

## 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 5月15日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590314

研究課題名（和文）ベータ酸化系を制御するシグナル系の解析

研究課題名（英文）Studies on molecular basis for regulation of beta-oxidation system

研究代表者

本間 好 (HOMMA YOSHIMI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60192324

研究成果の概要（和文）：

肺線維症患者肺組織より独自に樹立した初代培養細胞（肺線維症細胞）では、ミトコンドリアでβ酸化を担う VLCAD1 のリン酸化レベルが有意に減少していた。VLCAD1 のリン酸化部位はセリン586でPKAによりリン酸化されること、変異体の解析から、リン酸化の低下が活性酸素生成の促進につながることを明らかにした。β酸化系がPKAなどのミトコンドリア内シグナル伝達分子により調節されていて、その異常が活性酸素生成につながる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Phosphorylation level of VLCAD1 decreased in mitochondria of lung fibroblasts established from patients with idiopathic pulmonary lung fibrosis. PKA phosphorylated VLCAD1 at Ser-586, and its phosphorylation-defective mutant enhanced production of radical oxygen species. These suggest that beta oxidation system is regulated by intra-mitochondrial signaling system including PKA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：リン酸化、シグナル、ミトコンドリア、デヒドロゲナーゼ、脂肪酸、過酸化脂質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) β酸化は生体のエネルギー供給において中心的な役割を担う代謝系であり、主にミトコンドリア内膜に存在する脂肪酸代謝酵素を含む複雑な分子複合システムである。脂肪酸β酸化に関与するアシルCoAデヒドロゲナーゼ（ACAD）ファミリー分子として、現在5つのアイソフォームが報告されている。それらのうちの一部については構

造解析や酵素活性の分子機構などの解明が進んでおり、基質などとの相互作用に必要な構造が明らかにされている。

(2) β酸化の異常に関する報告については、脂肪酸輸送タンパク質やACADの変異に関するものが最も多い。特に、貯蔵脂肪酸の分解に関与する超長鎖脂肪酸デヒドロゲナーゼ（VLCAD1）の欠損では、心臓および肝臓の機能不全で生後1年以内に死亡することが

明らかにされている。また、VLCAD1、中鎖脂肪酸に親和性の高い MCAD や、短鎖脂肪酸に高親和性の SCAD の欠損や様々な変異が脂質代謝異常やエネルギー欠損を伴った種々の病態を惹き起こすことが報告されている。しかし、 $\beta$ 酸化の制御機構や分子基盤についての報告はほとんどなく、解明すべき課題として残されている。

(3) 申請者らは、独自に肺線維症患者肺組織より樹立した初代培養細胞（肺線維症細胞）を用いて、肺線維症細胞では活性酸素や過酸化脂質の生成量が有意に高く、その代償としてセレンタンパク質Pなどの抗酸化ストレスタンパク質の発現が極めて高いことを示し、活性酸素が $\beta$ 酸化系由来である可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

(1) 線維症細胞や他の培養細胞を用いて、活性酸素や酸化ストレスがどのような機序で発生するのかを明らかにする。特に、 $\beta$ 酸化の律速酵素であるアシル CoA デヒドロゲナーゼ (ACAD) ファミリー分子や、電子伝達系の各コンポーネントの調節系に注目する。

(2)  $\beta$ 酸化系や電子伝達系の調節に関与するミトコンドリア内のシグナル伝達分子や経路について、様々な条件下で培養した場合や、がん細胞や肺線維症細胞などの病態細胞で変化を比較解析する。また、糖尿病や飢餓などの病態におけるシグナル伝達経路を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア全タンパク質のプロテオーム解析：二次元電気泳動法にて、肺線維症細胞の全ミトコンドリアタンパク質の発現量や翻訳後修飾の変化を解析する。既報に従い質量分析装置 (TOF-MS/MS) を用いてプロテオーム解析し目的とするタンパク質の同定を行う。

(2) シグナル伝達経路の解析：目的のタンパク質について、リン酸化部位にアクティブまたはネガティブ変異を導入した発現クローンを作製する。これらを HEK293 などの培養細胞で発現させ、細胞中の酵素活性や活性酸素の生成量を測定する。また、シグナル伝達分子複合体のプロテオーム解析等により、正常な酵素活性の制御や活性酸素の生成に関連するシグナル伝達系による調節機構を明らかにする。

(3) 病態と関連した $\beta$ 酸化制御系の解析：肺線維症細胞や各種培養細胞などを用いて、培養条件や刺激等で変動するミトコンドリア内シグナル伝達分子を解析する。これらの変化がどのようなメカニズムで起こるのか、細胞質側のシグナル伝達系とどのように連動しているのかについて検討する。

