリソームの質的变化を捉える。

[4] マウス個体での機能解析 (p32 ノックアウトマウスの作製)

キメラマウスよりのノックアウトマウスの作製、さらに脳特異的発現 Nestin -Cre transgenic mouse とのかけ合わせを行い、脳でのp32欠損マウスを作製する。

#### 4 . 研究成果

[1]ミトコンドリア外膜ポリソームの構成因子と mRNA の網羅的解析 R N A 結合蛋白 YB-1 がミトコンドリア外膜ポリソームの構成因子であることを、HeLa 細胞を用いて証明した。HeLa 細胞には細胞質の翻訳系が存在するが、ミトコンドリア ATP 産生に必須のたんぱくの翻訳に関与していることを明らかにした。さらに、血清刺激により翻訳が亢進すること、YB-1 のリン酸化が関与することを明らかにした。

[2]ミトコンドリアヌクレオイドの構成因子の機能 - siRNA を用いた機能解析

ミトコンドリア DNA 維持蛋白 TFAM の研究からヌクレオイドを構成する因子を多数同定してきた。その中には ERAL1, p32, EF-Tu, LRP130 などがある。現在 RNAi を用いて上記 4 種類の遺伝子のノックアウトは確認してした。これらヌクレオイド構成因子のノックダウンにより、ミトコンドリア rRNA, mRNA のコピー数の変化を syber green を用いた real time PCR 法により定量した。2 . 翻訳の効率を S35 methionine を用いた in vivo labelling で比較検討した。これらの評価を統合的に比べ、各々の蛋白のミトコンドリアに関する機能を測定できた。

[3]ミトコンドリア外膜ポリソームとマトリックスヌクレオイドの機能連関

ミトコンドリア外膜には YB-1 を中心としたポリソームが存在することを IP-western において確認した。このポリソーム分画の中には種々の mRNA が含まれていること。この mRNA の中には酸化リン酸化に関与する mRNA を同定した。このことはミトコンドリア外膜において蛋白合成が行われていることを初めて報告した。

[4] マウス個体での機能解析 (p32 ノックアウトマウスの作製)

P32 ノックアウトマウスは胎生致死を示した。胎児マウスより p32 ノックアウト細胞を作成し、この細胞においてはミトコンドリア機能低下、形態変化、酸化リン酸化能の低下、活性酸素の発生などの表現系を解析した。

#### 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 21 件)

1: Matsumoto S, Uchiumi T, Tanamachi H, Saito T, Yagi M, Takazaki S, Kanki T, Kang D. Ribonucleoprotein Y-box binding protein-1 regulates mitochondrial oxidative

phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA. *Biochem J.* 12:391-398, 2012

2: Shiota M, Song Y, Takeuchi A, Yokomizo A, Kashiwagi E, Kuroiwa K, Tatsugami K, Uchiumi T, Oda Y, Naito S. Antioxidant therapy alleviates oxidative stress by androgen deprivation and prevents conversion from androgen dependent to castration resistant prostate cancer. *J Urol.* ;187:707-14. 2012

3: Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D. Mitophagy plays an essential role in reducing reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem.* ; 287: 3265-72. 2012

4: Uchiumi T, Kang D. The role of TFAM-associated proteins in mitochondrial RNA metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1820:565-70. 2012

5: Aoki Y, Kanki T, Hirota Y, Kurihara Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D. Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol Biol Cell.* ;22: 3206-17. 2011

6: Fotovati A, Abu-Ali S, Wang PS, Deleyrolle LP, Lee C, Triscott J, Chen JY, Franciosi S, Nakamura Y, Sugita Y, Uchiumi T, Kuwano M, Leavitt BR, Singh SK, Jury A, Jones C, Wakimoto H, Reynolds BA, Pallen CJ, Dunn SE. YB-1 bridges neural stem cells and brain tumor-initiating cells via its roles in differentiation and cell growth. *Cancer Res.* 71: 5569-78. 2011

7: Shiota M, Takeuchi A, Song Y, Yokomizo A, Kashiwagi E, Uchiumi T, Kuroiwa K, Tatsugami K, Fujimoto N, Oda Y, Naito S. Y-box binding protein-1 promotes castration-resistant prostate cancer growth via androgen receptor expression. *Endocr Relat Cancer.* ;18:505-17. 2011

