

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790370

研究課題名(和文)TFAMを中心としたヒトミトコンドリアヌクレオイドの構造および機能の解明

研究課題名(英文)Human mitochondrial DNA nucleoid machinery regulated by TFAM

研究代表者

高崎 伸也(Takazaki, Shinya)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：90435149

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):ミトコンドリアヌクレオイドの機能調節において、TFAMの重要性を明らかにし、TFAMの翻訳後修飾による調節機構を中心に明らかにした。その過程で、TFAMのアセチル化修飾の機構が、核や細胞質では見られないミトコンドリア特有のものであることを示した。この修飾機構は、TFAMのみに限らず、ミトコンドリア内の多くのタンパク質に一般化することができることが分かった。また、アセチル化のみならず、サクシニル化、マロニル化などの翻訳後修飾も同様の機構で行われていることを示した。これらにより、ミトコンドリアにおける翻訳後修飾による新規の調節機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文):We demonstrated the importance of TFAM in functional regulation of human mitochondrial nucleoid and showed the machinery regulated by post-translational modification of TFAM. In addition, we observed the novel mechanism unique to mitochondrial acetylation. The mechanism in mitochondria was different from acetylation in nucleus and cytoplasm. By the mechanism, mitochondrial general protein were acetylated and were functionally regulated. Moreover, we identified that by the similar mechanism, mitochondrial protein were also succinylated and malonylated and were functionally regulated.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：ミトコンドリア ヌクレオイド 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

ヒトミトコンドリア DNA (mtDNA) は、ヌクレオイドと呼ばれる構造をとり、必要に応じてその構造を変化させ、転写、複製等を様々な調節することで、ミトコンドリアのエネルギー産生や代謝等の機能を適切に調節している。

我々は mtDNA がヌクレオイド構造をとるのに重要なタンパク質として、ミトコンドリア転写因子 A (TFAM) を同定した。最初 TFAM は転写因子として同定されたが、high mobility group (HMG) ファミリー (一般的に非特異的に DNA と結合し曲げる機能を持つ) に属する TFAM が、一つの mtDNA に対して 1000 個もの TFAM が結合していること (ref. 1)、細胞中の TFAM のほとんどが mtDNA と結合して存在しているということ (ref. 2)、さらに TFAM が転写機能とは関係なく mtDNA の量を調節しているということ (ref. 3)、示した。

1. Takamatsu, C., Umeda, S., Ohsato, T., Ohno, T., Abe, Y., Fukuoh, A., Shinagawa, H., Hamasaki, N., and Kang, D. (2002) EMBO Rep 3(5), 451-456

2. Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N., and Kang, D. (2003) Nucleic Acids Res 31(6), 1640-1645

3. Kanki, T., Ohgaki, K., Gaspari, M., Gustafsson, C. M., Fukuoh, A., Sasaki, N., Hamasaki, N., and Kang, D. (2004) Mol Cell Biol 24(22), 9823-9834

2. 研究の目的

TFAM に関して得られた知見から、TFAM は、mtDNA に対していたるところに結合し packaging を行い、さらに様々な環境の変化などによりその質や量を変化させ、それによりヌクレオイドの構造を変化させ、ヌクレオイドの様々な機能を調節するという、TFAM を中心としたヌクレオイドの機能調節機構があるという仮説を立てた。

そこで、(1)機能調節機構と(2)立体構造の二つの面から、総合的に解析を行い、この仮説を証明しその機構を詳細に解明することを目的とした。(1)機能調節機構の面からは、特に TFAM の翻訳後修飾と分解に着目し、TFAM 自身の分子機構から、TFAM 機能調節タンパク質を含めたより広い範囲の機構までの解析を目指した。(2)立体構造の面からは、X線結晶構造解析による TFAM/mtDNA 複合体の原子レベルの構造から、原子間力顕微鏡によるヌクレオイド全体レベルの構造までの解析を目指した。

3. 研究の方法

(1)機能調節の面から

翻訳後修飾や変異により作製した TFAM を用いて、様々な mtDNA との結合、転写能等を評価した。翻訳後修飾においては、修飾酵素、修飾部位や修飾率などを詳細に調べた。

新規のアセチル化修飾機構について、TFAM を用いて、条件検討、修飾調節機構、修飾部位、修飾率や脱アセチル化を詳細に調べた。TFAM 以外の 40 種類程度のミトコンドリアタンパク質について、新規のアセチル化機構を調べ、より一般に新規のアセチル化機構をとるかどうか調べた。またその詳細を明らかにするために、修飾率、修飾部位や脱アセチル化を調べた。また、ミトコンドリアにおける特異性およびその機構についても調べた。

