

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25年6月12日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590072

研究課題名（和文） 線虫生殖巣の成熟・分化におけるカルジオリピンの新規機能の解析

研究課題名（英文） Novel function of cardiolipin in the gonad development of *C. elegans*.

研究代表者

中川 靖一（NAKAGAWA YASUHITO）

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：00119603

研究成果の概要（和文）：カルジオオリピン（CL）はミトコンドリア内膜に局在する酸性膜リン脂質である。ミトコンドリアの種々の膜タンパク質と相互作用することにより、それらの構造や活性の維持に寄与することが知られている。本研究では、線虫 *C. elegans* をモデル生物として用い、CL が線虫の生殖細胞の増殖やミトコンドリアの機能維持に必要であること、一方で体細胞の増殖やミトコンドリアには CL は必須ではないことを明らかにした。本研究は CL 欠損に対するミトコンドリアの感受性が組織や細胞ごとに異なることを、個体レベルで初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cardiolipin (CL) is an acidic phospholipid specifically localized in mitochondrial inner membrane. By interacting with various mitochondrial proteins, CL contributes to the maintenance of the structure and function of those mitochondrial proteins. In this study, by analyzing deletion mutants of a CL synthase gene (*cr1s-1*) in *C. elegans*, we demonstrated that CL depletion selectively caused abnormal mitochondrial function and morphology in germ cells but not in somatic cells. This is the first study to show varying susceptibilities among different cell types to CL depletion *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：カルジオオリピン、ミトコンドリア、脂質、線虫、生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

カルジオオリピン（CL）は電子伝達系タンパク質、ATP-ADP 交換タンパク質（ANT）など種々のミトコンドリアタンパク質の活性に必須な機能性リン脂質として古くから知られている。また、CL はミトコンドリアからシトクロム c の放出、Bax のミトコンドリア膜上での会合、また、tBid のミトコンドリアへの

移行の標的分子として、アポトーシスに深く係るリン脂質である。これまで、我々はカルジオオリピンに関して次の点について明らかにしてきた。(1) CL の過酸化はアポトーシスを誘導する (Biochem. J 371, 1-11, 2003)。(2) CL が低下した温度感受性 CHO 変異細胞では、CL 量の減少とアポトーシス誘導と非常に良い相関がある。(3) 精子数が著しく減少し

た男性不妊患者では、CL などのリン脂質の過酸化の亢進が示唆された (Biol. Reprod. 64, 674-683, 2001)。これらの事実はアポトーシスの関与する発生・分化、増殖、疾病などへの CL の関与を強く示唆している。

2. 研究の目的

これまでの CL の機能の研究は単離ミトコンドリア、培養細胞、酵母菌を用いたものであり、個体レベルの研究は皆無である。生体での真の CL の生理的機能を明らかにするためには、個体レベルの解析が不可欠である。本研究は CL 合成酵素 (*crls-1*) 遺伝子の欠損した線虫の表現型を解析することにより、CL の新たな生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者らは個体レベルで CL の機能の解明には *crls-1* 欠損線虫を用いたアプローチが有効と考えた。

(1) *crls-1* 欠損線虫は産卵数が少なく解析に要する大量の線虫を確保するため、RNAi 法を用いた線虫の回収法を確立する。さらに得られた *crls-1* ノックダウン線虫を用い、*crls-1* 欠損による CL 量の変動、ミトコンドリア機能への影響について明らかにする。

(2) *crls-1* 欠損線虫の生殖巣障害機構として、生殖細胞の増殖能とアポトーシスの関与について解析する。我々は CL の低下はアポトーシスを誘導することを報告しており、生殖巣でのアポトーシス誘導について、カスパーゼの二重欠損線虫を用いて明らかにする。また、*crls-1* 欠損が生殖巣萎縮の原因であることを、*crls-1* 欠損線虫に *crls-1* 遺伝子を導入したリバーサント線虫を用いて検討する。

