

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：34533

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659143

研究課題名（和文）新規ミトコンドリア融合抑制因子HPGBによる心臓/代謝機能制御の同定

研究課題名（英文）Functional analyses of novel mitochondrial fusion inhibitor HPGB in the regulation of heart and metabolism

研究代表者

馬場 明道 (BABA AKEMICHI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：70107100

研究成果の概要（和文）：本研究では膵β細胞過形成関連遺伝子（HPGB）という新規遺伝子の機能を解析した。HPGBが内因性のミトコンドリア融合阻害因子として機能すること等を確認するほか、本分子が酸化ストレスやマイトファジーの制御に関与する可能性を見出した。またその融合阻害活性に関わるアミノ酸残基を同定した。さらに膵β細胞や心筋での過剰発現マウスを創出した。β細胞過剰発現マウスの解析から、HPGBには2型糖尿病病態下において膵β細胞における細胞増殖の亢進作用と過酸化脂質蓄積の抑制作用があることが見出された。本研究によりHPGBの生理・病態的意義が初めて明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study performed functional analyses on a novel gene named hyperplasia-associated gene of pancreatic β-cell (HPGB). We confirmed that HPGB functions as an endogenous mitochondrial fusion inhibitor etc., found its possible roles in the regulation of oxidative stress and mitophagy, and identified amino acids involved in its fusion inhibition activity. In addition, we generated transgenic mice overexpressing HPGB in the pancreatic β-cell or cardiac muscle. Phenotypic analyses of the β-cell transgenic mice suggested that HPGB enhances β-cell proliferation and suppresses oxidative lipids accumulation in β-cells under the type 2 diabetic condition. Taken together, this study firstly revealed the physiopathological significance of HPGB.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：シグナル情報伝達系、ミトコンドリア、2型糖尿病、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年、ミトコンドリア動態（分裂と融合）の制御に関わる多くの因子が同定され、その生理・病態的重要性が明らかにされつつある。またこれら因子の多くは、組織あるいは病態特異的な発現を示すことから、全く新規の作用点を有する創薬標的の提案にも繋がるとして、その研究展開が大きく期待されている。

Hyperplasia-associated gene of pancreatic

β-cell (HPGB) は、II型糖尿病モデルマウスの過形成膵島での発現変動を指標として代表者らが同定した機能未知遺伝子である。研究開始当初までに見出されていた知見として、過剰発現させたHPGBはミトコンドリアのマトリクスに局在し、その形態を断片化させること、またHPGBの20～49番目のアミノ酸を欠失した変異体(Δ20-49_HPGB)では、断片化作用が大きく抑制されること等がある。

さらに本分子の最も興味深い特性として、細胞融合（ミトコンドリア融合）実験において HPGB を発現するミトコンドリア粒子が他のミトコンドリア粒子と融合をしないこと、すなわち HPGB には、他の動態制御因子では報告されていない“ミトコンドリアの融合抑制能”があることも示されている。また HPGB の mRNA が、II 型糖尿病マウスの膵島で発現減少を示すこと、生体内ではミトコンドリアが豊富な心臓等に高発現することから、これら病態や組織における重要性が示唆されている。しかし HPGB の生理・病態的機能（特に糖尿病や心臓での機能）は、研究開始当初まで、ほとんど明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、新規ミトコンドリア融合抑制因子 HPGB の生理・病態的機能の同定を目的として実施した。In vitro 実験としては野生型/変異導入型 HPGB や HPGB ノックダウン細胞の機能解析を、in vivo 実験としては組織特異的 HPGB 過剰発現 (Tg) マウスの表現型解析を行った。これらによって、HPGB のミトコンドリアおよび細胞機能発現における役割や、心臓/代謝関連組織での機能を明らかにするとともに、本分子の“ミトコンドリア融合抑制能”の生理・病態的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

遺伝子過剰発現系については、カチオン性リポソーム（リポフェクタミン）を用いた発現系に加え、ウイルスを用いた発現系を構築し、COS-7 細胞を用いて行った。遺伝子ノックダウン系については、HPGB に対する siRNA を複数作製し、リポフェクタミンを用いた導入系で、HeLa 細胞を用いて行った。HPGB 蛋白の発現は作製済の抗 HPGB 抗体を用いたイムノブロットあるいは免疫染色で評価した。ミトコンドリアの形態変化等は抗 cytochrome c (cyto c) を用いた免疫染色により解析し、その膜電位は蛍光色素 JC-1 等により評価した。また抗ニトロチロシン抗体を用いた免疫染色や、ミトコンドリア由来活性酸素種 (ROS) の指示薬である Mitotracker CMXRos を用いた解析により、ミトコンドリアの酸化ストレス蓄積を評価した。またマイトファジー（オートファジーによるミトコンドリア分解）に関しては、オートファゴソームマーカーの LC3 とミトコンドリアマトリクスマーカーの HSP60 に対する抗体を用いた免疫染色を行い、これらの共局在を指標に評価した。変異導入型 HPGB（部分欠失およびアラニン置換）は遺伝子工学的手法により作製し、これらを発現させた細胞とミトコンドリア局在性 GFP を発現させた細胞とをポリエチレングリコール (PEG) 処置により融合させ、その後の各種 HPGB と GFP との共

