

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510304

研究課題名(和文)ミトコンドリア分裂因子Drp1のメチル化修飾による細胞機能制御機構の解析

研究課題名(英文)Modification of mitochondrial fission factor, DRP1 affects the biotransformation of glucose through sulfur-containing amino acid metabolism.

研究代表者

山本 雄広 (Yamamoto, Takehiro)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50383774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは様々な代謝系の場として機能し、刺激によって自身の形態を変化させ、細胞の恒常性維持に寄与する。近年、ストレス応答に起因するメチオニン代謝がその形態制御に作用することが示されているが、詳しい機序は不明であった。本研究では、形態制御に関与する分子群の翻訳後修飾に着目し、分裂因子DRP1およびGFERがメチル化修飾を受けることを明らかにした。また、人為的にメチオニン回路を抑えると、解糖系の抑制とともにDRP1自体の発現量が低下し、その断片化が抑えられることがわかった。以上からメチオニン代謝を介したミトコンドリアの形態制御により細胞全体のエネルギー代謝を調節する一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dynamics (fusion vs fission) have been closely linked to cell fate and homeostasis to maintain mitochondrial functions. Recent studies showed that posttranslational modifications of several mitochondrial GTPases are involved in regulation of their shape. Here, we showed evidences that mitochondrial fission factor, DRP1 (dynamin-like protein 1) and GFER (growth factor, augments of live regeneration) were arginine-methylated in vitro. Furthermore, artificial inhibition of methionine cycle using modified culture medium reduced the expression level of DRP1 coincident with the suppression of glycolytic flux. On the contrary, we found that activation of glycolytic flux caused mitochondrial fission through the DRP1 induction with murine macrophage differentiation model. These results suggest that changes in mitochondrial shape through the regulation of methionine metabolism might alter the balance of glucose utilization between glycolysis and oxidative phosphorylation.

研究分野：細胞生化学

キーワード：メチル化 ミトコンドリア Drp1 Gfer 解糖系

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物にとってエネルギー産生工場として機能するばかりでなく、アポトーシスによる細胞の生死、老化を規定する重要な細胞内小器官である。また、ミトコンドリアの形態は古くから観察されており、分裂と融合を繰り返す動的なオルガネラとして認識されている。その形態は細胞種によって様々で、細長く枝分かれした構造や小さく断片化したもの、精子のように螺旋状に巻きついた構造など、組織の違いや刺激によってもさまざまな形態をとる。

ここ 10 年ほどで酵母やショウジョウバエの遺伝学的解析により、ミトコンドリア形態に関わる因子の同定が精力的に行われてきた。分裂・融合に関わる分子群は動物種において広く保存されており、Mfn (mitofusin), Opa1 (optic atrophy1) などの融合因子、Drp1 (dynamamin-related protein1) などの分裂因子が知られているが、これらは GTPase であり GTP 加水分解活性により機能を持つ。これらの分子の KO マウスは胎生致死を引き起こすことから、ミトコンドリアの細胞内での分布・形状が個体発生中の形態形成に重篤な影響を及ぼす可能性が示唆されている。そのなか、細胞内のメチオニン代謝とミトコンドリアの形態変化との関連を想像させる現象が報告されている。

そのなか我々は、ストレス応答性に産出されたガスシグナルである一酸化炭素(CO)がヘム含有酵素 CBS の活性を阻害することでメチオニン代謝を活性化し、タンパク質のメチル化を亢進することを発見した(Yamamoto T. et al., 2011)。さらに CO によってメチル化動態が変化するタンパク質をプロテオミクス技術を用いて検討したところ、単離ミトコンドリア画分においてそのメチル化パターンに大きな差が認められ、ミトコンドリア分裂因子である DRP1 がメチル化候補分子として同定された。DRP1 は近年、リン酸化、SUMO 化、S-ニトロシル化など多数の翻訳後修飾を受けると報告されている。このうち 637 番目のセリン残基は種を超えて広く保存され、この部位は PKA によってリン酸化され、GTPase 活性を低下させることでミトコンドリアの伸長およびクリステの発達を惹起する。結果、ミトコンドリアを機能亢進させることで飢餓状態に適応することが明らかとなった(Gomes LC et al., Nat Cell Biol, 2011)。このように、翻訳後修飾動態が DRP1 の機能調節に重要な影響を与える可能性が考えられる。

