

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09144

研究課題名(和文)新規ミトコンドリア蛋白による心筋アミノ酸代謝制御の解明と心不全治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of myocardial amino acid metabolic regulation by novel mitochondrial protein and the development to treat for heart failure

研究代表者

的場 聖明(Matoba, Satoaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10305576

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):心不全時に発現が減少するミトコンドリア蛋白 9030617003Rikを見出し、この蛋白欠損マウスでは、哺乳類で世界で初めて心臓にD-グルタミン酸が、蓄積していることを証明した。酵素反応からこの蛋白は、D-グルタミン酸を5オキシDプロリンへと代謝していることを証明し、9030617003Rikは、Dグルタミン酸サイクラーゼであることを報告した(Sci Rep. 2017 Mar 7;7:43911.)。さらに遺伝子データベースにおいて9030617003Rik は、Dグルタミン酸サイクラーゼDGLUCYと決定された。

研究成果の概要(英文):We investigated functions of the novel mammalian mitochondrial protein 9030617003Rik and showed decreased expression under conditions of heart failure. Genomic sequence analyses showed partial homology with a bacterial aspartate/glutamate/hydantoin racemase. Subsequent determinations of all free amino acid concentrations in 9030617003Rik-deficient mice showed high accumulations of D-glutamate in heart tissues. This is the first time that a significant amount of D-glutamate was detected in mammalian tissue. Further analysis of D-glutamate metabolism indicated that 9030617003Rik is a D-glutamate cyclase that converts D-glutamate to 5-oxo-D-proline. Hence, this protein is the first identified enzyme responsible for mammalian D-glutamate metabolism, as confirmed in cloning analyses. These findings suggest that D-glutamate and 5-oxo-D-proline have bioactivities in mammals through the metabolism by D-glutamate cyclase.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 ミトコンドリア エネルギー代謝 キラルアミノ酸 Dアミノ酸 Dグルタミン酸 Dグルタミン酸サイクラーゼ アミノ酸代謝

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が進むにつれ今後も心不全患者は、増え続ける事が予想されている。心臓におけるエネルギー生産は、脂肪酸と糖の分解と酸化によりエネルギーを産生している。しかし不全心では正常時に比べ糖代謝にシフトしている。一方、癌細胞においてはワールブルク効果により糖代謝(特に嫌気性代謝)が亢進している。これらのことから、異常組織におけるエネルギー代謝状態を改善することは治療のターゲットとして重要なものと考えられる。これまでに心不全の進展には、エネルギー代謝障害、ミトコンドリア障害、酸化ストレスと、それらによる細胞死が大きく寄与していると報告されている。

これまでに私たちは p53 がミトコンドリア代謝調整を行う事 ([Science 2006;312:1650](#))、p53 の下流にある TIGAR ([TP53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator](#)) が心筋における糖代謝を制御する事 ([Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;299:1908](#)) や、質の低下したミトコンドリアは、膜電位が低下時に Parkin がミトコンドリアに局在できず、細胞の機能不全に至ることを、心筋細胞や膵臓の細胞で証明し、細胞の機能の維持が、心不全や糖尿病発症という生活習慣や寿命に関わる疾病の予防や悪化に役立つことを示した。 ([Nat. Commun 2014;4:2308](#))

本研究で我々が注目した、心不全で発現が変化する新規ミトコンドリアタンパク質 9030617O03Rik の機能を解析し、その発現機構を制御することで心不全に対する新たな治療法の発見につながるのではないかと考えられる。この分子 9030617O03Rik は種を超えて保存されており、臓器別発現では心臓・腎臓に多く発現し、心臓においても心筋細胞に優位な発現を認めた。また、遺伝子配列からの検討・電子顕微鏡・その他の実験結果よりアミノ酸配列の前半部分にミトコンドリア移行配列を有しており、ミトコンド

リア内では内膜に局在していた。

2. 研究の目的

本研究では心不全(圧負荷心不全モデル)において、コントロール群との比較で、発現が減少する新規ミトコンドリアタンパク質 9030617O03Rik の機能解析を行い、心不全に対する新たな治療戦略を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

