

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20640

研究課題名(和文) NLRP3依存性の炎症応答に必要なミトコンドリアゲノム複製促進の分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis about mitochondrial genome signaling for activating NLRP3 inflammation

研究代表者

加生 和寿 (Kasho, Kazutoshi)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90726019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：NLRP3インフラマソームを介した炎症誘導は病原菌に対する恒常性維持に必要な自然免疫系の一つである。免疫細胞が細菌由来リポ多糖LPSなどを感知することでミトコンドリアゲノム(mtDNA)のコピー数が約3倍に増加する。次いでさらなるmtDNA修飾によりNLRP3活性化に必要なmtDNA由来シグナルが産生される。一方で、炎症時mtDNA複製様式は解析されておらず、その制御機構は未解明である。本研究ではLPS刺激時におけるmtDNAコピー数制御に関する解析を進めた。加えて、ミトコンドリア由来蛋白質抽出液と精製mtDNAとを混ぜることにより試験管内mtDNA複製系を部分的に構築することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はNLRP3炎症反応の起点となるLPS依存性mtDNA複製における複製モードとその制御様式の解明を目指す初の試みであり新規性、独自性が高い。加えて、NLRP3炎症反応の制御因子としてmtDNA複製促進に必要な因子を探索するというアプローチも独創的と言える。本研究を基盤にして新規NLRP3制御因子が同定されれば、神経変性疾患などの炎症過剰亢進に起因する疾患の治療薬ターゲットの創造に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial genome (mtDNA) is an essential signaling factor for the activation of the NLRP3 inflammasome against a broad range of pathogens such as LPS (lipopolysaccharides) and in response, activates inflammation. Mitochondria are able to sense an innate immune priming event caused by an injury or a microbial damage, and convert this signal via mtDNA release to activate NLRP3, which occurs through LPS-dependent increase of mtDNA copy number and subsequent mtDNA modification. However, the mechanism for stimulating mtDNA replication remains unveiled. This study tried to reveal the regulatory mechanism for mtDNA copy number after LPS treatment and to reconstitute mtDNA replication in vitro.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア mtDNA 複製 NLRP3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症は細菌感染などの異常事態に速やかに対処するための自然免疫システムの一つである。一方で、炎症が必要以上に慢性化するとアルツハイマー病など様々な疾患の一因となり得る。これら疾患の患者数は世界規模で増加しているが、その診断、治療法は限定的である。よって炎症惹起を制御するための基盤的機構の解明が急務である。

本研究では、特に多彩な細胞外シグナルを感知し、多くの疾病に關与する NLRP3 インフラマソーム (炎症誘導装置) の活性化機構の解明を目指す。過去の研究により、免疫細胞が細菌由来リポ多糖 (LPS) などを感知した際に、エネルギー産生を担う細胞内小器官ミトコンドリア、特にそのゲノム mtDNA が活性化されるというモデルが提唱された (Zhong *et al.*, 2018)。まず LPS を感知することで細胞内 mtDNA コピー数が 3 倍に増加する。次いでさらなる mtDNA 修飾により NLRP3 活性化に必須の mtDNA 由来シグナルが産生される。さらに、細胞質へと放出された mtDNA 由来シグナルは NLRP3 と直接結合、活性化することで炎症を誘導する。炎症 mtDNA シグナリングのうち mtDNA 複製は炎症惹起に必須であり重要性は明確である。一方で、炎症時 mtDNA シグナリングの分子機構は未解明である。mtDNA 複製は核ゲノム複製と異なる様式で遂行され、細胞や増殖の条件に応じてリーディング鎖/ラギング鎖共役型と非共役型の複製モードを巧みに使い分ける (Yasukawa *et al.*, 2018)。一方で、炎症時における mtDNA 複製モードは解析されておらず、その促進メカニズムと制御様式は未解明である。

2. 研究の目的

炎症時 mtDNA 複製が開始段階の促進に由来するか、あるいは複製モードのスイッチングによるものか検証する。加えて、mtDNA 維持に関わる蛋白質群の炎症時の機能について網羅的解析を行う事で炎症時 mtDNA 複製を適時的に促進する因子を同定する。本研究は NLRP3 炎症反応の起点となる LPS 依存的 mtDNA 複製における複製モードとその制御様式の解明を目指す初の試みであり新規性、独自性が高い。

3. 研究の方法

1. 炎症時 mtDNA 複製制御の解析

本研究では申請者の mtDNA 複製研究の経験を生かして炎症時の mtDNA コピー数解析を行った。細胞培養にはマウス骨髄由来マクロファージ BMDM (Bone marrow-derived macrophage) を用い、LPS 添加による mtDNA コピー数増加を定量 PCR 法により確認した。過去の結果を再現できた場合には LPS 添加前後で mtDNA コピー数が 2-3 倍に増加することが期待される。mtDNA コピー数は定量 PCR 法により解析した。プローブには核ゲノム (nDNA; nuclear DNA) 由来配列、mtDNA 由来配列をそれぞれ用い、相対的 mtDNA コピー数 (mtDNA/nDNA) を算出した。

2. 炎症時 mtDNA 複製を駆動する因子の探索

さらに、申請者が現在進めている mtDNA 複製の試験管内再構成系を基にした解析手法を応用し、炎症時 mtDNA 複製の再構成系の確立を目指した。第一に、過去の報告に倣ってスクロースグラジエント法により高純度のミトコンドリア画分を精製し、界面活性剤 Triton X-100 で処理することで *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア粗抽出液を調製した。第二に、このミトコンドリア抽出液と全長 *X. laevis* mtDNA を含む DNA を反応させ、DNA 合成が進行するか検証した。反応後速やかに 10% トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させ、ガラスフィルターを用いて DNA を回収する。液体シンチレーションカウンターによりガラスフィルター上の ³²P 量を測定することで *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア粗抽出液の複製活性を測定した。