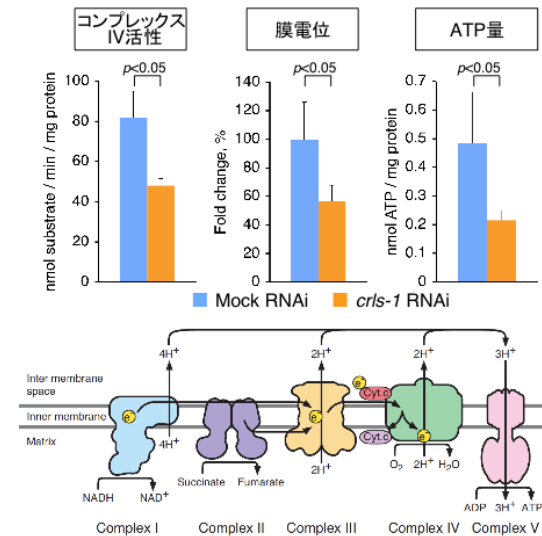
(3) *crls-1* 欠損線虫の細胞増殖能、ミトコンドリア機能および構造の異常について、生殖細胞と体細胞を比較して、その差異の有無を明らかにする。細胞増殖能は核染色により、ミトコンドリア機能は膜電位依存的な蛍光色素の取り込みを指標に、ミトコンドリア構造の異常は電顕観察により解析する。

4. 研究成果

(1) *crls-1* 欠損による CL 量の変動、ミトコンドリア機能への影響について

crls-1 欠損線虫は不妊であるため、大量培養が難しかった。そこで線虫研究で広く用いられる Feeding RNAi 法を用いることで、*crls-1* 遺伝子をノックダウンした *crls-1* 欠損線虫を大量に回収することに成功した。*crls-1* ノックダウン線虫に対して種々の生化学分析を行ったところ、*crls-1* 欠損線虫は

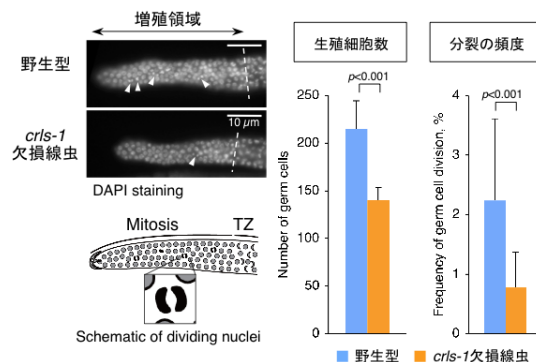
CL 含量、*crls-1* mRNA 発現量ともに野生型に比べ著しく低下していることが確認された。また、ミトコンドリア電子伝達系コンプレックスの1つであるコンプレックス IV の活性、各コンプレックスにより作り出されるミトコンドリア膜電位、膜電位差を利用して生成される ATP、これらのいずれもコントロールに比べ低下していることが明らかとなった (図 1)。



【図 1】 *crls-1* ノックダウン線虫のミトコンドリア機能の生化学分析

(2) *crls-1* 欠損線虫の生殖巣障害機構の解析

crls-1 欠損線虫では生殖腺が顕著に萎縮するが、生殖細胞の大半を占める減数分裂は正常に行われていることが核染色から確認された。そこで、生殖腺末端で特異的に行われる生殖細胞の増殖能について解析した。核染色を行い、増殖領域の細胞数、分裂の頻度を計測したところ、*crls-1* 欠損線虫では野生型に比べどちらも低下していることが分かった (図 2)。



【図 2】 *crls-1* 欠損線虫の生殖細胞の増殖能

また、アポトーシス過剰により生殖細胞が減少している可能性が考えられたことから、アポトーシスの実行に必須なカスパーゼ (*ced-3*) との二重欠損線虫を作成したが、

