

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22754

研究課題名（和文）DNA損傷に関わる年齢依存性発現分子の機能解析 法医学から老化医学への展開

研究課題名（英文）Functional analysis of an age-dependently expressed molecule involved in DNA damage : From forensic to aging medicine

研究代表者

飯田 礼子 (Iida, Reiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：40139788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：M-LPは、加齢・老化に伴って発現変化する新規生体分子であり、成長と共に増加し老齢期で減少する。報告者は最近、i) M-LPの発現抑制がcAMPの上昇とPKAの活性化を引き起こしmtDNA損傷の増加させること、また、ii)本分子がcAMP分解活性を有するPDEであることを明らかにした。作製したM-LP-KOマウスでは、膵ランゲルハンス島の過形成が認められ耐糖能が上昇していた。M-LP欠失に伴うこれらの変化は、Wntシグナル伝達経路の主要因子である -カテニンやGSK-3BのPKA依存性のリン酸化により惹起されるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、M-LPが情報伝達物質cAMPを分解する新規ホスホジエステラーゼ（PDE）であることを世界に先駆けて明らかにすることができた。PDEは過去20年以上にわたって多様な疾患に対する医薬品開発の標的となっており、選択的阻害剤の一部はすでにガン、心不全、喘息など、多様な疾患の治療薬として使用されている。M-LPは、その分子構造や細胞内局在などにおいて既知PDEと大きく異なるため、既知PDEと異なった細胞内機能を有する可能性が高い。したがって、新規治療薬としてのM-LPの選択的阻害薬の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：M-LP is a biomolecule whose expression changes with aging and senescence, increasing during development and decreasing with aging. We have recently shown that i) Suppression of M-LP expression causes an increase in cAMP and activation of PKA, leading to an increase in mtDNA damage, and that ii) M-LP is a novel PDE with cAMP-degrading activity. The M-LP-KO mice showed hyperplasia of pancreatic islets of Langerhans and increased glucose tolerance. These changes associated with M-LP deletion were considered to be induced by PKA-dependent phosphorylation of -catenin and GSK-3B, key factors in the Wnt signaling pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：ホスホジエステラーゼ シグナル伝達 グルコース耐性 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

法医鑑定精度は、近年の分子生物学の進歩に伴って著しく向上し、現場に残された血痕などの試料のDNA型と、関係者(被疑者など)のDNA型を照合すれば、同一人物であるか否かを高い確度で鑑定することが可能となった。しかし、被疑者につながる情報が少ない案件の場合、DNA型の照合が難しく異同識別できないことがDNA鑑定の盲点である。報告者はこれまで、血液、体液、組織などの法医学的試料に含まれる種々の生体分子を指標とし、その試料が由来する人物の特徴を推定する方法(法学的プロファイリング)の開発に取り組み、年齢と相関する年齢依存性発現生体分子や身体的特徴と相関するDNA多型の体系的な検索・解析を実施してきた[1-3]。この過程で、加齢・老化に伴って発現変動する新規生体分子Mpv17-like protein (M-LP)を発見した(図1)[4-8]。ヒト肝癌由来細胞(HepG2)を改変して作製したM-LP遺伝子欠損(M-LPH-KO)細胞と野生型細胞と比較したところ、KO細胞においてミトコンドリアDNA(mtDNA)および核DNAの損傷が増加していた。また、mtDNA維持に関わるタンパク質

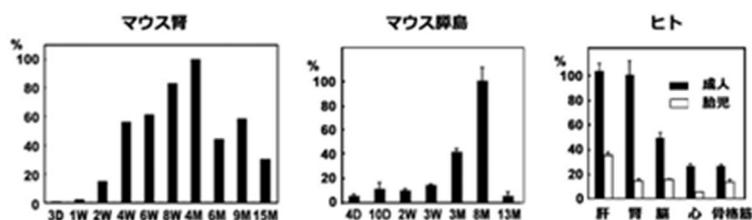


図1 M-LPの年齢依存性発現変化 (RNAレベル)

Mitochondrial transcription factor A (TFAM)のミトコンドリア内濃度の低下とリン酸化レベルの増加が認められた。これらの結果から、mtDNA 損傷の増加はTFAM による防御機構の低下に起因するものと考えられた[9]。ミトコンドリアは有酸素時の細胞活動に必要なATPの合成を行うが、その際、副産物として発生した活性酸素が核やミトコンドリアのDNAを損傷させ、それが老化の一因となることは広く知られている。したがって、M-LPの生理機能やmtDNA損傷を抑制するメカニズムの解明が老年性疾患の治療や老化予防へと発展する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は、M-LPの生理学的機能およびM-LP欠失によるmtDNA損傷増加の基盤となるメカニズムを解明し、老年性疾患の治療や老化予防などの老化医学に資することを目指して計画した。目的達成に向けて、すでに所有しているM-LPH-KO細胞に加えてM-LP遺伝子欠損(M-LP-KO)マウスを作製し、細胞および個体レベルにおいて正常型と野生型の比較検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) cAMPの測定

