

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08640

研究課題名(和文)ATP依存性プロテアーゼによるミトコンドリアマトリクス蛋白質の品質管理機構の解明

研究課題名(英文)The protein quality control in mitochondrial matrix by ATP-dependent proteases

研究代表者

古山 和道 (Furuyama, Kazumichi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：80280874

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)：ミトコンドリアのマトリクスにはCLPXPとLONP1の2つのATP依存性のタンパク質分解酵素が存在するが、本研究ではそれぞれのプロテアーゼの役割分担を明らかにすることを試みた。まず、ゲノム編集により培養線維芽細胞中のCLPXPとLONP1の発現をそれぞれ欠失させたところ、通常培養条件下ではCLPXPの欠失は特に表現形に影響しなかったが、LONP1の欠失は細胞の分裂を抑制した。また、質量分析装置を用いてCLPXPあるいはLONP1の基質となりうる分子をそれぞれ同定したが、共通する分子はほとんどなかった。これらの結果は、それぞれのプロテアーゼの役割は大きく異なることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは細胞内におけるエネルギー供給を中心に様々な役割を果たしている。その機能異常は細胞の運命に重大な影響を与えるため、ミトコンドリアの機能維持の詳細を明らかにすることは細胞レベル、ひいては個体レベルでの恒常性を維持するために重要である。申請者らはミトコンドリア恒常性の維持機構を、マトリクスにおける二種類のプロテアーゼの機能に着目して研究をすすめ、それぞれのプロテアーゼの基質や役割は異なっており、特に一方のプロテアーゼは特定の代謝経路の制御に関わる可能性が高い事を見出した。さらなる検討により当該代謝経路の制御の異常を伴う疾患の病態等が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：There are two mitochondrial matrix proteases, CLPXP and LONP1, and both of them are ATP-dependent proteases that are involved in the maintenance of mitochondrial function. In the present study, we have tried to identify each protease's specific role in maintaining the function of mitochondria for cells.

We first tried to delete CLPXP genes and the LONP1 gene independently in cultured fibroblast cells to determine the specific function of each gene in the cells using genome editing. The deletion of CLPXP genes did not cause any unique phenotype, whereas the LONP1 deleted cells grew slowly. We also tried to identify the substrate of each protease using the immunoprecipitation of each protein, followed by mass-spectrometric analysis. The comparison of the data revealed that the spectrum of substrates for each protease was not overlapped. These results suggest that each protease plays an independent role in the cells to maintain the mitochondrial functions.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：ミトコンドリア マトリクス ATP依存性プロテアーゼ CLPXP LONP1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは固有の翻訳機構を有するが、マトリクスに局在するタンパク質はほとんどが細胞質で翻訳された後にマトリクスに移行して機能し、多くの機能が低下したタンパク質はミトコンドリア内で分解されると考えられている。ミトコンドリアには様々なプロテアーゼが存在するが、ミトコンドリア内におけるタンパク質の品質管理がどのように行なわれているのかについては不明な点が多い。一方、近年、マトリクスに局在するATP 依存性プロテアーゼであるCLPXPやLONP1 の癌や加齢における役割が注目されていた。

申請者はヘム生合成系の律速酵素で、ミトコンドリアのマトリクスで初発反応を触媒する5-アミノレブリン酸合成酵素(5-aminolevulinate synthase: ALAS)の発現制御機構に関する研究を行っており、全ての組織で発現するアイソザイムであるALAS1 タンパク質がミトコンドリアのマトリクスに局在するプロテアーゼであるCLPXP とヘム依存性に結合し、その結果ALAS1 はヘム依存的に分解される事を明らかにして報告した。CLPXP はアンフォールダーゼ機能を有するCLPX とプロテアーゼ機能を有するCLPP からなる複合体で、培養液へのヘム添加後30 分以内にミトコンドリア内でヘムと結合したALAS1 とCLPX が複合体を形成し、ALAS1 タンパク質は減少する。直接CLPXP がALAS1 を分解するのかについては明らかではないが、CRISPR/Cas9 システムで内在性のCLPX の発現を欠失させたHEK293 細胞では、ヘムによるALAS1 タンパク質の迅速な分解は観察されなかったため、CLPX がこの調節に必須である事は明らかである。また、ALAS1 は同じくマトリクスに局在するプロテアーゼであるLONP1 と複合体を形成する事は以前から報告されていたが、申請者らはLONP1 とALAS1 の複合体形成にはALAS1 がヘム依存性に酸化されることが重要で、ALAS1 のヘム依存性の酸化には数時間を要することを明らかにした。すなわち、CLPXP はヘム依存性の素早いALAS1 の分解に、LONP1 は時間経過に応じてALAS1 タンパク質が酸化された後の分解に関わっている可能性が高く、少なくともALAS1 タンパク質についてはCLPXP とLONP1 がそれぞれ異なる役割を担っていると考えられる。一方、ヘムと結合したALAS1 はCLPX と複合体を形成するので、ALAS1 の酸化にCLPX がアンフォールダーゼとして関与する可能性も否定できない。