生殖腺は萎縮したままであった。このことから、*crls-1* 欠損線虫の不妊という表現型は過剰なアポトーシスによるものではないことが明らかになった。

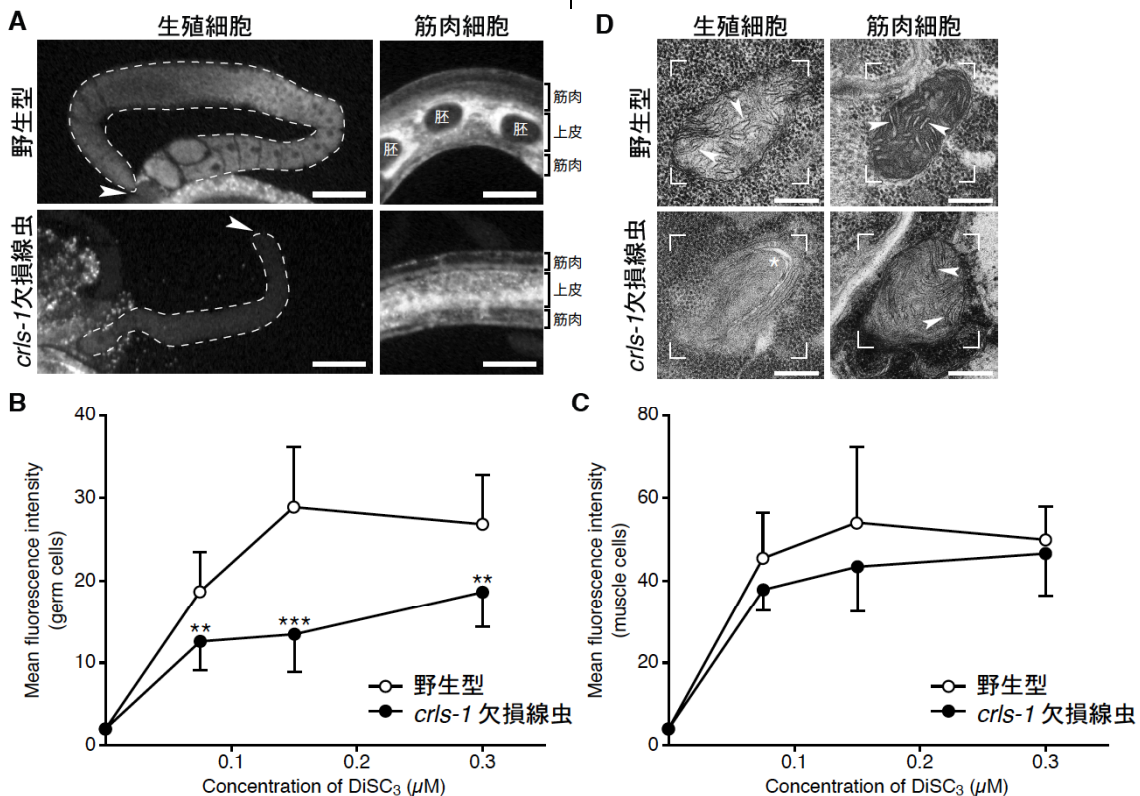
crls-1 欠損線虫に対して、熱ショックプロモーターの制御下で *crls-1* 遺伝子を発現するトランスジェニックベクターを導入した。熱ショック後の産卵数を計測したところ、*crls-1* 欠損線虫の産卵数が野生型並みにまで回復した。その際、CL 合成活性に重要なアミノ酸残基に点変異を導入したトランスジェニックベクター (*crls-1*^{D116A}) を導入したところ産卵数は回復しなかった。このことから、*crls-1* は CL 合成活性を介して線虫の産卵数を制御していることが明らかとなった。

(3) *crls-1* 欠損線虫の生殖細胞と体細胞の比較

crls-1 欠損線虫では野生型に比べ、生殖細胞の増殖能が顕著に低下していることが分かった (前述)。そこで体細胞の増殖能について、細胞系譜の解析が容易な陰門細胞および上皮細胞を指標に検討した。核染色後の陰門細胞を蛍光顕微鏡で観察し、数と配置について調べたが *crls-1* 欠損線虫と野生型で差は認められなかった。上皮細胞については線虫の両側面に存在する seam 細胞を、当該細胞特異的に GFP を発現させることで数と配置について調べたが、seam 細胞についても *crls-1* 欠損線虫と野生型で差は認められなかった。さらにミトコンドリアの機能につい

て、膜電位依存的にミトコンドリアに取り込まれる蛍光色素 DiSC₃ により染色し、蛍光強度を定量化することで比較した。生殖細胞については、*crls-1* 欠損線虫の蛍光強度が野生型の 50~60%に低下していた。一方、体細胞の代表として筋肉細胞のミトコンドリア膜電位を解析したが、*crls-1* 欠損線虫と野生型で差は認められなかった。ミトコンドリア内部の微細な構造について観察するために電子顕微鏡を用いて生殖細胞と筋肉細胞を観察した。野生型では生殖細胞、筋肉細胞ともに明瞭なクリステ構造が観察されたが、*crls-1* 欠損線虫の生殖細胞ではクリステ構造が崩壊し、異常に長い内膜様の構造が観察された。*crls-1* 欠損線虫の筋肉細胞では多数のクリステ構造が確認された (図 3)。