野生型HepG2細胞および既報[9]に従って作製したM-LPH-KO細胞よりミトコンドリアを単離したのち、ミトコンドリア内cAMP量をDirect cAMP ELISA Kit (Enzo)を用いて測定した。

### (2) 無細胞タンパク質発現系によるM-LPHの合成

M-LPHの合成には、M-LPH発現ベクター(pT7-IRES/M-LPH1)およびHuman Cell-Free Protein Expression System (タカラバイオ)を使用した。

### (3) PDE活性の測定

細胞抽出液のPDE総活性および無細胞タンパク質発現系によって発現させたM-LPHの活性測定には、total phosphodiesterase activity assay kit (BioVision)およびCyclic Nucleotide Phospho-diesterase Assay Kit (Enzo)をそれぞれ使用した。

### (4) M-LPH欠失変異体発現用ベクターの作製

M-LPH欠失変異体発現用ベクターの作製には、KOD-Plus-Mutagenesis kit (Toyobo)を使用し

た。

#### (5) M-LP-KO マウスの作製

M-LP-KO マウスは、CRISPR/Cas9 システムを利用して作製した(Macrogen)。sgRNA は *Mpv17L* 遺伝子 exon 1 内の 23 塩基をターゲットとして設計した。sgRNA および Cas9 タンパク質を C57BL/6N マウスの受精卵にマイクロインジェクションし、仮親に移植することによりファウンダーマウス (F0) を得た。続いて、塩基配列分析によってなるべく大きな欠失が生じ、さらにフレームシフトが起こった F0 マウスを選択し、野生型 C57BL/6N と交配させて F1 ヘテロマウスを作製し、F1 マウス同士の交配により産仔 (F2) を得た。遺伝子型解析は、マウス DNA を鋳型とし、遺伝子欠損部位の両側に設定した 2 つのプライマーを用いた PCR により実施した。

#### (6) ブドウ糖負荷試験

一晩絶食させたマウスの腹腔内にグルコース (1g/kg 体重) を注射したのち、0 分、15 分、30 分、60 分および 120 分後に尾静脈より採血を実施し、FreeStyle Freedom Lite (Abbott) を使用して血糖値を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) M-LPHの発現抑制によって細胞内で引き起こされる変化

TFAM のリン酸化にはプロテインキナーゼA (PKA) が関与することが知られている。M-LPH-KO 細胞で観察されたTFAMリン酸化の増加は、ミトコンドリアにおけるcAMP/PKA経路の活性化に起因すると推測された。そこで、野生型 (M-LPH-WT) およびM-LPH-KO細胞について、ミトコンドリア内のcAMP量を測定したところ、M-LPH-KO細胞における顕著な増加が認められた (図2A)。ミトコンドリア内cAMP量は、合成酵素アデニル酸シクラーゼと分解酵素PDEによって制御されている。M-LPH-KO細胞内のPDE総活性は、野生型細胞の約1/2まで低下していたことから (図2B)、M-LPHがPDEとして機能している可能性が示唆された。

#### (2) 無細胞タンパク質発現系により作製したM-LPHが示すPDE活性

M-LPHがPDE活性を持つことを直接確認するため、タンパク質発現系を用いてM-LPHを合成した。合成M-LPHは82.0 ± 13.5 mU1/mgのPDE活性を有し、非選択的PDE阻害剤IBMX (40 μM) による阻害を受けた (図2C)。したがって、M-LPHは細胞内でPDEとして機能しているものと考えられた (図3)。

