

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790917

研究課題名(和文) MASCアッセイ法を用いたエネルギー代謝関連遺伝子の機能同定

研究課題名(英文) Identification of novel energy metabolism-related genes by MASC assay

## 研究代表者

藤川 誠 (Fujikawa, Makoto)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90573048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：私達は食事から得られるエネルギーを使うことで運動や体内の機能調節(例えば体温維持)しているため、このエネルギー代謝の制御システムが破綻すると様々な失調を来す。効率の良いエネルギー代謝活性の新規測定法を用いてエネルギー代謝制御に関わる新しい因子を探索した。その因子は飢餓状態になると細胞内で増加することに加えて、エネルギー産生に関わる酵素の活性を高めることが明らかになった。今後はがんや糖尿病のようなエネルギー代謝制御に関与している疾患にこの新規因子がどのように影響しているのかを調べて、これら疾患の予防や治療に対する新たな知見が得られるように研究を進めていく。

研究成果の概要(英文)：It is important for us to regulate accurately biological energy metabolism because of its demand for usual action, thermoregulation and so on. We developed and utilize a screening assay for novel energy metabolic regulators. As a result, it was discovered that the new factor is increased during deprivation of energy and activates the enzyme for energy production. In future, we aim to analyze how the new factor relate to the metabolic disorders which is such as diabetes in order to help prevent and cure those.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エネルギー代謝制御

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病に対する関心が深まる中で、食事で得られたエネルギーがどのような代謝を経て生命エネルギーに変換されていくかは基礎研究において重要な課題である。また、がんなど様々な疾患において活性酸素種が細胞、特にゲノムに損傷を与えることがその疾病の一因であることから、活性酸素種を解毒するために抗酸化作用のあるポリフェノールなどが注目されている。この活性酸素種の最大の発生源は細胞内小器官の1つミトコンドリアである。ミトコンドリアは私達の生命エネルギー本体である ATP の 90%以上を合成する生命エネルギーの工場である。

つまり、私達の健康への関心事は生命エネルギー代謝がどのようになされているかが深く関わっている。

生命エネルギーATPは1日に約60kgも合成されることから、ATPはただひたすら合成されるものであって、代謝制御などあるものだろうか?という疑問があるかもしれない。しかし、ミトコンドリアの呼吸によるATP合成は電子伝達系と呼ばれる複雑な反応過程が常にスムーズに作動することで膜電位を発生させ、この電気エネルギーを用いることでATP合成している。従って、酸素などこの反応系に必要なものが不足するとたちどころに機能しなくなる。さらに悪いことには、この膜電位が消失してしまうとATP合成酵素はATPの合成とは逆にATPを加水分解してしまうのである。

上記のことを考えてみてもATP合成制御が精緻になされていることが想像される。しかし、ATP合成反応の制御機構は特に高等生物において、ほとんどわかっていないのである。このような状況の一因にATP合成活性を測定することが困難であることが挙げられる。つまり、簡単に測定できない反応の制御機構を調べることは簡単ではないということである。

そこで私はヒト培養細胞を用いた簡便なATP合成酵素の活性測定法を開発した(MASCアッセイ)。この方法は、96ウェルプレートに細胞を培養して、数回の反応液の交換を行った後、新しく合成されるATPをルシフェラーゼという酵素を用いて検出する方法である。従来は複雑な作業過程を経てミトコンドリアを精製してからATP合成活性を測定していたが、プレート上で簡単に測定できることから、様々なスクリーニング実験に応用できることから、上述したような問題を解決する強力な手法であると考えられた。

### 2. 研究の目的

MASCアッセイ法を利用して、ヒト培養細胞のATP合成活性を制御する新しい因子をスクリーニングすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、MASCアッセイ法についてである。始