- 8: Shiota M, Yokomizo A, Kashiwagi E, Takeuchi A, Fujimoto N, Uchiumi T, Naito S. Peroxiredoxin 2 in the nucleus and cytoplasm distinctly regulates androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 51:78-87. 2011
- 9: Amamoto R, Yagi M, Song Y, Oda Y, Tsuneyoshi M, Naito S, Yokomizo A, Kuroiwa K, Tokunaga S, Kato S, Hiura H, Samori T, Kang D, Uchiumi T. : Mitochondrial p32/C1QBP is highly expressed in prostate cancer and is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. : *Cancer Sci.* 102: 639-647. 2011
10. Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Kashiwagi E, Masubuchi D, Eto M, Uchiumi T, Naito S. Castration resistance of prostate cancer cells caused by castration-induced oxidative stress through Twist1 and androgen receptor overexpression. *Oncogene.*;29: 237-250. 2010
11. Shiota M, Yokomizo A, Masubuchi D, Tada Y, Inokuchi J, Eto M, Uchiumi T, Fujimoto N, Naito S. Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate.* ;70:540-554. 2010
12. Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Uchiumi T, Fujimoto N, Seki N, Naito S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol Endocrinol.*;24:114-127, 2010
13. Uchiumi T, Ohgaki K, Yagi M, Aoki Y, Sakai A, Matsumoto S, Kang D. ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation. *Nucleic Acids Res.*;38: 5554-5568. 2010
14. Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Uchiumi T, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Yamamoto K, Seki N, Naito S. P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Sci.*;101: 1797-1806. 2010
15. Shiota M, Eto M, Yokomizo A, Tada Y, Takeuchi A, Masubuchi D, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Uchiumi T, Seki N, Naito S. Sorafenib with doxorubicin augments cytotoxicity to renal cell cancer through PERK inhibition. *Int J Oncol.* : 36:1521-1531. 2010
16. Izumi H, Wakasugi T, Shimajiri S, Tanimoto A, Sasaguri Y, Kashiwagi E, Yasuniwa Y, Akiyama M, Han B, Wu Y, Uchiumi T, Arao T, Nishio K, Yamazaki R, Kohno K. Role of ZNF143 in tumor growth through transcriptional regulation of DNA replication and cell-cycle-associated genes. *Cancer Sci.* 101 :2538-2545, 2010
17. Shiota M, Eto M, Yokomizo A, Tada Y, Takeuchi A, Itsumi M, Tatsugami K, Uchiumi T, Naito S. Sensitivity of doxorubicin-resistant cells to sorafenib: possible role for inhibition of eukaryotic initiation factor-2alpha phosphorylation. *Int J Oncol.*;37: 509-517. 2010
18. Shiota M, Song Y, Yokomizo A, Tada Y, Kuroiwa K, Eto M, Oda Y, Inokuchi J, Uchiumi T, Fujimoto N, Seki N, Naito S. Human heterochromatin protein 1 isoform HP1beta enhances androgen receptor activity and is implicated in prostate cancer growth. *Endocr Relat Cancer.* 2010 ;17:455-67.
19. Shiota M, Yokomizo A, Kashiwagi E, Tada Y, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Uchiumi T, Seki N, Naito S. Foxo3a expression and acetylation regulate cancer cell growth and sensitivity to cisplatin. *Cancer Sci.*;101: 1177-1185, 2010
20. Shiota M, Song Y, Yokomizo A, Kiyoshima K, Tada Y, Uchino H, Uchiumi T, Inokuchi J, Oda Y, Kuroiwa K, Tatsugami K, Naito S. Foxo3a suppression of urothelial cancer invasiveness through Twist1, Y-box-binding protein 1, and E-cadherin regulation. *Clin. Cancer Res.*

21. Fukuoh A, Ohgaki K, Hatae H, Kuraoka I, Aoki Y, Uchiumi T, Jacobs HT, Kang D. DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase. *Genes Cells.* ;14:1029-1042.2009

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 第 32 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜、横浜 2009-12.9-12

The mitochondrial function and cell growth of mitochondrial translation related protein

Takeshi Uchiumi , Dongchon Kang

ポスター

2. 第 32 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜、横浜 2009-12.9-12

Effects of overexpression of mitochondrial transcription factor A on mitochondrial genome in *Drosophila melanogaster*

Chika Tsumita, Takeshi Uchiumi, Dongchon Kang, Etsuko T. Matsuura

積田知佳、内海健、康東天、松浦悦子

ポスター

3. 第 68 回日本癌学会 パシフィコ横浜、横浜 2009-10.1-3

Mitochondrial translation related protein is involved in cancer cell growth and cell cycle

Takeshi Uchiumi

ポスター

4. 第 68 回日本癌学会 パシフィコ横浜、横浜 2009-10.1-3

The role of YB-1, a binding protein partner of NPM, in hematopoiesis and acute myeloid leukemia

