

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月18日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790070

研究課題名（和文） 酵母で解き明かすミトコンドリア膜の透過性遷移の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of permeability transition revealed using yeast mitochondria

研究代表者

山本 武範 (YAMAMOTO TAKENORI)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・助教

研究者番号：80457324

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの透過性遷移はアポトーシス誘導のトリガーとなる現象である。本研究は透過性遷移を制御する遺伝子を同定することを目的として、遺伝子改変酵母のミトコンドリアを用いた解析を行った。その結果、これまでに透過性遷移を制御すると目されてきた複数の遺伝子は、いずれも透過性遷移の誘導に中心的な役割を果たしていないことを明らかにした。これは透過性遷移を制御する未知の遺伝子の存在を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial permeability transition triggers subsequent steps of apoptosis. To understand the molecular mechanisms of permeability transition, we in this research accessed to identify the regulatory genes for permeability transition using yeast mitochondria. As a result, we revealed that possible regulatory genes involved in permeability transition in previous reports did not mainly regulate permeability transition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは古くは細胞内におけるエネルギー変換の場として認識されてきたが、最近ではアポトーシスの制御という全く相反する機能を備えていることも明らかとされてきた。アポトーシスの誘導シグナルが細胞に伝わると、そのほとんどはミトコンドリアに伝えられ、その結果ミトコンドリア膜の物質透過性が上昇する。この現象は「透過性遷移」と呼ばれ、この状態に陥ったミトコンドリアは大きく膨潤すると共に、その内部から種々のアポトーシス誘導因子が漏出し、

細胞死実行の引き金が引かれる。このことから、透過性遷移はミトコンドリアを介したアポトーシス誘導機構の鍵となると考えられるが、依然として透過性遷移の分子機構については明らかになっていない。近年ようやく、ノックアウトマウスを用いた関連遺伝子の同定に関する報告がいくつかなされたが、懐疑的とする反証論文も多く、その分子機構は未だ混沌としている。

## 2. 研究の目的

これまでに透過性遷移を制御することが

示唆されている遺伝子についてその真偽を明らかにすると共に、透過性遷移を制御する新規の遺伝子についても探索を行うことにより、透過性遷移の分子機構の理解を目指す。

### 3. 研究の方法

我々は最近、遺伝子変換の容易な酵母のミトコンドリアを用いて透過性遷移を観察する実験系を世界に先駆けて構築した。そこで本研究では、様々な遺伝子欠損酵母を構築し、これらの変異株から単離したミトコンドリアにおいて透過性遷移が誘起されるかどうかを調べることによって、透過性遷移を制御する遺伝子を探索する。尚、透過性遷移が誘起されたかどうかは、電子顕微鏡によるミトコンドリアの形態変化の確認および Western blotting によるミトコンドリアからのシトクロム c 放出の確認により行った。

### 4. 研究成果

これまで透過性遷移に関与すると考えられてきた遺伝子として、voltage-dependent anion channel (VDAC)、adenine nucleotide translocase (ANT)、hexokinase が報告されている。そこでまず、これらの遺伝子の透過性遷移における関与を調べるため、これらの遺伝子を欠損した酵母を作製した。尚、酵母の VDAC には 2 つ (POR1、POR2)、ANT には 3 つ (AAC1、AAC2、AAC3)、hexokinase には 2 つのアイソフォーム (HXK1、HXK2) が存在しているため、各々の遺伝子を欠損させた酵母株に加えてアイソフォーム全てを欠損させた酵母株を作製した。

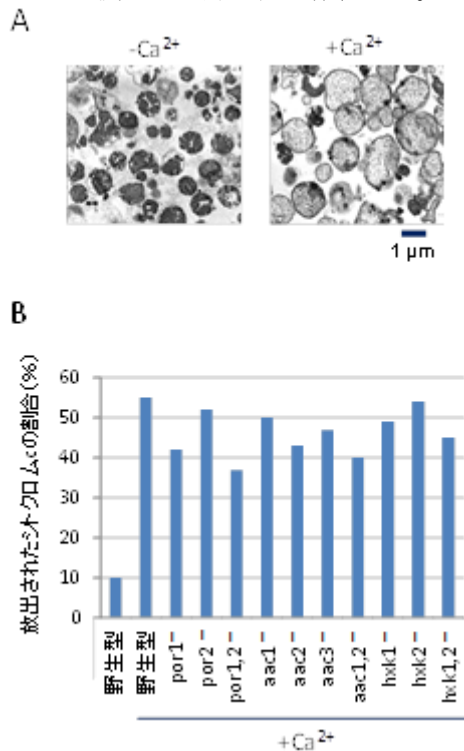


図1 種々の遺伝子の透過性遷移への関与

本研究で調べたいずれの遺伝子も透過性遷移の制御に大きく関与しないことが分かった。

A. 構築した変異株のミトコンドリアはすべて  $\text{Ca}^{2+}$  の添加により透過性遷移を誘起した場合に特徴的な膨潤した形態を示した。図は例として *por1* の欠損酵母 (*por1*<sup>-</sup>) から単離したミトコンドリアの結果を示している。B.  $\text{Ca}^{2+}$  の添加後、ミトコンドリアから放出されるシトクロム c を Western blotting によって調べ、ミトコンドリアに存在するシトクロム c に占める放出された割合を算出したところ、いずれの遺伝子の欠損株のミトコンドリアにおいても放出される割合に大きな変化は認められなかった。