局在を指標に各分子のミトコンドリア融合阻害能を評価した。Tg に関しては、インスリンや α -ミオシン重鎖プロモーターを用いたコンストラクトを用いて作製済の膵 β 細胞あるいは心筋特異的 HPGB 過剰発現マウス（それぞれ B-Tg、C-Tg）を、C57BL/6 の遺伝的背景へ 5 回以上戻し交配させ、出生率、性比、生後の体重増加等を解析した。B-Tg については、高脂肪食を 8~22 週齢まで与え表現型を通常食負荷群と比較する実験も行った。体重は毎週、血糖値と血中インスリン値は 3 週間毎に測定し、20 週齢で経口糖負荷試験を、22 週齢時に膵組織切片を作製した。HE 染色により膵島形態を観察し、抗 Ki-67 抗体あるいは抗 4-HNE 抗体を用いた染色で細胞増殖活性あるいは過酸化脂質の蓄積を評価した。また C-Tg については、約 1 年齢のマウスや大動脈縮窄術 (TAC 手術) を行ったマウスに関し心重量や心エコーの解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアの形態制御

アデノウイルス発現ベクターを作製して過剰発現を確認したところ、80%以上の細胞で HPGB 蛋白の発現を確認した（リポフェクタミンの場合 40%程度）。またリポフェクタミンの場合と同様、HPGB の過剰発現によるミトコンドリアの断片化を確認した。

5 種の siRNA のノックダウン効率を検討した結果、3 つの配列（いずれもエクソン 1 に対応）で細胞死を伴わない HPGB 蛋白の発現減少（10%以下）を確認した。また同条件では、ミトコンドリア形態は伸長し、さらに膜電位消失薬 CCCP によるミトコンドリア断片化も有意に軽減されることを見出した。

また HPGB のミトコンドリア融合阻害作用の詳細を解明する目的で、これまで用いていたマトリクス局在性蛋白 mtAcGFP に加え、エピトープ標識した Fis1（ミトコンドリア外膜局在性）や cyto c（膜間スペース局在性）の発現細胞を用いた細胞融合実験を行った。結果、融合細胞内で HPGB は、mtAcGFP とは全く共局在を示さない一方、Fis1 や cyto c とは共局在を示した。すなわち、HPGB を発現するミトコンドリアは他のミトコンドリア粒子との間でマトリクス成分は交換できないが、外膜や膜間スペース領域の蛋白成分は交換できることが示唆された。

以上、HPGB には遺伝子量依存的にミトコンドリアを断片化させる作用があること、またその融合阻害作用はミトコンドリアの内膜レベルで起きていることが示された。

(2) ミトコンドリアの機能調節

HPGB の過剰発現では膜電位等に大きな変化が認められない一方、ノックダウンでは有意な膜電位低下が認められることを見出し

た。またノックダウン細胞では、ニトロチロシン免疫陽性シグナルや、CMXRosの染色性が増強することが明らかとなった。

ところでHPGB過剰発現の48時間以降では、ミトコンドリア膜電位指示薬MitotrackerのシグナルとHPGBの免疫陽性シグナルとが共染色されにくくなること、すなわちHPGBが局在するミトコンドリアでは膜電位（機能）が低下することが示唆されている。そこでHPGBが機能低下したミトコンドリアの廃棄（マイトファジー）に関与する可能性を検討したところ、10 μ M CCCPを12時間処置したHPGB過剰発現細胞では、HSP60およびLC3免疫陽性シグナルの共局在が見られ、またこのシグナルはHPGBの免疫陽性シグナルとも完全に重なることが明らかとなった。

以上より、内因性のHPGBはミトコンドリアの膜電位維持に必須の役割を果たすほか、ミトコンドリアにおけるROS産生に抑制的に働く分子であることが示され、またHPGBの発現上昇はマイトファジーの誘導に関係しうる可能性が示された。

(3) HPGBの機能ドメイン

まず部分欠失体 Δ 20-49_HPGBでは、ミトコンドリアの断片化作用だけでなく、他のミトコンドリアとの融合阻害作用も大きく減少することを確認した（約20%まで低下）。

なお Δ 20-29_HPGBでは融合阻害能が野生型と同等であったことから、30~49番目のアミノ酸残基についてアラニンスキャニングを行ったところ、37番目のチロシンの置換体で64%、48番目のスレオニンの置換体で44%、49番目のセリンの置換体で48%まで融合阻害能が減少することがわかった。

