

様式 C-19

平成 23年 4月 30日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21770208
研究課題名 (和文) ミトコンドリア由来の酸化ストレス応答とシグナル伝達の分子メカニズムの解析
研究課題名 (英文) Study of the molecular mechanism of oxidative stress response induced by mitochondrial ROS
研究代表者
 渋谷 利治 (SHIBUYA TOSHIHARU)
 大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70448033

研究成果の概要 (和文)：

ミトコンドリア内で ROS を人工的に発生誘導することが可能な動物培養細胞とトランスジェニック線虫を用いた実験システム系を構築する事に成功した。この系を用いることで、in vitro および in vivo におけるミトコンドリア由来 ROS により誘導される細胞内ストレス応答の経時的流れの一端を解き明かした。特に、ミトコンドリア膜の透過性調節に関与する因子 (シクロフィリン D とカルシウムイオン) がストレス応答の一部に寄与している事を見いだした。

研究成果の概要 (英文)：

An experimental assay system was employed to generate excessive ROS in the mitochondria in a precisely controlled spatio-temporal manner. Using mammalian cells and worm *C. elegans* generating mitochondrial ROS, I analyzed the stress response and the molecular mechanism induced by mitochondrial ROS in vitro and in vivo. I revealed that factors involved in the mitochondrial permeability transition (Cyclophilin D and Ca⁺⁺) were contributed to the mitochondrial oxidative stress response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：酸化ストレス、ミトコンドリア、細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスに関する研究は、世界中の多くの研究機関、製薬/医療業界で精力的に行われており、これまで多くの因子が酸化ストレス関連因子として単離・同定され、様々な異なるシグナル伝達機構（酸化ストレス応答）の存在が明らかとなっている。しかしながら、個々の因子の詳細な相互作用、修飾の分子レベルでのメカニズム、並びにその時間的制御については、ほとんどわかっていない。さらに、ROS の発生部位の違いによる種々の異なる酸化ストレス-シグナル伝達の分子機構の解明はあまり進展しておらず、また、本研究課題である ROS の最大発生源であるミトコンドリアに起因する酸化ストレス応答に関する研究の情報も、ほとんどないのが現状である。

加えて、ミトコンドリアに起因する酸化ストレス応答に関する研究戦略は以下の2つの方法が従来から行われて来た。しかしながら、これら2つの実験戦略にはいくつかの問題点があった。(i)細胞又は実験モデル生物を過酸化水素に代表される ROS で処理し、その変化・応答を解析する、(ii)薬剤、又は変異の導入により細胞内の種々の酵素活性機能を人為的に操作することで ROS を発生させ、それによる変化・応答を解析する。(i)の実験では、外部より導入した ROS が細胞内の様々な場所（細胞内小器官）に広く行き渡り、それら多くの場所で異なる酸化ストレス-シグナル応答を“同時に”発動させてしまうため、解析と解釈を複雑かつ困難にしている。同様に、(ii)の薬剤や変異による処理も、ROS による応答のみならず、酵素活性等の異常による応答も引き起こされるため、細胞内の真の酸化ストレス応答を解析するには至っていないのである。それゆえ、ミトコンドリア由

来酸化ストレス研究の進展のためには、変異操作などにより種々の機構を阻害する事なく、かつ ROS をミトコンドリア特異的に発生させることのできるアッセイ系の確立が不可欠だと考えられた。そこで、本研究では、過去の研究戦略の問題点を打破する画期的かつ独創的な研究戦略（実験系）の構築することに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「ミトコンドリア由来の ROS により、どのような細胞内ストレス応答が生じ、どのように細胞が死へと導かれるのか？ および、その機構にどのような因子（タンパク質、イオン、膜物質、核酸分子など）が関与しているか？」を解明することである。近年、癌、自己免疫疾患、虚血性臓器疾患、神経性疾患、糖尿病など様々な疾患および老化に、ミトコンドリア由来の ROS が主要原因になりうる事が示唆されている。ゆえに本研究目的の達成により得られる情報は、上記疾患の治療および治療薬開発のストラテジー構築に大きく貢献することも期待される。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成する手段として、ミトコンドリア内で ROS を人工的に発生誘導する実験系を考案した。まず、緑色の励起光照射により強力な ROS を発生することができる蛍光タンパク質（KillerRED）にミトコンドリア移行シグナルを付加した融合タンパク質を作成する事で、ミトコンドリア内に ROS を発生する実験系を構築した。このシステムを導入した動物培養細胞を用い、以下の3点の解析を重点的に試みる事により、ミトコンドリア由来 ROS により誘導されるストレス応答