作製した欠損酵母から単離したミトコンドリアに透過性遷移の誘導剤である  $\text{Ca}^{2+}$  を添加し、これに伴う形態変化およびミトコンドリアにおけるシトクロム c の局在を、電子顕微鏡および Western blotting によって解析した。その結果、解析を行った全ての変異株のミトコンドリアにおいて、野生型のミトコンドリアと同様に、透過性遷移を誘起したミトコンドリアに特徴的な形態の変化 (Fig. 1A) およびシトクロム c の放出 (Fig. 1B) が観察された。このことから、これまで透過性遷移の制御に関与すると考えられてきた遺伝子はいずれもその制御に中心的な役割を果たしていないことが明らかになった。この結果は、透過性遷移を制御する未知の遺伝子が存在していることを示している (論文作成中)。

透過性遷移を制御する遺伝子の新規候補として、本研究では次の遺伝子に焦点を当てさらなる解析を行った。我々はこれまでに、酵母においてミトコンドリアの透過性遷移は  $\text{Ca}^{2+}$  によって誘導され、無機リン酸の存在下で顕著に阻害されることを明らかにしている。そこで、ミトコンドリア膜に存在するカルシウム結合タンパク質である *Sa11* およびリン酸の輸送担体である *PiC* について透過性遷移との関与を調べることにした。これら 2 つの遺伝子の欠損酵母をそれぞれ作製して同様に解析を行ったところ、これらの遺伝子欠損酵母のミトコンドリアにおいても透過性遷移は野生株と同様に誘起されることが分かった (結果は示さない)。これらの結果から、これらの遺伝子もまた透過性遷移の誘導メカニズムには関与していないことが示された。

本解析から、これまでに透過性遷移に関与するとされてきた遺伝子は、いずれもその関与が小さいことを明確に示すことができた。本研究ではさらに、透過性遷移に関与している可能性のありそうないくつかの遺伝子についても解析を行ったが、いずれも関与を示す結果は得られなかった。

これまで、特に VDAC と ANT については、

透過性遷移への関与が 10 年以上もの間世界的に広く信じられ、今では多くの解説書、参考書にこれに関する記載がまことしやかになされている状況にある。従って、VDAC や ANT が実際には透過性遷移に関与していないことを示した本研究のインパクトは大きいと考えている。また同時に、本研究の結果から、透過性遷移の制御にクリティカルに関与する未知の遺伝子が存在することが強く示唆される。今後、透過性遷移に関与する遺伝子の候補を新たにスクリーニングし直すことが必要である。現在、酵母ミトコンドリアを使った候補遺伝子のスクリーニングに向けた基礎的検討を進めている。

#### 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 13 件)

〈欧文原著〉

1. Hada T, Kato Y, Obana E, Yamamoto A, Yamazaki N, Hashimoto M, Yamamoto T, Shinohara Y (2012) Comparison of two expression systems using COS7 cells and yeast cells for expression of heart/muscle-type carnitine palmitoyltransferase 1, **Protein Expr Purif**, 82, 192-196 (査読有), doi: 10.1016/j.pep.2012.01.006
2. Ido Y, Yamamoto T, Yoshitomi T, Yamamoto A, Obana E, Ohkura K, Shinohara Y (2011) Pseudogenes of rat VDAC1: 16 gene segments in the rat genome show structural similarities with the cDNA encoding rat VDAC1, with 8 slightly expressed in certain tissues, **Mamm Genome**, in press (査読有), doi: 10.1007/s00335-011-9375-x
3. Obana E, Hada T, Yamamoto T, Kakuhata R, Saze T, Miyoshi H, Hori T, Shinohara Y (2011) Properties of signal intensities observed with individual probes of GeneChip Rat Gene 1.0 ST Array, an affymetric microarray system, **Biotechnol Lett**, 4, 213-219 (査読有), doi: 10.1007/s10529-011-0776-4
4. Kawashima S, Yamamoto T, Horiuchi Y, Fujiwara K, Gouda S, Yoshimura Y, Yamamoto A, Inotani Y, Yamashita K, Kitamura S, Terada H, Kanematsu M, Shishido K, Shinohara Y (2011) S-15176 and its methylated derivative suppress the CsA-insensitive mitochondrial permeability transition and subsequent cytochrome c release induced by silver ion, and show weak protonophoric activity, **Mol Cell Biochem**, 358, 45-51 (査読有), doi: 10.1007/s11010-011-0919-x
5. Watanabe M, Yamamoto T, Yamamoto A, Obana E, Niiyama K, Hada T, Ooie T, Kataoka M, Hori T, Houchi H, Shinohara Y (2011) Differential effects of cold exposure on gene expression profiles in white versus brown adipose tissue, **Appl Biochem Biotechnol**, 165, 538-547 (査読有), doi: 10.1007/s12010-011-9273-4
6. Okada N, Yamamoto T, Watanabe M, Yoshimura Y, Obana E, Yamazaki N, Kawazoe K, Shinohara Y, Minakuchi K (2011) Identification of TMEM45B as a protein clearly showing thermal aggregation in SDS-PAGE gels and dissection of its amino acid sequence responsible for this aggregation, **Protein Expr Purif**, 77, 118-123 (査読有), doi: 10.1016/j.pep.2011.01.011
7. Yamamoto T, Yamamoto A, Watanabe M, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y (2010) Quantitative evaluation of the effects of cold exposure of rats on the expression levels of ten FABP isoforms in brown adipose tissue, **Biotechnol Lett**, 33,