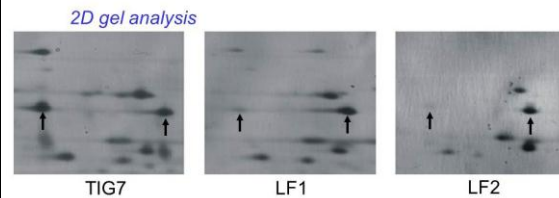


図 1. VLCAD1 のリン酸化

正常肺線維芽細胞 TIG7 と肺線維症細胞 LF1 および LF2 の VLCAD1 (矢印) を示す。リン酸化スポット (左側) が、TIG7 に比して LF1 および LF2 で有意に減少している。この他に両者で異なる 3 スポットを検出したが、翻訳後修飾の違いではなかった。

## 4. 研究成果

(1) 肺線維症細胞および正常肺線維芽細胞 TIG7 より調製したミトコンドリア全タンパク質の二次元電気泳動法で解析した結果、肺線維症細胞に特有な変化を 4 つ検出した。質量分析装置にてタンパク質を同定し、その一つが ACAD ファミリーに属する VLCAD1 であることを明らかにした (図 1)。そして、正常細胞では VLCAD1 が恒常的にリン酸化されているのに対し、肺線維症細胞ではそのレベルが有意に減少していた。ペプチドの詳細な質量分析解析から、VLCAD1 のリン酸化部位はセリン 586 であった。また、このリン酸化部位の変異体を発現させることにより、活性酸素や過酸化脂質の生成が促進することを確認した (図 2)。

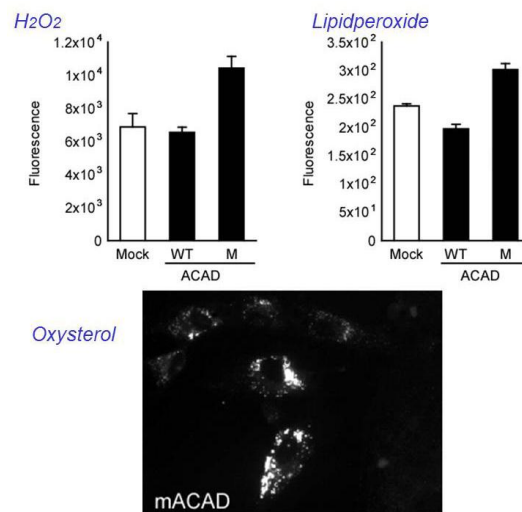


図 2. Ser-586 変異体の発現

リン酸化部位 Ser-586 を Ala に置換したネガティブ変異を HEK293 細胞に発現させ 24 時間培養した後、細胞が産生する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量および過酸化脂質量を既報により測定した (図上)。同様に、酸化コレステロールを検出した (図下)。PKA による Ser-586 のリン酸化が ACAD 活性効率を高め、活性酸素の生成を抑えることを示唆した。

(2) VLCAD1 のセリン 586 をリン酸化するキナーゼとして PKA を同定した。実際に、PKA 阻害剤により VLCAD1 セリン 586 のリン酸化が低下すること、精製 PKA がセリン 586 を含む合成ペプチドやリコンビナントタンパク質を効率よくリン酸化すること (図 3)、肺線維症細胞のミトコンドリア内の PKA 活性が、正常細胞のそれに比して有意に低下傾向にあること、などを確認した。以上のことから、 $\beta$ 酸化システムが PKA などのシグナル伝達分子により調節されていること、肺線維症細胞の過酸化脂質生成に  $\beta$ 酸化システムが関与する可能性を示した。肺線維症細胞ミトコンドリア内の PKA 活性が低下する原因については、現在も解析が継続している。

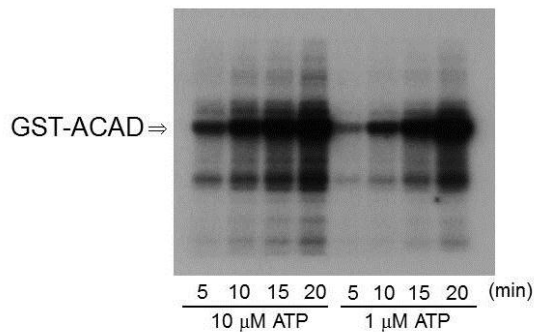


図 3. VLCAD1 の PKA によるリン酸化  
精製したリコンビナント VLCAD1 分子と精製 PKA とを用いた *in vitro* キナーゼアッセイの結果を示す。細胞内で PKA を活性化することにより、VLCAD1 のリン酸化が促進することを二次元電気泳動で確認した。これらの結果は、実際に細胞内で PKA により VLCAD1 がリン酸化されることを示す。