(経時的な変化) と、それに関与する因子の同定へと導く情報を得る。

(1) 「遺伝子レベルでの応答 (遺伝子発現) 変化」を検出するために RT-PCR 又は DNA マイクロアレー解析を行う。

(2) 「タンパク質レベルでの変化」を様々な抗体を用いたウエスタンブロッティングで解析する。特に、過去の研究より酸化ストレスへの関与が示唆されている MAP キナーゼ系、レドックスシグナル系や細胞死に関わる因子の発現量やリン酸化の経時的な変化を重点的に調べると共に、(a) の DNA マイクロアレーで得られた因子の挙動を解析し、新規酸化ストレス関連因子の同定を行う。

(3) 「細胞形体や細胞内小器官の形態学レベルでの変化」を、免疫染色法や電子顕微鏡により解析する。特に近年、オートファジーにより破綻 (機能低下) したミトコンドリアを除去する機構が存在する事が示唆されているが、その詳細は不明である。そこで、オートファジーとの関連性を検証するために、オートファジーのマーカータンパク質である LC3 と GFP との融合タンパク質の挙動を調べる。加えて、Parkin と GFP との融合タンパク質の挙動の追跡し、ミトコンドリアの処理機構の解明にも迫る。

4. 研究成果

動物培養細胞 (ヒト HeLa, HEK293T、マウス MEF 細胞) のミトコンドリアに KillerRed を発現する細胞を構築し、緑色励起光照射によりミトコンドリア内のみで ROS を発現誘導でき、申請者の提案した実験系がうまく機能することが確認された。この実験系と動物培養細胞を用い、上記「方法」の項で記載した「(1) 遺伝子レベルでの応答変化、(2) タンパク質レベルでの応答変化、(3) 形態学レベルでの応答変化」の情報を得る様々な実験を実

施し、下記の「ミトコンドリア由来 ROS による細胞内ストレス応答の経時的流れ」を突き止めた。

ミトコンドリア内で ROS が発生すると、初期にミトコンドリアの断片化および膜の膨張が生じる事を電子顕微鏡レベルでの解析で明らかにした。また、ミトコンドリア膜電位の低下後、傷害を受けたミトコンドリアの除去に働くことが示唆される Parkin タンパク質がミトコンドリア上に凝集してくる事を見いだした。加えて、カスパーズ阻害剤を用いた実験から、ミトコンドリア ROS により引き起こされる細胞死はカスパーズ依存的細胞死 (アポトーシス) と非依存的細胞死 (ネクロトーシス) の両者が組み合わさっている事も判明した。また、薬剤ライブラリーを用いたスクリーニング解析から、ミトコンドリア膜透過性遷移現象の制御因子 (シクロフィリン D およびカルシウムイオン) に対する阻害薬がミトコンドリア由来 ROS による細胞内ストレス応答に抑制的な影響を与える事を見いだした。この知見は、従来から指摘されていた「ミトコンドリア ROS とミトコンドリア膜透過性遷移現象との関わり」を強く支持するものになった。現在、実験系の構築と培養細胞を用いた上記の実験結果は学術雑誌への投稿の準備を進めている。

さらに、in vivo におけるミトコンドリア由来 ROS の影響を解明する手段として、モデル生物線虫 (C. elegans) を本研究に新たに導入した。線虫の筋肉細胞のミトコンドリアで ROS を発生するトランスジェニック線虫の構築に成功した。これまで、ミトコンドリア ROS により、線虫ミトコンドリアの形態異常と、筋肉ミトコンドリアの機能破綻に伴う運動性の低下を検出している。これまで国内外において、申請者の構築した線虫ミトコンドリア ROS 実験系の報告はなく、得られた知見

のインパクトはかなり高いと言える。今後、線虫の遺伝学を用いたスクリーニングにより、ミトコンドリア由来 ROS に誘導されるストレス応答の流れに関与する未知の因子の単離同定へと展開させて行く。上述のとおり線虫の実験系はまったく新しい独創的な系であるため、研究目的達成への大きな足掛かりとなる事が期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 渋谷利治

Cell death induced by mitochondrial ROS generated by photodynamic action of KillerRed protein

The 7th Conference of Asian Society for mitochondrial Research and Medicine

2010年12月16日

福岡国際会議場 (福岡市、福岡県)

② 渋谷利治

Study of cell death induced by mitochondrial ROS generated by mtKillerRed protein

第33回日本分子生物学会

2010年12月10日

神戸ポートアイランド (神戸市、兵庫県)

③ 渋谷利治

Study of cell death induced by photodynamic action of mitochondrial KillerRed protein

Gordon Research Conference (Cell Death)

2010年8月25日

Salve Regina University アメリカ合衆国 (RI)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gene/www/laboratory/shibuya1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 利治 (SHIBUYA TOSHIHARU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70448033

(2) 研究分担者

なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

()

研究者番号：