

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460066

研究課題名(和文)ミトコンドリア外膜のトラフィックを担うタンパク質の構造機能解析とその創薬への応用

研究課題名(英文) Studies on the mitochondrial proteins responsible for the traffic control across mitochondrial outer membrane, and its application for drug design

研究代表者

篠原 康雄 (SHINOHARA, Yasuo)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号：60226157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの外膜には電位依存性アニオンチャンネルと呼ばれるタンパク質が発現しており、このタンパク質が膜の透過性を担保している。本研究ではミトコンドリア外膜の電位依存性アニオンチャンネルとカルニチンパルミトイル転移酵素に注目し、これらの機能を制御することでミトコンドリアの機能制御、ひいては細胞死の制御を実現することを志向した研究を進めた。本研究によって両タンパク質の特性の理解を深めることができた。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial outer membrane is highly permeable for various metabolites and ions. This high permeability is conferred by the voltage dependent anion channel expressed in the outer mitochondrial membrane. The carnitine palmitoyltransferase also present in the mitochondrial outer membrane is also responsible for the translocation of the fatty acids across mitochondrial membranes. In the present study, we focused on these two proteins, and tried to understand their structural and functional properties. These approaches are effective for better understanding of the properties of the mitochondrial outer membrane.

研究分野：生物系薬学

キーワード：ミトコンドリア 電位依存性アニオンチャンネル カルニチンパルミトイル転移酵素

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは内膜と外膜の2つの膜で形成されているが、これらの2つの膜の性質は大きく異なっている。すなわち、内膜を介したH⁺の電気化学ポテンシャル差がATP合成の駆動力として用いられていることもあり、内膜のイオンや溶質に対する透過性は極めて低く保たれているが、外膜には電位依存性アニオンチャンネル (voltage dependent anion channel, VDAC) と呼ばれるタンパク質が発現しており、このタンパク質が分子量 1,500 程度までの溶質やイオンの自由な透過を可能にしている。また、外膜に発現している1型のカルニチンパルミトイル転移酵素 (carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1) も、脂肪酸のミトコンドリアのマトリックス内への移送に関与している。従って、VDACとCPT1がミトコンドリア外膜を介した分子の出入りのゲートキーパーであり、これらのタンパク質の機能を人工的に制御できれば、ミトコンドリアを人為的に操ることも可能になると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル (VDAC) と1型のカルニチンパルミトイル基転移酵素 (CPT1) という2つのタンパク質に注目し、これらのタンパク質の構造と機能をより一層理解することによって、ミトコンドリア外膜におけるトラフィックコントロールの詳細を理解することを目的とした実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 個々の CPT1 アイソザイムとの反応性を calibrate した抗体の調製は以下のように行った。まず CPT1a~1c アイソザイムに比較的保存されたアミノ酸配列を有するペプチドを合成し、これを抗原としてウサギを免疫し、全ての CPT1 アイソザイムを認識し得る抗体を調製した。また、大腸菌の発現系を用いて個々の CPT1 アイソザイムの標準タンパク質を調製し、調製された抗体の個々の CPT1 アイソザイムとの反応性を calibrate した。

(2) 種々の CPT1 は COS7 細胞に発現させることで調製した。このようにして調製された CPT1 の酵素活性の評価に際しては、当該タンパク質を発現させた COS7 細胞からミトコンドリアを調製し、これを palmitoyl-CoA と L-[methyl-³H] carnitine を含む溶液に加え、両者から形成される palmitoyl L-[methyl-³H] carnitine をブタノールで抽出し、³Hのカウントを液体シンチレーションカウンターで測定することで評価した。

(3) VDAC1 の偽遺伝子の探索は NCBI の BLASTN プログラムを用いて行った。アルゴリズムのパラメータとしては、expected threshold 値として 0.0001、word size 値として 2、また filter として "low complexity regions" をそ

れぞれ採用した。また、synteny 解析は既報に従って行った。

4. 研究成果

(1) まず最初に、カルニチンパルミトイル転移酵素 CPT1 に焦点を当てた研究を展開した。CPT1 には肝型 (CPT1a)、筋型 (CPT1b) および脳型 (CPT1c) の3種のアイソザイムをコードする遺伝子が存在し、1c アイソザイムについては酵素活性が無いのではないかという論文が発表されている。しかし、当該論文ではタンパク質の発現レベルの解析が十分に行われておらず、本当に 1c アイソザイムが inert な分子なのか、あるいは単に発現させることができなかっただけなのか、明らかにされていなかった。そこでまず、この点に焦点をあてた研究を行った。研究方法(1)の要領で個々の CPT1 アイソザイムとの反応性を calibrate した抗体を調製し、個々の CPT1 アイソザイムの特異活性を求めた (図1)。その結果、1c アイソザイムが本当に inert な分子であることを明らかにすることができた。また、なぜ 1c アイソザイムが inert であるのかを理解する目的で、キメラを用いた解析を進めた。CPT1 は C 末に触媒活性に関わる領域があるとされているため、C 末を入れ替えたキメラ CPT1 の解析を進めた結果、1c が inert であるのは、その C 末領域のアミノ酸配列に問題があるためではないことを明らかにすることができた。以上の実験結果を発表論文としてとりまとめた。