- 237-242 (査読有) ,doi: 10.1007/s10529-010-0444-0
8. Katsuda C, Niiyama K, Obana E, Yamamoto T, Katou Y, Kataoka M, Ohkura K, Shinohara Y (2010) Specific formation of trypsin-resistant micelles on a hydrophobic peptide observed with Triton X-100 but not with octylglucoside, **Biochim Biophys Acta**, 1798, 2090-2093 (査読有) , doi: 10.1016/j.bbame.2010.07.013
  9. Yamamoto T, Ohashi M, Mizutani S, Yoshimura Y, Obana E, Terada H, Shinohara Y (2010) Use of highly purified and mixed antibodies for simultaneous detection of multiple protein species released from mitochondria upon induction of the permeability transition, **Appl Biochem Biotechnol**, 163, 64-70 (査読有) , doi: 10.1007/s12010-010-9016-y
  10. Umemoto Y, Kataoka M, Yatsushiro S, Yamamura S, Ooie T, Kido J, Yamamoto T, Shinohara Y, Baba Y (2010) Analysis of DNA ligation by microchip electrophoresis, **J Pharm Biomed Anal**, 52, 323-328 (査読有) , doi: 10.1016/j.jpba.2009.12.023
  11. Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Herzberg MC, Ross KF, Shinohara Y, Yamamoto T, Nagata T, Kido J (2010) Modulation of calprotectin in human keratinocytes by keratinocyte growth factor and interleukin-1alpha, **Immunol Cell Biol**, 88, 328-333 (査読有) , doi: 10.1038/icb.2009.104
  12. Matsuo T, Yamamoto A, Yamamoto T, Otsuki K, Yamazaki N, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y (2010) Replacement of C305 in heart/muscle-type isozyme of

human carnitine palmitoyltransferase I with aspartic acid and other amino acids, **Biochem Genet**, 48, 193-201 (査読有) , doi: 10.1007/s10528-009-9301-z

13.

<和文総説>

1. 山本武範, 山田安希子, 篠原康雄 (2010) プロテオミクスで探るミトコンドリアからのシトクロムc漏出機構, **生物物理**, 50, 124-125 (査読有)

[学会発表] (計4件)

<招待講演、講演依頼>

1. 山本武範  
「プロテオミクスで解き明かすミトコンドリアからのシトクロムc放出機構」  
日本薬学会 第132年会  
(2012.3.29、北海道大学(札幌市))
2. 山本武範  
「質量分析法と抗原抗体反応を組み合わせたミトコンドリアタンパク質の分離分析」  
第16回 徳島地区分析技術セミナー  
「分離分析の最新動向」  
(2012.1.20、徳島大学(徳島市))
3. 山本武範  
「ミトコンドリアからのシトクロムc放出機構解明に向けた多面的アプローチ」  
若手研究者公開特別シンポジウム「ミトコンドリアとDDS1」  
(2011.1.21、北海道大学(札幌市))

<シンポジウム>

1. 山本武範, 山本篤司, 渡邊政博, 篠原康雄  
「褐色脂肪組織におけるFABPアイソフォームの発現レベルに対して寒冷曝露

がもたらす作用の定量的評価」

第32回 生体膜と薬物の相互作用シン  
ポジウム

(2010.11.28、富山国際会議場(富山市))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 武範 (YAMAMOTO TAKENORI)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・助教

研究者番号：80457324

(2) 研究協力者

篠原 康雄 (SHINOHARA YASUO)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授

研究者番号：60226157