9030617O03Rik 欠損マウス、過剰発現マウス、9030617O03Rik 過剰発現培養細胞、欠損細胞を作製し、その機能解析を行うとともにストレスに対する反応を検討する。9030617O03Rik の酵素学的検討を行った。過剰発現マウスと野生型マウス間で定常状態では体重、心機能、生存率など明らかな phenotype は認められていない。そこで、マウスをそれぞれ、コントロール群(sham)、TAC 群に分け、術後経過の評価した。生存率の評価、心臓超音波検査での経時的な心機能評価、心不全マーカーとしての BNP や ANF などの評価、不全心における糖・脂質代謝、ミトコンドリア、細胞死などの差をウエスタンブロット、HPLC、免疫染色、電子顕微鏡などを用いて調べる事により生理的な役割の検証した。

また、心筋細胞株における遺伝子制御のメカニズムを検下記のごとく検討した。

SiRNA によるノックダウン系、Adeno ウイルスを用いての一過性の過剰発現系、ラット心筋芽細胞株(H9C2 細胞)で定常的に過剰発現系としての stable cell line の樹立に成功し、これまでに細胞外フラックスアナライザー(Seahorse Bioscience 社)を使用し、過剰発現群、SiRNA 群で主要な細胞のエネルギー代謝経路である解糖、ミトコンドリアによる

好気呼吸の評価を行ったが、有意な差は見いだせなかった。そこでタンパク質の発現調整による代謝の変化をメタボローム解析により評価を行い、代謝への影響を評価した。アデノウイルスによる一過性過剰発現(Adeno)群とコントロール群間でのメタボローム解析を行ったが、その結果からは2群間で中心代謝においては有意な差は認められなかった。そのためアミノ酸代謝制御の検討を実施した。

4. 研究成果

ミトコンドリア蛋白 9030617O03Rik は、心不全の進行に伴い減少していた。アミノ酸配列からこの酵素は、D アミノ酸の代謝に関与している可能性が示唆され、この蛋白を欠損したマウスにおいて哺乳類では、世界で初めて心臓に D-グルタミン酸が、蓄積していることが証明された。酵素反応からこの蛋白は、D-グルタミン酸を 5 オキシ D プロリンへと代謝していることを証明し、9030617O03Rik は、D グルタミン酸サイクラーゼであることが証明された。以上の結果について Sci Rep. 2017 Mar 7;7:43911. doi: 10.1038/srep43911. に公表した。さらに 2017 年 7 月には遺伝子データベースにおいて 9030617O03Rik は、D グルタミン酸サイクラーゼ DGLUCY と決定された。

この DGLUCY 欠損マウスは、ミトコンドリアエネルギー代謝に変化を来しており、心不全に対して保護的に働いていることが判明し、さらなる研究に結びついた。

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 1 件)

Ariyoshi M, Katane M, Hamase K, Miyoshi Y, Nakane M, Hoshino A, Okawa Y, Mita Y, Kaimoto S, Uchihashi M, Fukai K, Ono K, Tateishi S, Hato D, Yamanaka R, Honda S, Fushimura Y, Iwai-Kanai E, Ishihara N, Mita M, Homma H,

Matoba S.

[D-Glutamate is metabolized in the heart mitochondria.](#)

Sci Rep. 2017 Mar 7;7:43911. doi: 10.1038/srep43911. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

的場聖明 加齢から心血管を守るミトコンドリアのエネルギー代謝とクオリティーコントロール 第 60 回日本老年医学会学会学術集会 2018 年 6 月 京都

Tateishi S, Matoba S. et al. Novel mitochondrial protein D-glutamate cyclase decreases during the progression of heart failure 米国心臓協会学術集会 2017 年 11 月 アメリカ合衆国カリフォルニア州 アナハイム

的場聖明 ミトコンドリア恒常性維持による心不全治療 第 26 回日本 Cell Death 学会年次集会 2017 年 7 月 東京

的場聖明 Mitochondrial Quality Control in Cardiac Disease. 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017 年 3 月 金沢

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

京都府立医科大学ホームページに掲載

心不全の解明に前進 新たな代謝酵素を発見

～心臓における D-アミノ酸代謝に関する世界初の研究論文の掲載～

http://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2017/20170309_2.html

NCBI における本タンパク質の紹介

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80017>

Wikipedia における本タンパク質の紹介

<https://en.wikipedia.org/wiki/DGLUCY>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的場 聖明 (Matoba Satoaki)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10305576

(2) 研究分担者

()

研究者番号：
(3)連携研究者 ()

研究者番号：
(4)研究協力者 ()