サクシニル化およびマロニル化において、同様の機構がとられるかどうかを同様に調べた。

(2)構造の面から

TFAM の結晶構造解析のために、TFAM の wild type および様々な変異体、酵母のホモログタンパク質およびその様々な変異体について、タンパク質単独および数種類の mtDNA 断片との複合体を作製し、構造解析を試みた。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリアヌクレオイドの機能調節において、TFAM の重要性を明らかにし、TFAM の翻訳後修飾による調節機構を中心に明らかにした。その過程で、TFAM のアセチル化修飾の機構が、核や細胞質では見られないミトコンドリア特有のものである特有のものであることを示した。この修飾機構は、TFAM のみに限らず、ミトコンドリア内の多くのタンパク質に一般化することができることが分かった。また、アセチル化のみならず、サクシニル化、マロニル化などの翻訳後修飾も同様の機構で行われていることを示した。これにより、ミトコンドリアにおける翻訳後修飾による新規の調節機構を明らかにした。

(2) 結晶構造解析に必要な様々なサンプルを調製した。

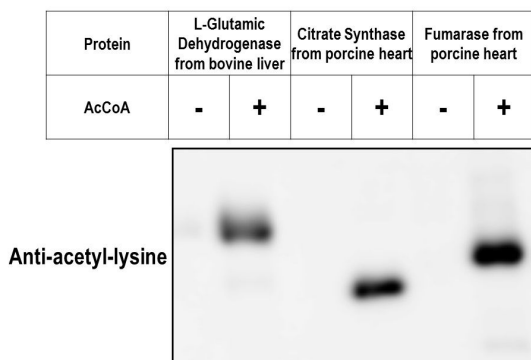


図1. ミトコンドリアタンパク質に特有の機構によるアセチル化。
L-Glutamic Dehydrogenase from bovine liver, Citrate Synthase from porcine heart および Fumarase from porcine heart において、Anti-acetyl-lysine を用いたウエスタンブロッティングにより、ミトコンドリア特有のアセチル化の検出を行った。

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8件)

1. Fang, J., Uchiyumi, T., Yagi, M., Matsumoto, S., Amamoto, R., Takazaki, S., Yamaza, H., Nonaka, K., and Kang, D. (2013) Dihydro-orotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction, *Bioscience reports* 33, e00021.
2. Fang, J., Uchiyumi, T., Yagi, M., Matsumoto, S., Amamoto, R., Saito, T., Takazaki, S., Kanki, T., Yamaza, H., Nonaka, K., and Kang, D. (2012) Protein instability and functional defects caused by mutations of dihydro-orotate dehydrogenase in Miller syndrome patients, *Bioscience reports* 32, 631-639.
3. Yagi, M., Uchiyumi, T., Takazaki, S., Okuno, B., Nomura, M., Yoshida, S., Kanki, T., and Kang, D. (2012) p32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation: importance of its RNA-binding ability, *Nucleic acids research* 40, 9717-9737.
4. Fujino, T., Ide, T., Yoshida, M., Onitsuka, K., Tanaka, A., Hata, Y., Nishida, M., Takehara, T., Kanemaru, T., Kitajima, N., Takazaki, S., Kurose, H., Kang, D., and Sunagawa, K. (2012) Recombinant mitochondrial transcription factor A

protein inhibits nuclear factor of activated T cells signaling and attenuates pathological hypertrophy of cardiac myocytes, *Mitochondrion* 12, 449-458.

5. Nakata, Y., Taniguchi, G., Takazaki, S., Oda-Ueda, N., Miyahara, K., and Ohshima, Y. (2012) Comparative analysis of cells and proteins of pumpkin plants for the control of fruit size, *Journal of bioscience and bioengineering* 114, 334-341.
6. Matsumoto, S., Uchiyumi, T., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T., and Kang, D. (2012) Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins, *Mitochondrion* 12, 391-398.
7. Matsumoto, S., Uchiyumi, T., Tanamachi, H., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T., and Kang, D. (2012) Ribonucleoprotein Y-box-binding protein-1 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA, *The Biochemical journal* 443, 573-584.
8. Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., Kang, D., and Hamasaki, N. (2012) Arg 901 in the AE1 C-terminal tail is involved in conformational change but not in substrate binding, *Biochimica et biophysica acta* 1818, 658-665.

[その他]

ホームページ

長崎国際大学薬学部臨床検査学ホームページ

<http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/cc1m/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高崎 伸也 (Takazaki Shinya)

長崎国際大学

研究者番号：90435149

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：