

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16102

研究課題名（和文）心臓におけるミトコンドリア分解制御機構の解明と心不全治療薬創薬に向けた基礎的検討

研究課題名（英文）Investigation of the mechanisms for mitochondrial degradation in the heart

研究代表者

村川 智一（Tomokazu, Murakawa）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50902194

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）：我々は、ミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーの関連分子としてBcl2-L-13を同定し、そのリン酸化がマイトファジー活性に重要であることを報告したが、その生体における意義は不明であった。本研究では、Bcl2-L-13の非リン酸化変異体ノックインマウスを作製し、圧負荷誘導性心不全モデルを用いた検討を行った。ノックインマウスは野生型に比して圧負荷に脆弱であったことから、Bcl2-L-13のリン酸化が生体においても心臓のストレス応答に重要であることが示唆された。さらに、その責任kinaseを同定すべくsiRNAライブラリを用いたスクリーニングを行い、74の候補分子を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓は多量にエネルギーを必要とする臓器であり、ミトコンドリアを多く含む。心不全では異常ミトコンドリアが蓄積しており、それを除去する機構であるマイトファジーが重要であると考えられる。我々は、マイトファジー関連分子としてBcl2-L-13を同定した。本研究において、Bcl2-L-13の活性化を制御するリン酸化が生体において心臓へのストレスに対して重要な働きをしていることが示唆された。さらに、活性化メカニズムを明らかにするためにスクリーニングを進めている。これは、マイトファジー活性を亢進する薬剤の開発につながると考えられ、ミトコンドリアの恒常性維持という新しい概念の心不全治療となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We identified Bcl2-L-13 as a molecule associated with mitophagy, mitochondrial selective autophagy, and reported that the phosphorylation is important for its mitophagic activity, but its significance in vivo was unclear. In this study, we generated non-phosphorylatable mutant knock-in mice of Bcl2-L-13 and investigated using a pressure overload-induced heart failure model. Knock-in mice were more vulnerable to pressure overload than wild-type mice, suggesting that phosphorylation of Bcl2-L-13 is also important for stress response in the heart in vivo. Furthermore, we conducted screening using an siRNA library to identify the responsible kinase and obtained 74 candidate molecules.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マイトファジー ミトコンドリア 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は絶えず収縮拡張を繰り返しているため、エネルギー需要が非常に高い。この高いエネルギー需要に対応するため、心筋細胞内には他の細胞に比べて非常に多くのミトコンドリアが存在する。ミトコンドリアは細胞内におけるエネルギー産生を担う重要なオルガネラである一方、障害を受けると活性酸素種の産生、細胞死誘導性蛋白質の放出、炎症惹起性ミトコンドリア DNA の放出などを引き起こし、細胞傷害性の高い側面も持つ。このような異常ミトコンドリアを検出し、隔離及び分解を適切に行うことが、ミトコンドリア、心筋細胞、そして心臓の機能維持に繋がると考えられる。つまり、不全心では心筋細胞が持つ分解能力を超えるほどに異常ミトコンドリアが多く産生される結果、異常ミトコンドリアが蓄積し、心不全の発症・進展メカニズムの要因となっている可能性がある。そこで我々は、細胞内の主要な分解経路であるオートファジー、特にミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーに注目した。マイトファジーの分子機構解析は酵母において先行しており、マイトファジー必須分子として Atg32 が同定されている (Okamoto et al. *Dev Cell*, 2009)。しかしながら、哺乳類細胞のマイトファジーにおいては、若年性パーキンソン病の原因遺伝子である Parkin/PINK1 を介する系や種々のレセプター蛋白質を介する系が報告されているが、マイトファジー分子機構の全容は未だ解明されていない。我々は、新たなマイトファジー関連分子として Atg32 の哺乳類ホモログを探索することとし、タンパク質データベースの網羅的検索により Bcl2-L-13 を同定した。Bcl2-L-13 は、Atg32 欠失酵母への導入によりマイトファジーを誘導することが可能であり Atg32 の哺乳類細胞における機能的ホモログと考えられた。また、我々は Bcl2-L-13 が哺乳類細胞においてミトコンドリア分裂誘導とマイトファジー誘導の二つの機能を併せ持つことを明らかにした。リン酸化部位の一つである Ser272 の非リン酸化変異体では、マイトファジーの誘導が抑制された。従って Ser272 のリン酸化が Bcl2-L-13 の活性化機構であることが示唆された。次に我々は Bcl2-L-13 によるマイトファジーの開始機構を明らかにするために 26 種類のオートファジー関連遺伝子 (ATG) 欠失酵母を作成し、スクリーニングを行った。その結果、Bcl2-L-13 が酵母において飢餓誘導性のオートファジーに必須な ATG1 複合体 (Atg1, Atg13, Atg17, Atg29, Atg31) を利用してマイトファジーを誘導していることを見出した。また、ATG1-ATG8 の相互作用が必要であることを明らかにした。この結果をもとに、哺乳類細胞では ATG1 複合体に対応する ULK1 複合体 (ULK1 (Atg1 ホモログ), ATG13, FIP200 (Atg17 ホモログ), ATG101) がマイトファジーの開始に利用されていること、ULK1-LC3 (Atg8 ホモログ) の相互作用が必要であることを明らかにした (Murakawa et al. *Cell Rep*, 2019)。