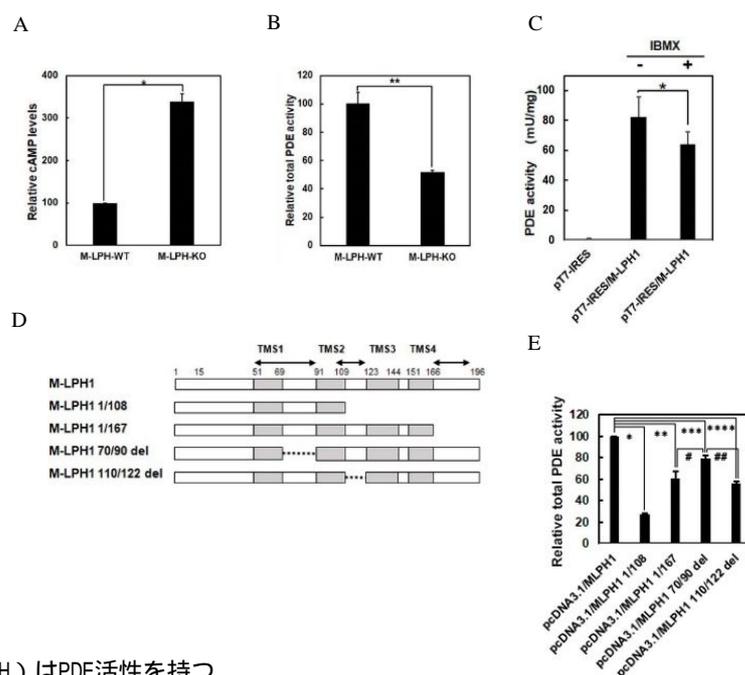


図2 ヒトM-LP (M-LPH) はPDE活性を持つ

A :野生型HepG2細胞 (M-LPH-WT) とKO細胞 (M-LPH-KO) におけるcAMPレベル

B :ミトコンドリア内PDE総活性

C :発現M-LPHのPDE活性 (pT7-IRES: 空ベクター pT7-IRES/M-LPH1発現用ベクター)

D :全長M-LPHおよび欠失変異体の構造

E :全長M-LPHおよび欠失変異体発現ベクターを導入したKO細胞のPDE総活性

### (3) M-LPH欠失変異体の解析によるM-LP分子内活性部位の同定

M-LPH-KO細胞に、図2Dに示す全長M-LPおよび欠失変異体発現ベクターを導入し、細胞内PDE総活性を測定した。その結果、PDE活性の維持にはC末端領域および2番目と3番目の膜貫通ドメインの間にあるループ領域が最も重要であることが示された(図2E)。

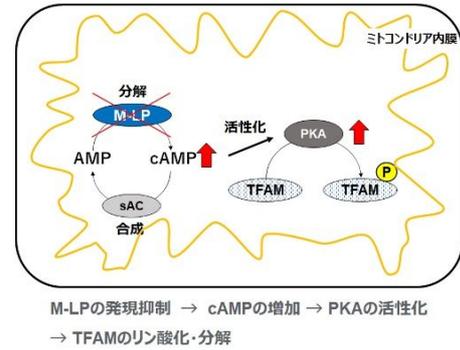
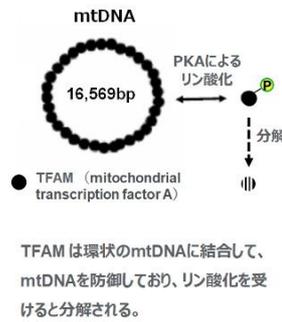


図3 M-LP発現抑制によるmtDNA損傷増加のメカニズム

### (4) M-LP-KOマウスの病理組織学的解析および糖負荷試験

作製したM-LP-KOマウスの主要組織・器官について病理組織学的解析を実施したところ、膵ランゲルハンス島の過形成が認められ、抗インスリンおよび抗グルカゴン抗体を用いた免疫蛍光染色では、細胞数の著しい増加が示された(図4)。また、糖負荷試験の結果、グルコース投与後の血糖値がKOマウスにおいて大きく低下していた(図5)。

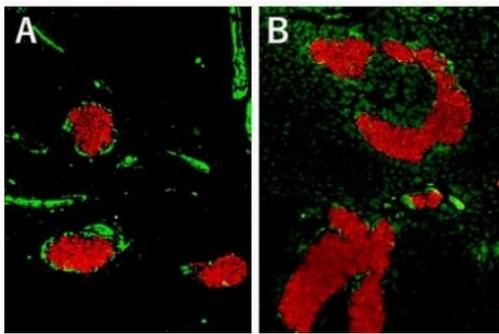


図4 マウス膵島の免疫組織染色(80日齢)  
(A:野生型マウス、B:M-LP/Mpv17L-KOマウス)