Yoko Ogasawara, Takuo Katsumoto, Takeshi Uchiumi, Kimitoshi Kohno, Issay Kitabayashi

小笠原陽子、勝本拓夫、内海健、河野公俊、北林一生

5. 第 56 回 日本臨床検査医学会 札幌、札幌コンベンションセンター 2009.8-26-29

がんにおけるミトコンドリア翻訳因子 ERAL1 の機能

内海健、康東天

一般口演

6. 第 49 回 日本臨床化学会、長崎大学、長崎 2009.9.18-20

ワークショップ 口演

ミトコンドリア DNA 維持制御因子とがん

内海健、康東天

7. 第 9 回日本ミトコンドリア学会 東京 大学鉄門記念講堂、東京 2009.12-17-19

The knockdown of ERAL1 is involved in assembly of mitochondrial ribosome

Takeshi Uchiumi, Dongchon Kang

口演発表

8. 第 83 回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド、神戸 2010-12.7-10

ミトコンドリア蛋白 p32/C1qBP は前立腺がん で高発現し予後マーカーとなりうる

内海健、天本理恵、康東天

ポスター

9. 第 69 回日本癌学会 大阪国際会議場、大阪 2010-9.22-24

Mitochondrial p32 is highly expressed in prostate cancer and is associated with PSA relapse time after prostatectomy

Takeshi Uchiumi, Rie Amamoto, Yoshinao Oda, Masasumi Tsuneyoshi, Akira Yokomizo,

Seiji Naito, Yoohyun Song

ポスター

10. 第 69 回日本癌学会 大阪国際会議場、大阪 2010-9.22-24

Role of ZNF143 in tumor growth through transcriptional regulation of DNA replication and cell cycle associated genes

Masaki Akiyama, Hiroto Izumi, Eiji Kashiwagi, Yoshihiro Yasuniwa, Bin Han,

Ying Wu, Takeshi Uchiumi, Tokuzou Arao, Kazuto Nishio, Kimitoshi Kohno

11. 第 57 回 日本臨床検査医学会 東京、京王プラザホテル 2010.9.9-12.

ミトコンドリア蛋白 p32 は前立腺がんの予後マーカーになる

内海健、康東天

一般口演

12. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM)

The 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial reaserch and Medicine (J-Mit)

Fukuoka International Congress Center,

Fukuoka 2010. 12.16-18  
Mitochondrial p32 is highly expressed in prostate cancer and is associated with shorter PSA relapse time after prostatectomy

Takeshi Uchiumi, Rie Amamoto, Dongchon Kang  
ポスター

13. 第 34 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜、横浜 2011-12.13-16  
Embryonic lethality in mitochondrial p32 deficient, and the importance of p32 RNA binding for OXPHOS

Takeshi Uchiumi, Mikako Yagi, Dongchon Kang  
一般口演、ポスター

14. 第 34 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜、横浜 2011-12.13-16  
Ribonucleoprotein YB-1 binds to mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) mRNA and regulate OXPHOS protein expression after serum stimulation.

Shinya Matsumoto, Takeshi Uchiumi, Dongchon Kang  
ポスター

15. 第 8 4 回日本生化学会、京都国際会館、京都 2011-9.21-24

ミトコンドリア RNA 結合蛋白 p32 の機能解析  
内海健  
シンポジウム

16. 第 70 回日本癌学会 名古屋国際会議場、名古屋 2010-10.3-5

The expression of ubiquitous mitochondrial creatine kinase is downregulated in prostate cancer progression

Takeshi Uchiumi, Rie Amamoto, Yoohyun Song, Yoshinao Oda, Masasumi Tsuneyoshi, Akira Yokomizo, Seiji Naito,  
ポスター

17. 第 70 回日本癌学会 名古屋国際会議場、名古屋 2010-10.3-5

Downregulation of PDE4B activates protein kinase A and contributes to the progression of prostate cancer

Eiji Kashiwagi, Mashaki Shiota, Akira Yokomizo, Junichi Inokuchi, Takeshi Uchiumi, Seiji Naito,  
ポスター

18. 第 58 回 日本臨床検査医学会 岡山コンベンションセンター、岡山

2011.11.17-20.

前立腺がんで発現亢進するミトコンドリア RNA 結合蛋白 p32 の機能解析

内海健、康東天  
一般口演

19. EuroMit 8 European Meeting on Mitochondrial Pathology, Zaragoza, Spain 6. 20-23, 2011

Mitochondrial p32 is highly expressed in prostate cancer and is associated with shorter PSA relapse

Takeshi Uchiumi, Rie Amamoto, Dongchon Kang

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
内海 健 (Uchiumi Takeshi)

研究者番号：80253798

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：