### 2. 研究の目的

CLPXPとLONP1は原核生物からほ乳類まで保存されているATP 依存性のプロテアーゼで、原核生物では細胞内の不要なタンパク質の分解に関わり、真核生物でもミトコンドリアマトリクスのタンパク質の品質管理に関与する可能性が高い。しかしながら、ヒトの細胞におけるそれぞれのプロテアーゼによる基質認識機構や役割分担については不明な点が多く、CLPXP が実際にプロテアーゼとして機能するののかも明らかではない。そこでCLPXP とLONP1 によるALAS1 の分解機構の詳細を明らかにする事を手がかりに、CLPXP およびLONP1 の役割分担に基づくミトコンドリアマトリクスのタンパク質の品質管理機構の一端を明らかにする事を目的として研究を開始した。実際には、1) ALAS1のミトコンドリア内におけるヘム依存性のタンパク質複合体形成機序とそれに伴うALAS1 の分解制御機構の詳細を解明する事、また、2) マトリクスにおけるATP 依存性プロテアーゼの役割分担を解明する事を目的に、下記の研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組換えタンパク質を用いた複合体の形成と機能の解明

ALAS1, CLPX, CLPP, LONP1 タンパク質を、ミトコンドリア移行シグナル部分を含めない

成熟型タンパク質として、大腸菌で発現させ精製する。その際、効率よく生成するために、精製のペプチド配列との融合タンパク質とする。組換えタンパク質として得られた ALAS1 タンパク質と CLPXP (CLPX+CLPP) あるいは LONP1 を *in vitro* で反応させ、反応系にヘムや ATP をさまざまに組み合わせて添加する事により複合体を形成する為に必要な因子が何かを、あるいは、ALAS1 が分解されるかどうかを明らかにする。

(2) ヒトの培養細胞を用いた CLPXP あるいは LONP1 遺伝子発現の欠失と表現形の観察

Dox誘導性に様々なタンパク質を発現させる事が可能な Flp-In T-Rex システムの HEK293 細胞 (FT293, Invitrogen) に、欠失させる遺伝子に対応する guide RNA と Cas9 タンパク質を同時に発現させるベクターを導入する方法により当該遺伝子を欠失させた。遺伝子の欠失が致死の表現形を呈することが予想される場合には、guide RNA が認識しないがアミノ酸配列は変化しないように当該領域の塩基配列を変更した当該遺伝子の Dox 誘導性発現ベクターを前もって細胞に組み込み、Dox 誘導性に当該遺伝子を発現させながら内在性の遺伝子の欠失を試みた。

(3) ヒトの細胞における CLPX, CLPXP, LONP1 の基質の同定

上述の FT293 細胞を用いて、CLPX あるいは LONP1 の C 末端に FLAG-tag を付与してヒト由来培養細胞内でドキシサイクリン (Dox) 誘導性に強制発現させ、免疫沈降法にて精製した後、複合体をトリプシンで処理し、その構成分子を液体クロマトグラフィーと質量分析装置 (LC-MS) により同定した。CLPX と LONP1 は FT293 細胞でも発現しているため、内在性の CLPX や LONP1 が FLAG 融合タンパク質との複合体の形成を阻害する可能性がある。そのような可能性をできる限り排除する為に、前もって CRISPR/Cas9 システムを用いて内在性の CLPX あるいは LONP1 を欠失した FT293 細胞を作成して利用した。

