

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790341

研究課題名（和文） ミトコンドリア内 c-Src 活性制御に関わる新規相互作用タンパク質の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of novel interacting proteins for regulation of mitochondrial c-Src activity.

研究代表者

小椋 正人 (OGURA MASATO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10548978

研究成果の概要（和文）：c-Src は、増殖、分化、生存といった細胞の根源的機能に関与する非受容体型チロシンキナーゼである。本研究では、エネルギー代謝支配因子であるミトコンドリア内 c-Src の活性制御に関与する新規相互作用タンパク質の同定と機能解析を目的とする。血清含有培地に比べ酸素消費能の顕著な減少が観察された血清飢餓培地条件下で培養した T98G 細胞からスクロス密度勾配法を用いてミトコンドリアを回収し、以下の解析結果を得た。①血清飢餓条件においてミトコンドリア c-Src キナーゼ活性が減少した。②ミトコンドリア c-Src 複合体構成が顕著に変化した。③プロテオーム解析を行い、相互作用量が減少するタンパク質として ATP5A1 を同定した。④ATP5A1 を過剰発現させると、Src キナーゼ活性および酸素消費能が増加した。これらの結果は、細胞質とは異なるミトコンドリア特有の環境下における新規の c-Src 活性制御機構の存在を示すものである。ミトコンドリアのエネルギー産生異常は、脳筋症や肥満症および 2 型糖尿病をはじめとするエネルギー代謝疾患の原因になりうることから、本成果が新薬開発の現場に新しい戦略を与えると期待される。

研究成果の概要（英文）：Non-receptor-type tyrosine kinase c-Src is implicated in fundamental cellular functions including proliferation, differentiation and survival. Recent studies have suggested that c-Src is also present in mitochondria and involved in the regulatory mechanisms of mitochondrial energy production. Here we have identified novel interaction proteins with c-Src in mitochondria, and investigated their function in the regulation of c-Src kinase activity. Serum starvation exhibits significant reductions of respiration and mitochondrial c-Src activity, and an enhancement of reactive oxygen species production in human T98G cells. Proteome analysis reveals mitochondrial c-Src interaction proteins including ATP5A1 of respiratory complex V. Overexpression of ATP5A1 in cells exhibits a significant increase in c-Src kinase activity and respiration in mitochondria. These results suggest that ATP5A1 regulates c-Src kinase activity by its interaction with c-Src complex in mitochondria, and that their interaction is essential for cellular respiration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：シグナル伝達、プロテオーム、チロシンキナーゼ、ミトコンドリア、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

非受容体型チロシンキナーゼである **c-Src** は、増殖、分化、接着、運動そして生存という細胞の根源的機能に関与する (**Martin, Nat Rev Mol Cell Biol, 2001**)。近年 **c-Src** がミトコンドリアにおいて高レベルに発現していることが示され、そのエネルギー産生機能への関与に興味を持たれている (**Arachiche et al., J Biol Chem, 2008**)。

申請者は、ミトコンドリア内 **c-Src** 特異的にチロシンリン酸化シグナルを抑制するミトコンドリア移行シグナル融合キナーゼ欠損 **c-Src** 変異体 (**MTS-KD-c-Src**) の作製に成功した。この変異体発現細胞による解析を行い、ミトコンドリア内 **c-Src** のキナーゼ活性の抑制が酸素消費を指標とした酸化リン酸化活性および細胞内 **ATP** 量を有意に減少させることを明らかにした。さらに、**c-Src** 基質の探索および γ -³²P-**ATP** を用いたキナーゼアッセイを行い、呼吸鎖複合体 I および II の活性中心サブユニットである **NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 (NDUFV2)** および **succinate dehydrogenase A (SDHA)** を新規基質としてリン酸化部位を含め同定した。また、これらの分子の部位特異的なリン酸化不可変異体 (**Tyr→Phe**) を用いた解析を行い、それぞれのチロシン残基におけるリン酸化が酸化リン酸化に必須であることを明らかにした。上述の結果からミトコンドリア内微小環境下に存在する **c-Src** は、細胞質内に存在する場合と異なり恒常的に活性化状態であると推察される。