めにヒト培養細胞を接着培養させた96ウェルプレートにPBS(-)バッファーで洗浄する。次に、低温下でストレプトリシン0と呼ばれる蛋白質をプレートに加えて細胞膜に結合させる。細胞膜に結合しなかった蛋白質を洗い流した後に37℃に温度を上げると、ストレプトリシン0の複合体が細胞膜に穴を空けるので、これを利用して細胞質成分を洗い流す。この穴は20nm程度なので細胞小器官などはほとんど細胞内にとどまる。最後に、呼吸に必要な基質・ADP・ルシフェリン・ルシフェラーゼを添加してATP合成反応を開始させ、ルミノメーターという測定器で発光を検出する。

ATP合成酵素の活性に関与する因子をスクリーニングする方法は、ミトコンドリアに局在する蛋白質の発現をRNAiで抑制したときのATP合成活性をMASCアッセイ法で測定することで実施した。ミトコンドリアに局在する蛋白質はミトカルタと呼ばれるデータベースによると1098個である。その内、機能的によく調べられていない蛋白質が150個ほど存在したので、この蛋白質をコードする遺伝子配列を元にこれらのmRNAに対するmicroRNAを発現するプラスミドベクターライブラリーを構築した。

このmicroRNA発現ライブラリープラスミドをヒト培養細胞に遺伝子導入して、遺伝子発現を抑制されたことが見込まれるヒト培養細胞のATP合成活性をMASCアッセイで測定した。

### 4. 研究成果

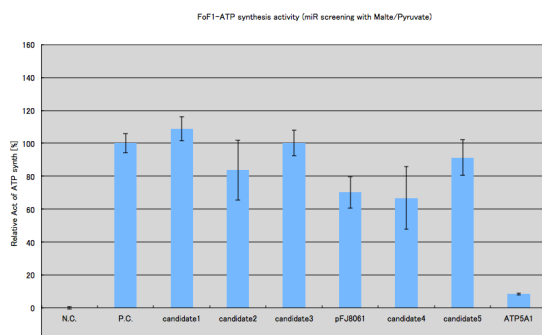
145種類の遺伝子に対するmicroRNA発現ベクターを1遺伝子に対して2種類ずつ作製したライブラリーを構築した。但し、各々の遺伝子に対する発現抑制効果は確認していない。

ポリエチレンイミンという陽イオン性ポリマーを利用してライブラリープラスミドDNAを子宮頸がん由来のヒト細胞に導入した。導入の翌日からプラストサイジンという抗生物質を用いてプラスミドが導入された細胞だけが生育する条件で培養した。事前の条件検討では、ATP合成酵素の必須サブユニットに対するmicroRNA発現プラスミドを用いた。その結果、プラスミドDNAの導入48時間後に再度遺伝子導入して、さらに48時間、合計96時間培養することで十分な発現抑制効果とATP合成活性の低下を確認したので、実際のスクリーニングの条件もこれに従って行った。

スクリーニングの結果、145遺伝子の中から6遺伝子の発現を抑制することでATP合成活性に影響する事がわかった。6遺伝子の中で5遺伝子は発現抑制するとATP合成活性を低下させ、残り1遺伝子は逆にATP合成活性が上昇した。

上述した一次スクリーニングの結果を確認するために、6遺伝子を安定的に発現抑制す

るヒト細胞を作製した。安定発現抑制細胞の作製はレトロウイルスを用いたゲノムへの遺伝子導入法を用いて、抗生物質による薬剤選択により行った。



このようにして作製した安定発現抑制細胞のATP合成活性を再度測定したところ、6遺伝子中3遺伝子について再現性が得られた。この3遺伝子はいずれも発現抑制するとATP合成活性を低下させた。

再現性を認めた3遺伝子の安定発現抑制細胞についてATP合成酵素を含む呼吸鎖複合体への影響を見るため、非変性ゲル電気泳動法でこれら複合体を分離し免疫ブロッティング法で検出した。その結果、3遺伝子中1遺伝子はATP合成酵素の複合体が消失していることがわかった。この遺伝子はスクリーニングライブラリーの番号からpFJ8061と呼んでいる。