本提案研究では、メチオニン代謝変動を介したミトコンドリアの機能制御を理解するうえで、その DRP1 をはじめとしたミトコンドリア分裂因子のメチル化修飾に焦点を当て、メチル化修飾によるミトコンドリア形態と活性の変化、それに伴う代謝制御、細胞増殖、

細胞死などの細胞機能制御機構を解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアは細胞の ATP の主たる供給源であるばかりでなく、老化やアポトーシスなどに関わる重要なオルガネラである。近年、ミトコンドリアの形態変化と細胞機能との関連が明らかになりつつあり、関与する分子基盤も揃ってきた。そのなか、申請者はミトコンドリア分裂因子 DRP1 がメチオニン代謝の変動によりメチル化修飾を受け得ることを発見した。本研究ではストレス応答性に惹起される DRP1 のメチル化によるミトコンドリアの形態変化・活性制御それに伴う細胞機能の調節機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究においては、以下の手法で研究を遂行した。

(1) メチル化標的候補分子である DRP1 および GFER を GST タグ融合タンパク質を大腸菌リコンビナントタンパク質を精製し、各アルギニンメチル化酵素( PRMT1 ~ 8 )と in vitro で反応させ、メチル化修飾の有無を検討した。

(2) 細胞内における GFER のメチル化動態を確認するためにメチル化 GFER ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体を作成した。

(3) マウスマクロファージは回収 4 日前にチオグリコネートを腹腔内注射することにより得た。単離したマクロファージは <sup>13</sup>C-ラベルの安定同位体グルコースを RPMI1640 培地に 15 分間添加し、回収後抽出した低分子代謝物はキャピラリー電気泳動型質量分析装置で測定し、取り込まれたグルコースを追跡し、ミトコンドリアの形態変化が糖代謝に与える影響を検討した。

(4) メチオニン代謝がミトコンドリア形態および糖代謝に与える影響を調べるためにメチオニンおよびコリン欠乏培地を用いて各種細胞株および腹腔マクロファージを培養した。

## 4. 研究成果

(1) ミトコンドリア形態制御に関わる分子群のアルギニンメチル化修飾

メチオニン代謝が介するメチル化修飾がミトコンドリアの形態制御に関与する機構を明らかにするために形態制御に関与するタンパク質のうち、1 次配列にアルギニンを含む特徴的な繰り返し配列を持つ DRP1, MFN2, および最近、Drp1 の分子架橋に重要であると

報告されている GFER ( Todd, LR et al., Mol. Bio. Cell, 2010 ) について、GST タグを付加した大腸菌リコンビナントタンパク質を作製した。これらを用い、同じく大腸菌リコンビナントタンパク質のアルギニンメチル化酵素 PRMTs とを試験管内で 1 対 1 反応させた。その結果、DRP1 および GFER において、メチル基由来のシグナルが認められたことからこれらのミトコンドリア形態制御分子がメチル化修飾を受け得る可能性を示唆する。

## ( 2 ) ミトコンドリアシャペロンタンパク質 GFER の修飾部位の同定

上述 ( 1 ) の実験で新規メチル化候補タンパク質と考えられる、DRP1 および GFER について、どのタイプのメチル基転移酵素により修飾を受けるかを明らかにするために、上記リコンビナントタンパク質と現在哺乳類で活性を有することが報告されている PRMT1 ~ 8 を用いて in vitro methylation assay を施行した。その結果、DRP1 は PRMT1 および PRMT4 においてシグナルが認められた。しかしながら DRP1 に取り込まれたメチル基由来のシグナルは特異的ではあるものの極めて微弱であるため、修飾部位の同定までは未だ至っていない。今後はタグの種類を変える、truncated mutants を用いて感度を挙げる方策を講じる必要がある。一方、GFER については PRMT1 および 3 についてシグナルが認められた。GFER については各種変異体を作製し解析したところ、7 番目のアルギニン残基が PRMT1 によって修飾を受けることが明らかになった。次にメチル化ペプチド ( GFER-R7ADMA ) を抗原としてメチル化型 GFER を認識するポリクローナル抗体を作成した。得られた抗体を用いて解析したところ、細胞内における GFER は大部分がミトコンドリアの膜間腔に局在するが、メチル化型 GFER は細胞質に存在することが明らかになった。今後はメチル化型 GFER の細胞質局在が DRP1 の局在・活性にどのように影響するかを解析する。