このように我々は Bcl2-L-13 の機能をこれまで解明してきたが、Bcl2-L-13 の生体における役割は未だ明らかではない。そこで、本研究では I. 圧負荷による心不全発症進展においてマイトファジーは保護的役割を有するか、II. Bcl2-L-13 の活性はどのように制御されているのか、という問いを検証することにより Bcl2-L-13 及びマイトファジーの心臓における機能の全容を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究は、我々が同定したマイトファジー関連分子である Bcl2-L-13 の遺伝子改変マウスを用い、圧負荷誘導性心不全モデルを作製・解析することにより、心不全における Bcl2-L-13 及びマイトファジーの役割を明らかにし、心不全発症進展メカニズムの解明に結び付けるとともに、Bcl2-L-13 の活性化機構を解明し、Bcl2-L-13 のマイトファジー活性を制御することによる新たな心不全治療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1). 心不全における Bcl2-L-13 関連マイトファジーの解析

Bcl2-L-13 S272A ノックインマウスを用い、横行大動脈結紮術 (TAC) により圧負荷誘導性心不全モデルを作成した。

上記のモデルマウスの基本的な表現型データを得るため、心エコー図やカテーテル検査による心機能、臓器重量、心臓における遺伝子・蛋白質発現、組織学的評価を行った。

上記のモデルマウスの心臓におけるミトコンドリア機能を評価するため、左室での ATP 産生を評価した。

(2). Bcl2-L-13 Ser272 の責任 kinase の同定

責任 kinase を同定するため、kinase siRNA ライブラリを用いて、脱共役剤である carbonyl cyanide m- chlorophenyl-hydrazone (CCCP) 誘導性 Ser272 リン酸化を、Phospho-Bcl2-L-13

Ser272 特異的抗体を用いた免疫染色により評価し、Phospho-Bcl2-L-13 Ser272 のシグナルが減少する候補を hit として同定した。

で同定した候補をさらに絞り込むために、siRNA によるノックダウンによりミトファジーが抑制される候補を同定した。

4 . 研究成果

4 . 研究成果

(1). 心不全における Bcl2-L-13 関連ミトファジーの解析

Bcl2-L-13 S272A ノックインマウス (図 1) に対し TAC を施行し、4 週間後に心エコー及び心臓のサンプリングを行った。Bcl2-L-13 のリン酸化レベルは、ノックインマウスで有意に抑制されており、野生型では TAC によって有意な上昇が見られたが、ノックインマウスでは上昇は見られなかった (図 2) 。野生型マウスでは、TAC により左室肥大は示すものの、左室短縮率 (FS) は保たれていたが、ノックインマウスでは、FS の有意な低下が見られた (図 3) 。これらの結果は、Bcl2-L-13 のリン酸化が心臓のストレス応答に重要な働きをしていることを示唆していた。

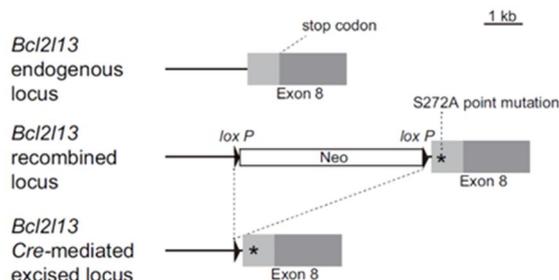


図 1. Bcl2-L-13 ノックインマウスの作製

斜線; Bcl2L13 coding sequence

灰色; non-coding exon

矢頭; *lox P*

* ; S272A 変異挿入部位

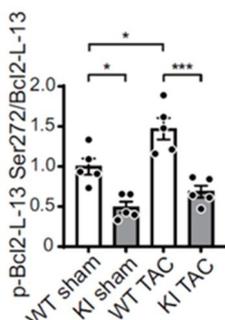


図 2 .phospho-Bcl2-L-13 タンパク質レベルのウェスタンブロッティングによる評価

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

次に、TAC 後の心臓におけるミトコンドリア機能を評価するために左室心筋サンプルを用いて ATP の定量を行った。TAC 術後のノックインマウスでは、ATP レベルが他の 3 群に比して有意に減少していた。さらに、蛍光免疫染色によりミトファジーを評価したところ、ATP synthase 抗体と LC3B 抗体の共局在で示されるミトファジーは野生型では、TAC により有意に増加していたのに対し、ノックインマウスでは増加は抑制されていた (図 4) 。これらより、Bcl2-L-13 S272A ノックインマウスでは、ミトファジー活性の低下によりミトコンドリアの ATP 産生が低下したことが心機能低下につながったと考えられた。

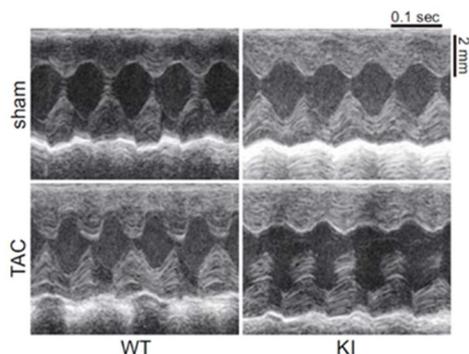


図 3 . TAC4 週後での心エコー

Bcl2-L-13 S272A ノックインマウスに対して TAC 施行後 4 週での典型的な M-mode 心エコー像を示す。

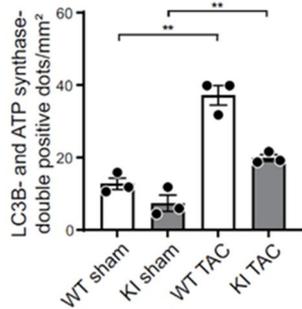


図4 . TAC 4 週後での心臓におけるミトファジーの評価
左室切片を LC3B 抗体及び ATP synthase 抗体で蛍光免疫染色を
い、共焦点顕微鏡で観察し、共局在点をミトファジーとして評
価した。 ** $P < 0.01$

(2). Bcl2-L-13 Ser272 の責任 kinase の同定

Bcl2-L-13 Ser272 の責任 kinase を同定するため、708 種類のキナーゼ (1 種類のキナーゼに対
し 3 種類の siRNA を含む) を含む siRNA ライブラリを使用し、スクリーニングを行った。我々が
作成した phospho-Bcl2-L-13 S272 抗体は内因性の phospho-Bcl2-L-13 S272 を同定できないこ
とから、HA-Bcl2-L-13 を恒常発現する HEK293A 細胞株を樹立した。 CCCP はミトファジーを誘
導することが知られており、我々の以前の検討においても、Bcl2-L-13 が CCCP 誘導性ミトフ
アジーに関与することを報告している。予備実験において、CCCP 投与により、phospho-Bcl2-L-
13 S272 抗体による蛍光免疫染色のシグナルが増加することを確認した (図 5)。

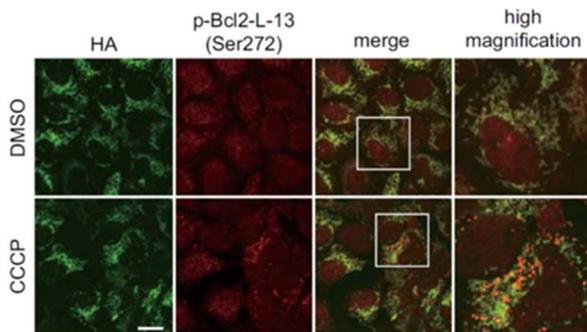


図5 . phospho-Bcl2-L-13 S272 シグナル
の CCCP 投与による増加。

そこで、siRNA によりシグナルが減弱するものを候補とすることとした。3 種の siRNA のうち少
なくとも 1 種類で 60%以上、もしくは 2 種類以上で 40%以上の減弱を示すものを hit としたとこ
ろ、74 の hit を得た。さらに候補を絞るために再度のスクリーニングを設定した。候補分子は、
ノックダウンによりミトファジーが抑制されるであろうという仮説のもと、CCCP により誘導
されるミトファジーが抑制される候補を同定した。結果、18 の候補分子を同定した。今後、
文献的検索によりセリン/スレオニンキナーゼ活性を持つものに絞ったうえで、精製した Bcl2-
L-13 タンパク質及びキナーゼを用いて in vitro kinase assay を行い、最終的な候補を同定す
る予定である。

本研究の成果により、Bcl2-L-13 Ser272 のリン酸化によるミトファジーの活性化が、圧負荷
心においてストレス応答に重要であることが示された。さらに、その責任キナーゼを同定する
ことができれば、ミトファジーを制御することができる可能性があり、新しい心不全治療の創
出につながる成果であると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------