(3)  $\beta$ 酸化系および電子伝達系のプロテオーム解析の過程で、構成コンポーネントのうちの数種をチロシンリン酸化タンパク質として同定した。Src ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤である PP2 で細胞を処理すると、ミトコンドリアの酸素消費が著しく阻害され、同時に活性酸素生成が増加した。同様の結果を、c-Src のネガティブ変異体や負の調節タンパク質 Csk をミトコンドリア内の発現させた場合にも観察した (図 4)。ミトコンドリアには c-Src が比較的高く発現しており、プロテオーム解析により、c-Src のターゲットとして  $\beta$ 酸化系に含まれる 1 分子、電子伝達系に含まれる 3 分子のリン酸化部位を特定した。リン酸化部位のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体の発現解析から、リン酸化が細胞死や活性酸素の生成に関与する場合があることを明らかにした。以上のことから、c-Src が直接  $\beta$ 酸化系やそれに連動する電子伝達系を調節し、エネルギー代謝や活性酸素生成を制御することを示した (論文投稿中)。

以上の研究から、 $\beta$ 酸化を含む酸化リン酸化系の制御やそれに伴う ROS 生成が、ミトコンドリア内シグナル伝達分子により制御されることを明らかにした。しかし、シグナル伝達経路自体に関しても、また、呼吸コンポーネントのリン酸化を含めた翻訳後修飾の意義についても知見が少ない。ミトコンドリアが関与する細胞機能を解明するには、ATP や活性酸素生成とそれを調節するシグナル伝達を解析することが重要である。

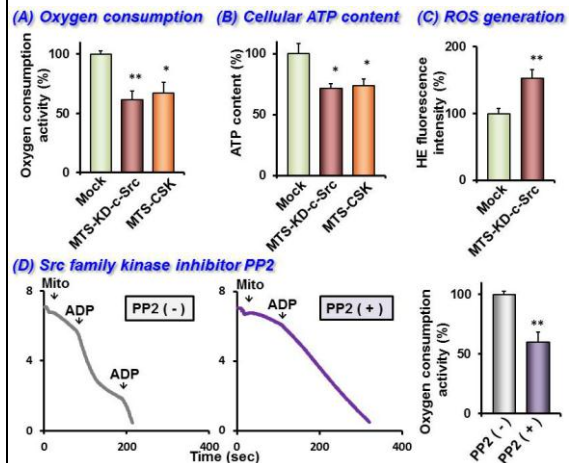


図 4. c-Src とミトコンドリア機能  
c-Src のネガティブ変異体 KD-c Src や負の調節タンパク質 Csk をミトコンドリア内の発現させた場合の酸素消費 (A)、ATP 生成量 (B)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量 (C) に与える影響を測定した。また、Src ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤 PP2 の酸素消費曲線への影響を評価した (D)。KD-c Src、Csk、PP2 の場合全てでミトコンドリアの酸素消費が著しく阻害され、同時に活性酸素生成が増加した。以上から、ミトコンドリア呼吸機能の調節や活性酸素生成の抑制に c-Src が重要な役割を果たしていることが判明した。ミトコンドリア内 c-Src の調節メカニズムを解明することが次の課題となる。

## 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 4 件)

- ①Kabuyama Y, Suzuki T, Nakazawa N, Yamaki J, Homma MK, Homma Y, Dysregulation of very long chain acyl-CoA dehydrogenase coupled with lipid peroxidation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 査読有, 298 巻, 2010, C107-113,
- ②Murakami R, Osanai T, Tomita H, Sasaki S, Maruyama A, Itoh K, Homma Y, Okumura K, p122 protein enhances intracellular calcium increase to acetylcholine. Its

possible role in the pathogenesis of coronary spastic angina. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 査読有, 30 巻, 2010, 1968-1975,

〔学会発表〕(計 10 件)

①小椋正人, 八巻淳子, 本間美和子, 本間好, ミトコンドリア c-Src キナーゼ活性を制御する新規相互作用タンパク質の同定と機能解析. 84 回日本生化学会大会, 平成 23 年 9 月 24 日, 京都

②Homma Y, Ogura M, Homma MK, Src regulates mitochondria function and ROS generation through direct phosphorylation of respiration components. Charles Heidelberger International Symposium on Cancer Research, 平成 23 年 6 月 6 日, 中国西安,

③Ogura M, Yamaki J, Homma MK, Homma Y, Reguratory mechanism of oxidative phosphorylation by mitochondrial c-Src. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 平成 23 年 1 月 26 日, 米国キーストーン,

④小椋正人, 八巻淳子, 本間美和子, 本間好, Regulation of oxidative phosphorylation by mitochondrial c-Src. 83 回日本生化学会大会, 平成 22 年 12 月 10 日, 神戸市,

⑤Homma Y, ROS production in lung fibrosis myofibroblasts. Charles Heidelberger International Symposium on Cancer Research, 平成 22 年 1 月 18 日, タイ国ピサヌローク,

⑥鈴木俊幸, 蕪山由己人, 八巻淳子, 本間美和子, 本間好, 肺線維芽細胞のプロテオミクス解析. 82 回日本生化学会大会, 平成 21 年 12 月 22 日, 神戸市,

〔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

<http://www.fmu.ac.jp/home/biomol/html/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本間 好 (HOMMA YOSHIMI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60192324

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし