

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790076

研究課題名(和文) 定量的プロテオミクスで解き明かすミトコンドリア膜の透過性遷移の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of permeability transition revealed using quantitative proteomic analysis

研究代表者

山本 武範 (YAMAMOTO, Takenori)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・講師

研究者番号：80457324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

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タンパク質を同定することを目的として、定量的プロテオミクス解析を行った。その結果、透過性遷移の誘導剤を添加したミトコンドリアにおいて選択的に酸化修飾を受けるタンパク質を見出すことができた。現在、これらのタンパク質を欠損したミトコンドリアを調製し、透過性遷移との関連を解析している。

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 here performed the quantitative proteomic analysis to identify the regulatory proteins for permeability transition. As a result, we found some candidate proteins, which were oxidized when a permeability transition inducer was added to isolated mitochondria. We will examine whether the proteins are related to the regulation of permeability transition.

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：ミトコンドリア 透過性遷移 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは古くから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にされてきた。細胞が酸化ストレスを初めとする種々のストレスに曝されると、そのシグナルの多く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、透過性遷移はアポトーシス誘導の鍵であり、特に酸化ストレスが原因となる老化や神経変性疾患の分子機構を理解するうえで重要であるが、その実体は未だ不明である。

2. 研究の目的

申請者は、酵母がミトコンドリアの機能を欠損していても生育が可能である点に注目し、酵母のミトコンドリアを用いた透過性遷移の解析系を世界に先駆けて確立することによって、この分野に遺伝学的アプローチの道を拓いた。さらにこの解析系を基盤とし、これまでに複数の遺伝子欠損酵母を用いて透過性遷移の制御因子を探索した。その結果、これまで多くの論文の中で透過性遷移の制御因子と目されてきた遺伝子は、いずれも中心的な制御因子ではないことを明らかにした。このことは、未知の透過性遷移の制御因子が存在していることを意味しており、この制御因子を探索、同定することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

酸化ストレスを与えたミトコンドリアにおいて透過性遷移が亢進することが知られている。従って、酸化ストレスを与えたミトコンドリアにおいて酸化されたタンパク質を探索、同定することによって、透過性遷移の制御タンパク質を特定することができる。そこで本研究では、定量的プロテオミクス解析によって、ミトコンドリアで酸化を受けたタンパク質を同定し、同定されたタンパク質をコードする遺伝子を欠損させた酵母を作製し、その遺伝子と透過性遷移との関係を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

酸化ストレスによって酸化を受けるタンパク質を同定するため、本研究ではまず下記の三つの技術基盤の確立に取り組んだ。

酵母ミトコンドリアに対する適切な酸化ストレス条件の決定

酸化されたタンパク質の濃縮系の構築
安定同位体標識アミノ酸培養法 (SILAC) を用いた定量的プロテオミクス

解析系の構築

以下、それぞれの項目に関する結果を述べる。

適切な酸化ストレス条件の検討：

本研究では、実験に最適な酸化ストレス条件を決定するため、酵母から単離したミトコンドリアに対して、過酸化水素、メナジオン、アセト酢酸、パラコート、塩化鉄(II)を添加し、酸化されたタンパク質をビオチン化することによって検出した。その結果、塩化鉄(II)を、グリセロールを炭素源として生育させた酵母のミトコンドリアに添加した場合に、最も再現性よくタンパク質の酸化が進行し、かつ透過性遷移が亢進することが分かった。

酸化タンパク質の精製系の構築：

ミトコンドリア内で酸化されるタンパク質は微量であるため、塩化鉄(II)によって酸化ストレスを与えたミトコンドリアに存在する酸化タンパク質を濃縮する工程が必須である。そこで、酸化タンパク質に生じたカルボニル基をビオチンヒドラジドによりビオチン化し、これをモノアビジンカラムを用いて精製する実験系の構築を行った。検討の結果、モノアビジンカラムによる精製によって、ミトコンドリアに存在する酸化タンパク質を5倍程度にまで濃縮することが可能となった。

SILAC を用いた定量的プロテオミクス解析系の構築：

SILAC による酵母細胞の全タンパク質の安定同位体標識と、それらの質量分析計を用いた検出に関する基礎的検討を行った。質量分析の結果、検出されたミトコンドリアタンパク質に由来するペプチドの99%以上が窒素安定同位体(15N)で標識されていることが確認された。