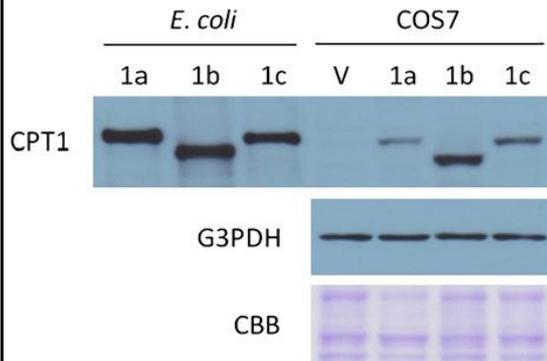


図1. 個々の CPT1 アイソザイムとの反応性を calibrate した抗体を用いた CPT1 の発現レベルの解析結果

(2) 次に VDAC の偽遺伝子に焦点をあてた研究を展開した。我々はこれまでの研究で、ラットのゲノムには 16 種もの VDAC1 の偽遺伝子が存在し、そのうちの 8 つは脳や精巣などの限られた組織で mRNA に転写されていることを明らかにしていた (Mammalian Genome 2012 年)。そこで本研究ではマウスおよびヒトのゲノムも含め、VDAC1 の偽遺伝子についてより丁寧な解析を行った。その結果、ラット、マウス、ヒトのゲノムにそれぞれ 16、15、13 本の VDAC1 の偽遺伝子が、また構造類似性のやや劣る偽遺伝子様の配列がそれぞれ 4、2、1 本存在することが判明した。観察された偽遺伝子の中には、ほぼ完全に cDNA の構造を

保持したものが見られたが、無関係な塩基配列によって分断されているものが多かった。ただ、いずれの偽遺伝子も、本物の遺伝子のイントロン/エクソン boundary を保持しておらず、mRNA が逆転写され、ゲノムに挿入された processed pseudogene であることが明らかになった。また、完全な ORF 領域を保持した偽遺伝子も少なからず見られたが、いずれもナンセンス変異を含み、機能的なタンパク質をコードし得るものは見られなかった。更に、偽遺伝子様の配列が偽遺伝子であるかどうかを明らかにするために更なる解析を進めたところ、図 2 に示すようにラットの BLAST hit R13 あるいは R25 と呼ばれる偽遺伝子様の領域はそれぞれマウスの Gm2988、Gm17072 という偽遺伝子と、またマウスの Gm18656 という偽遺伝子様の領域がラットの RGD1562882 という偽遺伝子と遺伝的に保存されている (synteny である) ことが判明した。ラットとマウスの間で synteny である偽遺伝子は、ラットとマウスが進化の過程において独立した種として分岐する前に形成されたため、両種で遺伝的に保存されている。従って、ラットとマウスの偽遺伝子様の領域が、それぞれマウスとラットに synteny な counterpart を持ち合わせていたということは、これらの偽遺伝子様の領域も、本当の偽遺伝子であることを示す結果である。今回の研究で見出されたラットとマウスの間で synteny な偽遺伝子と偽遺伝子様領域の組み合わせは、単にラットとマウスの進化の歴史を紐解く目的だけでなく、偽遺伝子様の配列を偽遺伝子であると判別するための重要な情報を与えるものであった。以上の結果を発表論文 としてとりまとめた。

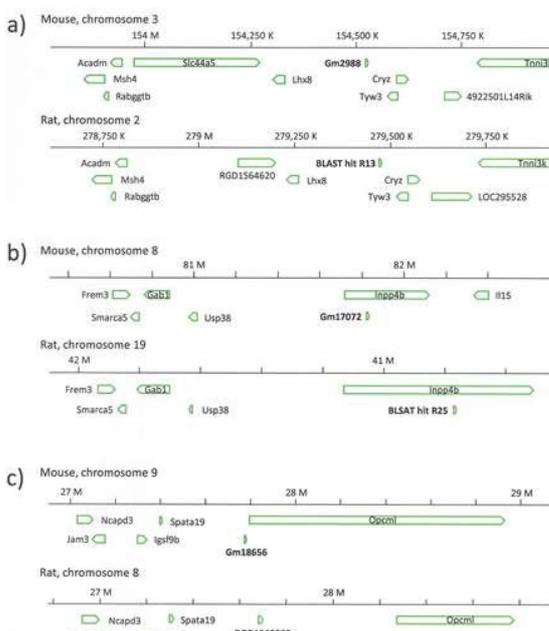


図 2. マウスとラットのゲノムの間で見られた synteny な VDAC1 の偽遺伝子と偽遺伝子様の領域の組み合わせ

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5件)

Yamamoto A, Hasui K, Matsuo H, Okuda K, Abe M, Matsumoto K, Harada K, Yoshimura Y, Yamamoto T, Ohkura K, Shindo M, Shinohara Y. "Bongkrelic acid analogue, lacking one of the carboxylic groups of its parent compound, shows moderate but pH-insensitive inhibitory effects on the mitochondrial ADP/ATP carrier", *Chem Biol Drug Des.* (査読あり) 86(2015)1304-1322. doi: 10.1111/cbdd.12594.