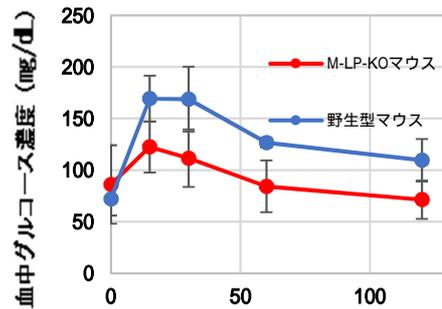


図5 糖負荷試験

### (5) M-LPの発現抑制がWnt標的遺伝子や細胞機能に関わる遺伝子の発現に及ぼす効果

Wntシグナル経路は、膵臓内分泌細胞の発生に影響を及ぼし、細胞の増殖やインスリン分泌などの機能を制御することが知られている。Wntシグナル経路の重要な構成要素であるβ-カテニンは、セリン(Ser675)のPKA依存的なリン酸化によって安定化されて核に移行し、その結果としてWnt標的遺伝子の転写活性化が起こる。M-LPの欠失はcAMPの上昇とそれに続くPKAの活性化を引き起こし、Wntシグナルの活性化につながるが予想される。この仮説を検証するため、M-LPの発現抑制がWnt標的遺伝子や細胞機能に関わる遺伝子の発現に及ぼす効果について解析した。Wnt標的遺伝子のうち、3つの転写因子(Lef1、NeuroD1、Tcf712)はM-LP発現抑制細胞で有意に上昇したが、細胞周期や細胞増殖に関連するMycやCcnd1などは低下していた(図6A)。また、細胞の機能に関連する転写因子のうち、細胞の分化・発生に関わるPax4、Nkx2-2、Nkx6-1の発現やIns1遺伝子の発現は促進された。一方、Wntシグナル経路の主要な因子であるβ-カテニンやGSK-3Bのリン酸化レベルは発現抑制細胞で増加していた(図6B)。したがって、M-LP/Mpv17Lの発現抑制β-カテニンの安定化と核内への移行Wntシグナル経路の活性化というメカニズムによってインスリン分泌や細胞増殖が引き起こされるものと考えられた(図6C)。

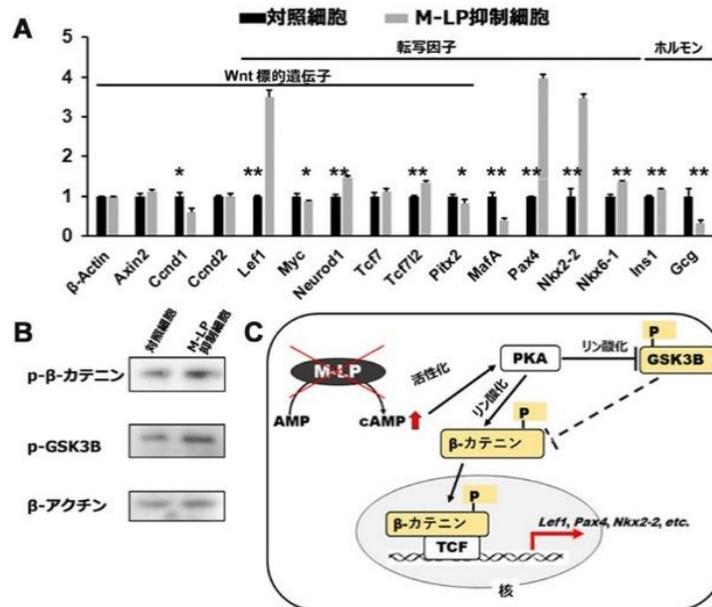


図6 M-LPの発現抑制とWnt/β-カテニンシグナルの活性化  
A: 標的遺伝子の発現変化 (RNA レベル)  
B: タンパク質発現量とリン酸化レベルの変化  
C: 活性化の分子メカニズム

< 引用文献 >

[1] R. Iida, et al., FEBS J., 274, 3939-3947, 2007  
[2] R. Iida, et al., Cell Biochem. Funct., 27, 323-327, 2009  
[3] R. Iida, et al., Legal Med., 25, 71-74, 2017  
[4] R. Iida, et al., Mech. Aging Development, 113, 133-142, 2000  
[5] R. Iida, et al., Biochem Biophys Res Commun, 283, 292-296, 2001  
[6] R. Iida, et al., J. Biol. Chem., 278, 6301-6306, 2003  
[7] R. Iida, et al., Exp Cell Res, 302, 22-30, 2005  
[8] R. Iida, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 344, 948-954, 2006  
[9] R. Iida, et al., Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 6956414, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>R. Iida, M. Ueki, T. Yasuda  | 4. 巻<br>1868         |
| 2. 論文標題<br>Deficiency of M-LP/Mpv17L leads to development of -cell hyperplasia and improved glucose tolerance via activation of the Wnt and TGF- pathways. | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Diseases  | 6. 最初と最後の頁<br>166318 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbadis.2021.166318  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-            |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>R. Iida, M. Ueki, T. Yasuda  | 4. 巻<br>1867         |
| 2. 論文標題<br>Human Mpv17-like protein with a mitigating effect on mtDNA damage is involved in cAMP/PKA signaling in the mitochondrial matrix | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research  | 6. 最初と最後の頁<br>118792 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbamcr.2020.118792  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>飯田 礼子、植木 美鈴、竹下 治男、藤原 純子、木村 かおり、安田 年博           |
| 2. 発表標題<br>年齢依存性発現分子Mpv17-like proteinのミトコンドリアDNA維持における役割 |
| 3. 学会等名<br>第28回日本DNA多型学会学術集会                              |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                      |              |               |
|--------------------------------------|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>cAMPまたはcGMPの分解剤、および、その利用 | 発明者<br>飯田 礼子 | 権利者<br>福井大学   |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2020-077450      | 出願年<br>2020年 | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|