以上の3つの、技術基盤をもとに、塩化鉄(II)を添加したミトコンドリアで酸化されるタンパク質を質量分析装置にて同定することを試みた。

通常の窒素源を含む培地、および安定同位体で標識された窒素源を含む培地、でそれぞれ培養した酵母からミトコンドリアを単離する。通常の窒素源(14N)を含む培地で生育させた酵母ミトコンドリアに塩化鉄(II)を添加し、一定時間インキュベートすることにより酸化ストレスを与える。このミトコンドリアと、内部標準とする安定同位体(15N)で標識された酵母ミトコンドリアを、等量ずつ混合した後、モノアビジンカラムによって酸化タンパク質の精製、濃縮する。得られたタンパク質サンプルをプロテアーゼで消化した後、質量分析装置Q-TOF ultimaにて解析を行った。酸化ストレスを与えたミトコンドリア由来のペプチドのピークのほとんどは、内部標準として用いた安定同位体標識されたペプチドのピークと同じシグナル強度であった。しかし

ながら、2つのタンパク質について、内部標準より優位に高いシグナル強度を示すペプチド断片が検出された。これらのペプチド断片を含むタンパク質が酸化ストレスにより選択的に酸化を受けたタンパク質であると考えられる。

まとめ：

本研究により、特定の酸化ストレスを与えたミトコンドリアで生じる酸化タンパク質を定量的プロテオミクス解析を使って分子同定するためのプロトコルを構築することができた。塩化鉄(II)によって酸化ストレスを受けたミトコンドリアにおいて優位に酸化される2つのタンパク質を見出した。

今後の課題：

今回2つの酸化タンパク質を同定することができたが、酸化タンパク質に対するWestern blottingの結果から、実際にはさらに多くの酸化タンパク質が存在していることが予想される。従って今後は、高感度質量分析装置(Orbitrap)を用いて、さらに多くの酸化タンパク質を同定すること図る。また、現在、同定された2つのタンパク質について、遺伝子欠損酵母を作製し、透過性遷移の制御機構との関係を解析している。

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 6件)

[原著論文]

1) 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 172 (2014) 1486-1496.

(査読有)

2) Yamamoto T, Tamaki H, Katsuda C, Nakatani K, Terauchi S, Terada H, Shinohara Y.

Molecular basis of interactions between mitochondrial proteins and hydroxyapatite in the presence of Triton X-100, as revealed by proteomic and recombinant techniques.

J Chromatogr A 1301(2013)169-178.

(査読有)

3) Ido Y*, Yamamoto T*(equal contributions), Yoshitomi T, Yamamoto A, Obana E, Ohkura K, Shinohara Y.

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 23(2012)286-293.

(査読有)

4) Hada T, Kato Y, Obana E, Yamamoto A, Yamazaki N, Hashimoto M, Yamamoto T, Shinohara Y.

Comparison of two expression systems using COS7 cells and yeast cells for expression of heart/muscle-type carnitine palmitoyltransferase 1.

Protein Expr Purif 82(2012)192-196.

(査読有)

[総説]

1) 山本武範、山田安希子、吉村勇哉、寺田弘、篠原康雄

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

薬学雑誌 132(2012)1099-1104.

(査読有)

2) 尾華絵里子、安倍正博、山本武範、篠原康雄

ヘキソキナーゼとがんの代謝

実験医学 30(2012)2370-2375.

(査読有)

[学会発表](計 3件)

1) 山本武範、吉村勇哉、山本篤司、山田安希子、寺田弘、篠原康雄

透過性遷移を誘起したミトコンドリアからの Apoptosis-inducing factor(AIF) の漏出機構

第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム

2013.11.21-22、東京大学薬学部(東京都本郷)

2) 山本武範、吉村勇哉、山本篤司、懸山啓太、山田安希子、寺田弘、原島秀吉、篠原康雄

「ミトコンドリアからの apoptosis-inducing factor(AIF) の漏出を促進する因子の同定と漏出した AIF の分

子構造解析」

日本薬学会第 133 年会

2013.3.27-30、横浜パシフィコ(神奈川県
横浜)

3)山本武範、井戸佑介、中野裕美子、河野
麻由、寺田弘、原島秀吉、篠原康雄

「抗原抗体反応とプロテオミクスを用い
たミトコンドリア外膜に存在する VDAC
アイソフォームの発現プロファイル解
析」

第 27 回 日本 DDS 学会

2012.7.3、札幌コンベンションセンター(北
海道札幌)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 武範 (YAMAMOTO, Takenori)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センタ
ー・講師

研究者番号：8 0 4 5 7 3 2 4

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：