## ( 3 ) メチオニン代謝制御によるミトコンドリア形態制御と代謝活性について

最近の研究から、メチル基転移反応は細胞内のメチオニン代謝動態によって大きく影響することが分かってきた。そのなか我々はストレスによって産出された CO ガスがメチオニン代謝中の酵素 CBS の酵素活性を modulate することでメチル基転移反応を活性化することを報告した ( Yamamoto T., et al., 2011; Shintani, T., Yamamoto, T., et al., 2009 )。本研究では、環境要因・栄養因子によるメチオニン代謝変動が DRP1 の発現状態・修飾動態に影響を与え、ミトコンドリア機能に影響を与える可能性を検証するため、メチオニンおよびコリンを欠乏させた培地を作製し、こ

れをもちいて、各種培養細胞を培養したところ、上記欠乏培地での培養下において、メチオニン代謝のリモデリングが起き、DRP1 自体の発現レベルが低下し、ミトコンドリアの断片化が抑えられることが明らかとなった。

## ( 4 ) マクロファージ分化系におけるミトコンドリアの形態変化と糖代謝制御

炎症担当細胞であるマクロファージはその機能の違いによって幾つかのサブタイプに分類されており、それぞれのタイプにおいて代謝特性が異なる。腹腔マクロファージ分化系を用いた実験から、炎症性マクロファージ ( M1 型 ) は解糖系が活性化している事は既知の事実であるが、タンパク質の発現解析の結果、M1 型において、DRP1 のタンパク発現量が増加し、ミトコンドリアの断片化が起こることを発見した。その際、メチオニン代謝に関わる酵素群の発現パターンに変化が生じ、それに起因して最近我々が発見した解糖系酵素 PFKFB3 のメチル化修飾 ( Yamamoto T. et al., Nat. Commun., 2014 ) が M1 型において活性化しており、解糖系の亢進とミトコンドリアの断片化が協調して起こることが示された。さらに安定同位体標識グルコースを用いた flux 解析から、ミトコンドリアが断片化した M1 マクロファージでは、取り込まれるグルコースが増加し解糖系が亢進する一方、TCA には入らず乳酸産生に使われることが明らかとなった。

以上の結果から、メチオニン代謝を介したミトコンドリア形態制御を通じて、細胞全体のエネルギー代謝を調節する機構の存在を示した。しかしながら、ミトコンドリア形態制御の直接の作用点の同定に関しては未だ未解決であり、今後、メチル化修飾によりミトコンドリア分裂因子の活性調節など詳細な解析が必要である。

## 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 7 件 )

- ( 1 ) Ohmura M, Hishiki T, Yamamoto T, Nakanishi T, Kubo A, Tsuchihashi K, Tamada M, Toue S, Kabe Y, Saya H, and Suematsu M. (2015) Impacts of CD44 knockdown in cancer cells on tumor and host metabolic systems revealed by quantitative imaging mass spectrometry. Nitric Oxide. ( 査読あり ) Vol. 46, 102-113.  
doi: 10.1016/j.niox.2014.11.005.
- ( 2 ) 山本雄広, 高野直治, 石渡恭子, 末松 誠

(2014)「メチオニン代謝の変動ががんの代謝を決める～アルギニンメチル化修飾によるがん細胞の糖代謝制御」実験医学(査読なし)Vol.32, No.15(増刊)p78-85