#### 4. 研究成果

(1) 組換えタンパク質を用いた複合体の形成と機能の解明

大腸菌を用いて ALAS1 タンパク質を発現・精製する際に、極端に収量が低下することが明らかとなり、その原因を探していたところ、ALAS1 タンパク質を発現させた大腸菌のペレットが茶色く色づくことから、大腸菌の中で heme が蓄積し、その結果、大腸菌の中で組換え ALAS1 タンパク質が分解されるものと考えられた。そのため、ヘム合成の阻害薬であるスクシニルアセトンを培養液中に添加したところ、大腸菌のペレットの着色は軽減し、組換え ALAS1 タンパク質の収量も改善した。さらに、ヒト CLPX とヒト CLPP の組換えタンパク質を大腸菌の中で発現させた場合に、大腸菌由来の CLPX や CLPP とホモあるいはヘテロ複合体を形成し、ヒト由来組み換えタンパク質の精製の過程で大腸菌由来の CLPX や CLPP が混入する可能性についても検討した。その結果、我々が用いた精製条件では大腸菌由来の CLPX や CLPP が混入している可能性は低い事を質量分析法により確認した。組換え精製タンパク質を用いて、ヒト ALAS1 タンパク質がヒト CLPXP により分解されるか否かを確認したところ、ヒト ALAS1 タンパク質は ATP 依存性にヒト CLPXP により *in vitro* で分解されることが確認された。さらに、*in vitro* においても CLPXP がヘム依存性に ALAS1 を認識して切断するか否かについては現在検討中である。また、LONP1 の組換えタンパク質については現在のところ精製に成功していない。タンパク質の単量体の分子量が約 100kDa 超と大きいことが大腸菌における発現と精製が困難で有ることと関連していると推察しているが、現在のところ有効な解決策は見つかっていない。

(2) CLPXP 遺伝子と LONP1 遺伝子の欠失による表現形の変化

FT293 細胞で CLPX、CLPP の両方の遺伝子を欠失させたところ、通常条件で継代培養を続ける限りは特に大きな影響は無いようであった。一方、LONP1 遺伝子を欠失した細胞は当初得られなかったため、LONP1-FLAG を DOX 誘導性に発現可能な細胞をまず樹立したのちに、LONP1-FLAG を発現させながら内在性の LONP1 を欠失させることにより、内在性の LONP1 遺伝子の発現を欠失した細胞を樹立した。その後、培養液中から Dox を取り除くことにより LONP1 の欠失状態として観察したところ、Dox 除去後、LONP1 の発現の低下に合わせて細胞の増殖速度も低下し、継代培養が維持できなくなることが明らかになった。これらの遺伝子欠失に伴う表現形の違いは、細胞内の恒常性維持におけるそれぞれのプロテアーゼの役割の違いを直接反映するものと考えている。