Kuwahara K, Harada K, Yamagoshi R, Yamamoto T, Shinohara Y. "Effects of employment of distinct strategies to capture antibody on antibody delivery into cultured cells", *Mol Cell Biochem.* (査読あり) 404(2015)25-30. doi: 10.1007/s11010-015-2362-x.

Yamamoto T, Matsuo T, Yamamoto A, Yamagoshi R, Ohkura K, Kataoka M, Shinohara Y. "Immunoblotting with peptide antibodies: Differential immunoreactivities caused by certain amino acid substitutions in a short peptide and possible effects of differential refolding of the peptide on a nitrocellulose or PVDF membrane", *Methods Mol Biol.* (査読あり) 1348(2015)303-310. doi: 10.1007/978-1-4939-2999-3_26.

Ido Y, Yoshitomi T, Ohkura K, Yamamoto T, Shinohara Y. "Utility of syntenic relationships of VDAC1 pseudogenes for not only an understanding of the phylogenetic divergence history of rodents, but also ascertaining possible pseudogene candidates as genuine pseudogenes", *Genomics* (査読あり) 104(2014)128-133. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.05.003.

Hada T, Yamamoto T, Yamamoto A, Ohkura K, Yamazaki N, Takiguchi Y, Shinohara Y. "Comparison of the catalytic activities of three isozymes of carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in COS7 cells", *Appl Biochem Biotechnol.* (査読あり) 172(2014)1486-1496. doi: 10.1007/s12010-013-0619-y.

[学会発表](計9件)

山越亮平, 山本武範, 寺田 弘, 篠原康雄, "哺乳類ミトコンドリアのリン酸輸送担体の酵母での機能的発現", 第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2015年11月20日, 熊本大学(熊本県熊本市)

山本篤司, 奥田勝博, 安部真人, 松本健司, 山本武範, 大倉一人, 寺田 弘, 新藤充, 篠原康雄, "Inhibitory effects of the bongkrelic acid analogues on the

mitochondrial ADP/ATP carrier", 第 43 回
構造活性相関シンポジウム, 2015 年 9 月 29
日, 新潟日報メディアシップ日報ホール(新
潟県新潟市)

秦 拓也, 尾華絵里子, 角幡 玲, 堀 友繁,
山本武範, 篠原康雄, "マイクロアレイで遺
伝子発現の定量的評価は可能か", 第 28 回バ
イオメディカル分析科学シンポジウム, 2015
年 8 月 21 日, 長崎大学(長崎県長崎市)

Kana Kuwahara, Kazuki Harada, Ryohei
Yamagoshi, Yoshiharu Takiguchi, Takenori
Yamamoto, Yasuo Shinohara, "Effects of
employment of distinct strategies to
capture antibody on antibody delivery into
cultured cells", 40th FEBS Congress, July
5, 2015, Berlin (Germany)

桑原かな, 原田一樹, 山越亮平, 山本武
範, 篠原康雄, "抗体導入試薬の性質の違い
が細胞内への抗体の導入に及ぼす影響", 日
本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 27 日, 神
戸学院大学ほか(兵庫県神戸市)

島佐和子, 山本武範, 榎本麻里子, 山下
菊治, 寺田 弘, 篠原康雄, 滝口祥令, "デカ
リニウムはミトコンドリアに透過性遷移を
誘起する", 日本薬学会第 135 年会, 2015 年
3 月 27 日, 神戸学院大学ほか(兵庫県神戸市)

Kana Kuwahara, Kazuki Harada, Takenori
Yamamoto, Yasuo Shinohara, "Comparison of
the delivery effects of two antibody
carrier systems", 日本生物物理学会第 52
回年会, 2014 年 9 月 27 日, 札幌コンベンシ
ョンセンター(北海道札幌市)

井戸佑介, 吉富立樹, 大倉一人, 山本武範,
篠原康雄, "3 つの VDAC1 の偽遺伝子はラット
とマウスの分岐前に形成されていた", 日本
薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日, 熊本
大学(熊本県熊本市)

Ryohei Yamagoshi, Takenori Yamamoto,
Yasuo Shinohara, "Functional expression
of the human mitochondrial phosphate
carrier in yeast cells", The 5th EMBO
meeting, September 23, 2013, Amsterdam
(The Netherlands)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 康雄 (SHINOHARA, Yasuo)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センタ
ー・教授

研究者番号: 60226157