本研究では、CL の個体レベルにおける生理的意義を明らかにすることを試みた。その結果、*crls-1* 欠損線虫の生殖細胞選択的にミトコンドリアの機能低下や形態異常、細胞増殖能の低下が起きることを明らかにした。このことは、従来考えられていた CL のミトコンドリア機能に対する寄与は、細胞ごとに異なることを強く示唆するものであり、CL の生理機能を解析するには、培養細胞や酵母を用いた単一細胞系に加え、線虫のような個体レベルでの解析が必須であることを示している。今後、*crls-1* 欠損線虫を用いた遺伝学的スクリーニングを行うことにより、膜脂質環境の変化に対するオルガネラの感受性を決定す



【図 3】 *crls-1* 欠損線虫の生殖細胞と体細胞のミトコンドリア機能と形態

る分子メカニズムが明らかになるものと期待される。

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 6 件)

① Metabolism and biological function of cardiolipin.

Nakagawa Y.

Yakugaku Zasshi, 133, 561-574 (2013)

② Deficiency of cardiolipin synthase causes abnormal mitochondrial function and morphology in germ cells of *Caenorhabditis elegans*.

Sakamoto T., Inoue T., Otomo Y., Yokomori N., Ohno M., Arai H., and Nakagawa Y.

J. Biol. Chem., 287, 4590-4601 (2012)
10.1074/jbc.M111.314823

③ Recent studies of cardiolipin as a novel modulator of apoptosis

Nakagawa Y.

Seikagaku, 83, 475-484 (2011)

[学会発表] (計 8 件)

① 坂本太郎、井上貴雄、新井洋由、中川靖一

「カルジオリピン合成酵素は *C. elegans* の生殖細胞の増殖に必要である」
第 35 回日本分子生物学会年会 (2012, 12/14, 福岡)

② Taro Sakamoto, Nagaharu Yokomori, Yukae Otomo, Motoki Ohno, Takao Inoue, Hiroyuki Arai, Yasuhito Nakagawa

「A role for cardiolipin in the gonad development of *Caenorhabditis elegans*」
18th International *C. elegans* Meeting (2011, 6/24, Los Angeles)

③ 坂本太郎、横森永治、大友由佳永、大野元希、井上貴雄、新井洋由、中川靖一

「カルジオリピン欠損線虫におけるミトコンドリア機能の生化学的解析」
第 84 回日本生化学会大会 (2011, 9/22, 京都)

④ 坂本太郎、井上貴雄、大友由佳永、新井洋由、中川靖一

「線虫 *C. elegans* の生殖腺形成におけるカルジオリピンの生理機能の解析」
第 52 回日本脂質生化学会 (2010, 6/14, 伊香保)

⑤ Nagaharu Yokomori, Taro Sakamoto, Yukae Ohtomo, Motoki Ohno, Takao Inoue, Hiroyuki Arai, Yasuhito Nakagawa

「Cardiolipin is required for the maintenance of mitochondrial membrane potential of *C. elegans* gonad.」
4th East Asia *C. elegans* Meeting (2010, 7/12, Tokyo)

⑥ Motoki Ohno, Taro Sakamoto, Yukae Ohtomo, Nagaharu Yokomori, Takao Inoue, Hiroyuki Arai, Yasuhito Nakagawa

「Characterization of phenotypes for the sterility in cardiolipin deficient mutants」
4th East Asia *C. elegans* Meeting (2010, 7/12, Tokyo)

⑦ 横森永治、坂本太郎、大友由佳永、大野元希、井上貴雄、新井洋由、中川靖一

「カルジオリピン欠損線虫の生化学的解析」
BMB2010 (2010, 12/10, 神戸)

⑧ 大野元希、坂本太郎、大友由佳永、横森永治、井上貴雄、新井洋由、中川靖一

「線虫の生殖腺形成におけるカルジオリピンの生理的役割」
BMB2010 (2010, 12/10, 神戸)

[その他]

ホームページ等

http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/eisei/eisei/Sakamoto,_JBC_2011.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 靖一 (NAKAGAWA YASUHITO)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：00119603

(2) 研究分担者

坂本 太郎 (SAKAMOTO TARO)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：10383655