次に、遺伝子pFJ8061を異所的に発現させて、ミトコンドリアに局在していることを確認した。pFJ8061の安定発現抑制細胞は、ATP合成酵素量を減弱させるが、呼吸鎖複合体へは影響しないこともわかった。ATP合成酵素を構成する蛋白質やそれをコードするmRNAの発現量を解析した結果、pFJ8061遺伝子はATP合成酵素を構成する各サブユニットの発現・翻訳へは影響しなかった。一般的にATP合成酵素複合体の組み立てに必要な因子を欠損させるとサブ複合体が観察される。しかしpFJ8061の安定発現抑制細胞では組み立て過程で見られる幾つかのサブ複合体は一切認められなかったため、pFJ8061が組み立ての初期段階に参与している可能性が考えられる。

またpFJ8061遺伝子自身の発現制御について調べた。ヒト培養細胞に対してグルコース枯渇させると、有意にpFJ8061遺伝子の発現が亢進した。このことは細胞内のエネルギー状態を感知してpFJ8061の発現量が制御され、pFJ8061蛋白質はFoF1複合体のアセンブリに重要な役割を担っていると推測された。但し、pFJ8061を異所的に過剰発現してもATP合成酵素複合体の量が増加しなかったことからpFJ8061単独ではATP合成酵素複合体量を増加することができず、ATP合成酵素の各サブユニットの発現誘導やミトコンドリア全体の生合成や複合体組み立てに関する因子と協調的に働くことが必要と見られる。

## 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4件)

Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Asano Y, Komuro I and Takashima S, Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies GO/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation, Proc Natl Acad Sci USA, 査読有り, vol. 111, 2014年, p273-8

Fujikawa M, Ohsakaya S, Sugawara K and Yoshida M, Population of ATP synthase molecules in mitochondria is limited by available 6.8-kDa proteolipid protein (MLQ), Genes Cells, 査読有り, vol19, 2014年, p153-60

Sugawara K, Fujikawa M and Yoshida M, Screening of protein kinase inhibitors and knockdown experiments identified four kinases that affect mitochondrial ATP synthesis activity, FEBS Lett, 査読有り, vol587, 2013年, p3843-7

Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J and Yoshida M, Assessing Actual Contribution of IF1, Inhibitor of Mitochondrial FoF1, to ATP Homeostasis, Cell Growth, Mitochondrial Morphology, and Cell Viability, J. Biol. Chem., 査読有り, vol.287, 2012年, p18781-7

〔学会発表〕(計5件)

Fujikawa M and Yoshida M, A novel mitochondrial protein m62, which is identified by MASC assay screening, is essential for FoF1-ATP synthase activity and the mRNA level is regulated by the amount of glucose supply, Molecular Biology Society of Japan, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡

Fujikawa M and Yoshida M, Novel factors essential for human mitochondrial FoF1-ATP synthase activity found by MASC (Mitochondrial Activity of SLO-permeabilized Cells) screening, EBEC (European Bioenergetics Conference), 2012年09月15日~2012年09月20日, ドイツ(フライブルグ)

T. Suzuki, M. Fujikawa, J. Nakamura, M. Yoshida, IF1 (mitochondrial FoF1 inhibitor protein); from single molecule to knock-out mouse, EBEC (European Bioenergetics Conference), 2012年09月15日~2012年09月20日, ドイツ(フライブ

ルグ)

K. Sugawara, M. Fujikawa, M. Yoshida, Screening of protein kinase inhibitors that affect ATP synthesis activity using MASC assay, EBEC (European Bioenergetics Conference), 2012年09月15日~2012年09月20日, ドイツ (フライブルグ)

Fujikawa M, Mori M, Sugawara K and Yoshida M, Functional identification of unknown genes localized at mitochondria using MASC assay, Japan Society of Cell Biology, 2012年05月28日~2012年05月31日, 神戸

〔図書〕(計2件)

Makoto Fujikawa, 日本生物工学会, 波紋疾走 ほとばしる生命エネルギー, 2014年, p1  
Imamura H, Ando T and Fujikawa M, 生物物理, Distribution and Dynamics of Intracellular ATP Level, and their Regulation, 2013年, p20-23

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤川 誠 (FUJIKAW, Makoto)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90573048