### (3) CLPXP と LONP1 のヒトの細胞における基質の同定と役割分担の解明

認識する基質を明らかにする事を目的に、CLPX に FLAG-tag を付与して強制発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、質量分析装置により免疫沈降物の中の分子の同定を試みた所、CLPP のみならずミトコンドリア内のシャペロンタンパク質や糖・脂質代謝に関わる酵素など様々なタンパク質と複合体を形成する事が明らかとなった。LONP1 についても同様の解析を実施したところ、同じく様々なタンパク質と複合体を形成することが明らかとなったが、CLPX のそれとは異なっており、CLPX と LONP1 との両方のタンパク質と複合体を形成する分子はほとんど認めなかった。以上の結果は、CLPX と LONP1 の基質が異なる可能性を示唆するものと考えているが、一方で LONP1 と複合体を形成するタンパク質の同定数が CLPX に比較して少なかったことから、さらなる検討が必要な可能性が高いと考えている。また、組換えタンパク質を用いた *in vitro* の実験により ALAS1 は CLPXP により直接分解されることが明らかとなったが、今回の質量分析を用いた解析では CLPX と複合体を形成する分子の中に ALAS1 は含まれていなかった。この原因としては、CLPXP により分解されるタンパク質は分解されるが故に複合体を形成するタンパク質として同定することが困難である可能性と、現在使用している質量分析装置の感度が不十分なために検出できない可能性などが考えられる。 に関しては対応が困難だが、 に関してはプロテアーゼである CLPP を欠失した細胞を利用して CLPX と複合体を形成する分子を同定する方法や、あるいは他のタンパク質と結合するが ATP を利用できないために分解まで至らないような CLPX、LONP1 の変異体を用いて免疫沈降することにより解決できないか、現在検討中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Kaneko K, Kubota Y, Nomura K, Hayashimoto H, Chida T, Yoshino N, Wayama M, Ogasawara K, Nakamura Y, Tooyama I, Furuyama K	4. 巻 65
2. 論文標題 Establishment of a cell model of X-linked sideroblastic anemia using genome editing.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Hematol	6. 最初と最後の頁 57-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2018.06.002.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Fujiwara Tohru, Fukuhara Noriko, Ichikawa Satoshi, Kobayashi Masahiro, Okitsu Yoko, Onishi Yasushi, Furuyama Kazumichi, Harigae Hideo	4. 巻 96
2. 論文標題 A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: a case report and literature review	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1955 ~ 1957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-017-3106-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furuyama Kazumichi, Kaneko Kiriko	4. 巻 107
2. 論文標題 Iron metabolism in erythroid cells and patients with congenital sideroblastic anemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 44 ~ 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-017-2368-0	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田美子, 金子桐子, 鈴木亘, Kamata Costantine Chasama, 古山和道
2. 発表標題 ミトコンドリア内ヘム依存的ALAS1分解の調節機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田美子, 草壁香帆里, 久慈 強, 金子桐子, 野村和美, 博多修子, 古山 和道
2. 発表標題 ヘム合成経路の律速酵素ALAS1の分解経路の抑制によるゲノム不安定性の誘導
3. 学会等名 生化学会東北支部第84回例会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子 桐子, 林本 遥, 千田 大誠, 久保田 美子, 野村 和美, 小笠原 勝利, 和山 真里奈, 吉野 直人, 中村 幸夫, 遠山 育夫, 博多 修子, 古山 和道
2. 発表標題 遺伝性鉄芽球性貧血モデル細胞の樹立
3. 学会等名 生化学会東北支部第84回例会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子桐子, 久保田美子, 野村和美, 林本遥, 千田大誠, 吉野直人, 和山真里奈, 小笠原勝利, 中村幸雄, 遠山育夫, 古山和道
2. 発表標題 ALAS2変異による鉄芽球性貧血のモデル細胞構築
3. 学会等名 第682回岩手医学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田 美子, 久慈 強, 古山 和道
2. 発表標題 ヘム合成経路の律速酵素ALAS1の分解経路の低下によるゲノム不安定性の誘導
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野村 和美、北川 悠、大木 祐亮、久保田 美子、金子 桐子、古山 和道
2. 発表標題 ヒトCLPX-CLPP複合体によるヘム結合型ALAS1の認識及び分解メカニズムの解明
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金子 桐子、千田 大誠、久保田 美子、野村 和美、古山 和道
2. 発表標題 ALAS2変異による遺伝性鉄芽球性貧血のモデル細胞樹立
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手医科大学学生化学講座分子医化学分野紹介 <a href="http://www.iwate-med.ac.jp/education/gakubu_in/med_kouza/seika/">http://www.iwate-med.ac.jp/education/gakubu_in/med_kouza/seika/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保田 美子  (Kubota Yoshiko)  (30260102)	岩手医科大学・医学部・准教授   (31201)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金子 桐子 (Kaneko Kiriko)  (10545784)	岩手医科大学・医学部・講師  (31201)	
研究分担者	野村 和美 (Nomura Kazumi)  (50733581)	岩手医科大学・医学部・助教  (31201)	
研究分担者	鈴木 亘 (Suzuki Ko)  (90610395)	岩手医科大学・医学部・助教  (31201)	