4. 研究成果

1. 炎症時 mtDNA 複製制御の解析

過去の報告 (Zhong *et al.*, 2018) で見られている LPS 刺激時における mtDNA コピー数増加について、上記のとおりマウス由来骨髄マクロファージ細胞 BMDM を用いた定量 PCR 法により複数回検出を試みた。しかしながら LPS を添加しても mtDNA コピー数の増加は検出されず、過去の報告の再現性は得られなかったと結論付けた (九州大学大学院検査部 後藤 和人 助教、現: 東海大学医学部 准教授との共同研究を含む)。

2. 炎症時 mtDNA 複製を駆動する因子の探索

上記の通り過去の報告 (Zhong *et al.*, 2018) の再現性が得られなかったことから、申請者は研究の進行に支障があった際の代替案である試験管内での mtDNA 複製系の構築を中心に進めている。現在までに申請者はミトコンドリア由来蛋白質と mtDNA とを混ぜることにより部分的に複製反応を誘導させることに成功している (九州大学理学研究院 高橋 達郎 教授との共同研究を含む)。鑄型には pBR322 プラスミド (高コピー、大腸菌細胞から精製) に *X. laevis* 由来全長 mtDNA (*X. laevis* 卵由来ミトコンドリア画分から精製) をクローニングすることで作成した pBR322-XmtDNA を使用することとした。この DNA を用いてミトコンドリア抽出液が試験管内

で複製活性を有するかフィルターバインディング法により解析したところ、pBR322（ネガティブコントロール）を鋳型として用いた実験ではほとんど複製活性を示さなかったのに対し、pBR322-XmtDNA を鋳型として用いた実験ではミトコンドリア抽出液の添加量に応じて複製活性を示した（未発表データ）。次に、このミトコンドリア抽出液による試験管内 mtDNA 複製系で複製開始部位 OriH を含む非コード領域からの特異的な複製開始反応を見ているか否かアルカリアガロースゲル電気泳動法により解析した。その結果、反応開始 3~10 分という非常に短い時間で pBR322-XmtDNA 全体で一様なシグナルが得られた。この結果は特定の部位からの複製開始ではなく部位に依らない非特異的な複製開始を見ていることを示唆している。制限酵素を用いた複製部位の特定（Dunon-Buteau *et al.*, 1987）による解析も同様の結論を示唆していた（未発表データ）。これらの結果は今回調製したミトコンドリア抽出液が活性のある複製装置群を有していることを示しているが、一方で mtDNA 複製開始には転写との共役が必要である点などを考慮すると今後もさらなる条件検討を重ねることで複製開始の部位特異性を向上させる必要がある。今後はこの新規 mtDNA 複製再構成系を炎症時 mtDNA 制御に重要な因子の探索に応用することを計画している。

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 1件）

1. 著者名 Tepei Inatomi, Shigeru Matsuda, Takashi Ishiuchi, Yura Do, Masunari Nakayama, Shusaku Abe, Kazutoshi Kasho, Sjoerd Wanrooij, Kazuto Nakada, Kenji Ichiyonagi, Hiroyuki Sasaki, Takehiro Yasukawa, Dongchon Kang	4. 巻 1869
2. 論文標題 TFB2M and POLRMT are essential for mammalian mitochondrial DNA replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2021.119167	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 該当する

1. 著者名 Sakiyama Y, Nagata M, Yoshida R, Kasho K, Ozaki S, Katayama T.	4. 巻 298
2. 論文標題 Concerted actions of DnaA complexes with DNA-unwinding sequences within and flanking replication origin oriC promote DnaB helicase loading.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102051
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102051	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加生 和寿, Gorazd Stojkovic, Mara Doimo, Berner Andreas, Cristina Velazquez-Ruiz, Maria I. Martinez-Jimenez, Timothee Laurent, Aldo E. Perez-Rivera, Luis Blanco, Sjoerd Wanrooij
2. 発表標題 PrimPol-PoIDIP2 複合体によるミトコンドリアゲノム維持の分子機構
3. 学会等名 第26回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加生 和寿、大島 拓、Onuma Chumsakul、中村 健介、深町 和貴、片山 勉
2. 発表標題 大腸菌の核様体蛋白質 IHFはゲノム複製開始時期において複製開始点oriCとの結合が特異的に安定化される
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加生 和寿, Anais Lamy, Andreas Berner, Tran Nguyen, Gorazd Stojkovic, Cristina Velazquez-Ruiz, Maria Isabel Martinez-Jimenez, Mara Doimo, Timothee Laurent, Aldo E. Perez-Rivera, Ronnie Berntsson, Luis Blanco, and Sjoerd Wanrooij
2. 発表標題 ユニークな多機能蛋白質PoIDIP2によるPrimPol依存的ミトコンドリアゲノム維持の新規制御機構
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazutoshi Kasho, Taku Oshima, Onuma Chumsaku, Kensuke Nakamura, Kazuki Fukamachi, Kazuyuki Fujimitsu, and Tsutomu Katayama
2. 発表標題 Regulation of replication initiation timing by timely binding and dissociation of the nucleoid protein IHF in Escherichia coli
3. 学会等名 遺伝研国際シンポジウム2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加生 和寿、片山 勉
2. 発表標題 脊椎動物型ミトコンドリアゲノム複製開始の進化的起源に迫る
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://bunsei.phar.kyushu-u.ac.jp

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

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