したがってHPGBの正常な機能発現には、分子中のスレオニン残基やセリン残基など、複数の（リン酸化修飾を受けうる）アミノ酸が重要な役割を担うことが示された。

(4) 膵 β 細胞特異的過剰発現マウス (B-Tg)

まずB-Tgの膵島ではHPGBの免疫陽性シグナルが増強されていること、一方で高脂肪食を負荷した野生型マウスの膵島では同シグナルが有意に減弱することを確認した。

B-Tgはメンデルの法則に従った遺伝子型割合で誕生するなど定常時には大きな異常を認めなかったが、高脂肪食負荷条件下でいくつかの表現型変化が認められた。まず高脂肪食負荷群では、体重、血糖値、血中インスリン値の経時的増加が通常食負荷群と比較して有意に亢進していたが、野生型とB-Tgの間では差は認められなかった。経口糖負荷試験でも、耐糖能については遺伝子型間で差が認められなかった。しかし、同試験でのグルコース誘発性インスリン分泌が高脂肪食を負荷したB-Tgでは有意に亢進していた。

そこでこの分子基盤について膵組織切片の解析から評価を行ったところ、高脂肪食を負荷したB-Tgでは、平均膵島サイズや、Ki-67陽性細胞数が増加することが見出された他、同マウスでは、高脂肪食負荷によってもたらされる4-HNE免疫陽性シグナルの増強が大きく抑制されることが明らかになった。

以上の結果から、膵 β 細胞でのMIFIの過剰発現は、高脂肪食負荷時（2型糖尿病下）特異的に、細胞増殖の亢進や酸化ストレスの軽減作用を示し、膵 β 細胞のインスリン分泌に促進的に働くことが明らかとなった。

(6) 心筋特異的過剰発現マウス (C-Tg)

C-Tgについてはイムノプロットにより蛋白発現の増加を確認した。C-Tgもまた、メンデルの法則に従った遺伝子型割合で誕生し、生後の体重増加や5~7週齢時の心エコーのパラメータも正常であった。一方で加齢マウスやTAC手術を行ったマウスでは、前者のC-Tgで心重量の抑制傾向が、後者のC-TgでTAC手術により誘発される心重量増大や左室内径増大が亢進する傾向を認めた。今後さらに例数を追加すると共に、これら変化の分子基盤解明を進める予定である。

[総括]

以上、本研究から、HPGBが世界初のミトコンドリア内膜融合阻害因子（mitochondrial inner-membrane fusion inhibitor）として意義づけられる種々の知見が集積された。特に *in vitro* 実験とB-Tgの解析成果は、内因性のHPGBはミトコンドリアのROS産生に抑制的に働いているという、本分子の内因性抗酸化ストレス因子としての機能的側面を初めて明らかにした成果といえる。なお、HPGBがマイトファジーの発現に関与しうるという興味深い結果は、本分子が有するミトコンドリア融合抑制作用と関連があると考えられる。すなわち機能低下したミトコンドリア粒子に局在するHPGBが、同粒子のミトコンドリアネットワークからの隔離・孤立化を誘発し、その結果、マイトファジーを促進する可能性が考えられる。今後の研究では、このようなマイトファジーの視点からの研究を併せて行うことにより、HPGB分子そのものに限らず、広く“ミトコンドリアの融合阻害”の生理・病態的意義が明確になると期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

①開 菜摘、張 寧、東 信太朗、新谷 紀人、片木 和彦、井上 直紀、早田 敦子、馬場 明道、橋本 均. HPGBのミトコンドリア融合阻害に関するアミノ酸残基の同定、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2012、2012年9月1日、神戸学院大学ポートアイランドキャン

パス（兵庫県）

②東 信太朗、新谷 紀人、片木 和彦、池田 和哉、河本 舞、開 菜摘、早田 敦子、橋本 均、馬場 明道。ミトコンドリアの融合を阻害する因子であるHPGBはマイトファジーを促進する、第85回日本薬理学会年会、2012年3月14日、京都国際会議場（京都府）

③片木 和彦、東 信太朗、新谷 紀人、池田 和哉、河本 舞、早田 敦子、馬場 明道、橋本 均。ミトコンドリア融合阻害因子 HPGB の分子内機能領域の同定、第119回日本薬理学会近畿部会、2011年7月8日、ウイנק愛知（愛知県）

〔その他〕

ホームページ等

<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 明道 (BABA AKEMICHI)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：70107100

(2)研究分担者

新谷 紀人 (SHINTANI NORIHITO)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：10335367

早田 敦子 (HAYATA ATSUKO)

大阪大学・連合小児発達学研究科・助教

研究者番号：70390812