- (3) **Yamamoto T**, Takano N, Ishiwata K, Ohmura M, Nagahata Y, Matsuura Y, Kamata A, Sakamoto K, Nakanishi T, Kubo A, Hishiki T, and Suematsu M. (2014) Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. Nature Communications (査読あり) Vol.5, 3480.  
**doi:10.1038/ncomms4480**
- (4) Bao Y, Mukai K, Hishiki T, Kubo A, Ohmura M, Sugiura Y, Matsuura T, Nagahata Y, Hayakawa N, **Yamamoto T**, Fukuda R, Saya H, Suematsu M, and Minamishima YA. (2013) Energy management by enhanced glycolysis in G1 phase in human colon cancer cells in vivo and in vitro. Molecular Cancer Research (査読あり)Vol. 11, p973-985  
**doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0669-T.**
- (5) Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, **Yamamoto T**, Yanagawa H, Suematsu M, and Saya H. (2012) Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. Cancer Research(査読あり) Vol.72, p1438-1448  
**doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3024.**
- (6) Hishiki T, **Yamamoto T**, Morikawa T, Kubo A, Kajimura M and Suematsu M. (2012) Carbon monoxide: Impact on remethylation and transsulfuration metabolism and its pathophysiological implications. Journal of molecular medicine (査読あり)Vol.90, No.3, p245-254  
**doi: 10.1007/s00109-012-0875-2.**
- (7) 末松 誠, **山本雄広**, 菱木貴子, 加部泰明, 梶村眞弓 (2012)「ガス分子による代謝システム制御機構の系統的探索と医学応用」実験医学(査読なし) Vol.30 No.2 (増刊), 90-97

〔学会発表〕(計 7件)

- (1) **山本雄広**, 高野直治, 石渡恭子, 末松誠「アルギニンメチル化修飾が制御するがん細胞の代謝」第37回日本分子生物学会(ワークショップ「生体酸素ダイナミクスの感知・応答研究の最前線」), 2014年11月26日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

(2) **山本雄広**, 高野直治, 石渡恭子, 大村光代, 長畑善子, 松浦友美, 久保亜希子, 菱木貴子, 末松誠「解糖系酵素 PFKFB3 のメチル化修飾によるがん細胞の糖代謝制御」第87回日本生化学会、2014年10月16日、京都国際会議場、京都府京都市

(3) **山本雄広**「ミトコンドリアの形態変化による細胞内エネルギー代謝調節機構の解明」第3回マトリョーシカ型生物学研究会 2014年7月13日、神戸大学、兵庫県神戸市

(4) **山本雄広**, 石渡恭子, 高野直治, 大村光代, 菱木貴子, 長畑善子, 末松 誠 「アルギニンメチル化酵素 PRMT1 の細胞内局在を反映した糖代謝酵素の核内メチル化機構」第36回日本分子生物学会 2013年12月5日、ポートピアホテル、兵庫県神戸市

(5) **山本雄広**, 石渡恭子, 高野直治, 大村光代, 菱木貴子, 長畑善子, 末松 誠 「解糖系酵素 PFKFB3 のメチル化制御はがん細胞の酸化ストレス耐性獲得に重要である」第86回日本生化学会 2013年9月13日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

(6) **山本雄広**, 石渡恭子, 高野直治, 菱木貴子, 長畑善子, 末松 誠「一酸化炭素(CO)を介したアルギニンメチル化制御による糖代謝リモデリング機構の解明」第85回日本生化学会 2012年12月16日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

(7) **Yamamoto T**, Ishiwata K, Takano N, and Suematsu M. 「Carbon monoxide regulates directional biotransformation of glucose via protein arginine methylation」第33回内藤コンファレンス「酸素生物学：酸素濃度に対する生物応答とその制御破綻による疾患」2012年6月28日、ガトーキングダム、北海道札幌市

〔図書〕(計 1件)

末松 誠, **山本雄広**, 梶村眞弓, 診断と治療社, 酸化ストレスの医学(改訂第2版)「COとシグナル伝達」2014, p137-144

〔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  
<http://www.gasbiology.com>

## 6．研究組織

### (1) 研究代表者

山本 雄広 (YAMAMOTO TAKEHIRO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：50383774