2. 研究の目的

ヒト **c-Src** タンパク質の **src homology 2 (SH2)** および **SH3** 領域はそれぞれ分子内の 530 番目のリン酸化チロシン残基およびプロリンリッチ配列に結合し、**c-Src** の不活性化コンホメーション形成に重要な働きをする。そのため、これらの領域のリガンドである受容体型チロシンキナーゼのリン酸化チロシン残基や **G** タンパク質共役型受容体に結合するアレスチン等の相互作用は細胞質内 **c-Src** を活性化させる。しかし、ミトコンドリア内における活性制御タンパク質の存在については明らかにされていない。そこで、本研究では、ミトコンドリア内 **c-Src** 活性制御を担う相互作用タンパク質の同定と機能解析を目的とし、以下の事項を中心に研究を行った。① **c-Src** 活性制御を担うミトコンド

リア内相互作用タンパク質 (**MIP**) を同定する。② **MIP** がエネルギー産生能に与える影響を解析する。③ 増殖シグナルが **c-Src-MIP** 結合能に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

i) 増殖シグナル存在下および非存在下において、ヒト **T98G** 細胞を培養し、遠心分離法を用いてミトコンドリア分画を得た。次いで、以下の解析を行った。① 酸素消費能を測定する。② **c-Src** 特異的な抗体を用いてミトコンドリア **c-Src** 複合体を精製する。③ **NDUFV2** ペプチドを用いて **in vitro kinase assay** によりキナーゼ活性を測定する。④ 複合体タンパク質を等電点電気泳動と **SDS-PAGE** による二次元泳動法により分離し、銀染色法により増減を示すスポットを特定する。⑤ 質量分析装置によりスポットタンパク質を同定する。

ii) 同定したタンパク質 (**MIP**) のクローニングおよび発現ベクターへの組込みを行う。① **MIP** の過剰発現細胞を作製し、**Src** キナーゼ活性に与える影響を解析する。② **MIP** に対する **siRNA** を設計し、細胞においてノックダウン実験を行い、キナーゼ活性を測定する。③ 酸素消費能の測定を行い、エネルギー産生能に与える影響を解析する。

iii) 増殖シグナルが **MIP** と **c-Src** 相互作用に与える影響を **GST-pull down** アッセイにより解析する。さらに、質量分析装置による解析を行い、翻訳後修飾の情報を得て、相互作用の分子メカニズムを考察する。

4. 研究成果

i) ヒト **T98G** 細胞における増殖シグナルの枯渇は、ミトコンドリアの根源的機能である酸素消費能を顕著に減弱させた。一方で、活性酸素種の産生を有意に増加させた。さらに、ミトコンドリア内 **Src** を精製し、キナーゼ活性を測定したところ、有意な減少が認められた。そこで、複合体タンパク質を二次元電気泳動法により分離したところ、増減を示す複数のスポットが確認された。質量分析装置による解析を行い、顕著な減少を示すスポットタンパク質として **ATP5A1** を同定した (図 1)。このタンパク質は、呼吸鎖複合体 **V (ATP 合成酵素)** のサブユニットとして知られている。

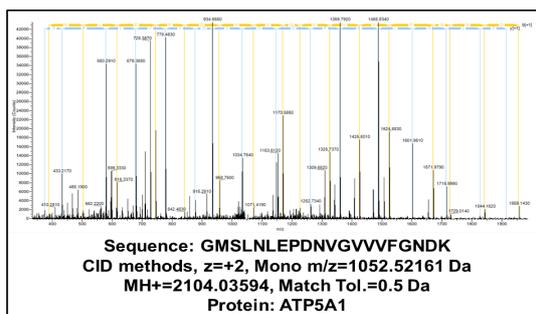


図1. MS/MSデータ

ii) ATP5A1 の全長配列をクローニングし、シーケンシングにより配列を確認した後、発現ベクターに組み込んだ。その後、一過的に細胞にトランスフェクションし、ミトコンドリア c-*Src* 複合体を精製した。この複合体では、ATP5A1 の過剰発現により、ATP5A1 の相互作用量が増加していた。さらに、キナーゼ活性を測定したところ、活性が有意に増加するのみならず、酸素消費能も増加した。次いで、ATP5A1 に対する siRNA を複数設計し、ノックダウン実験を試みたが、タンパク質発現レベルの有意な減少を示す配列および時間を特定することが出来なかった。

iii) c-*Src* と ATP5A1 の相互作用の分子メカニズムを解析するため、GST 融合 ATP5A1 を大腸菌から精製した。ミトコンドリア内における ATP5A1 を再現するため、ミトコンドリア移行シグナル配列を欠損する変異体も作製した。これらの分子と c-*Src* との *in vitro* binding アッセイを行った。その結果、増殖シグナルを枯渇した条件下で、精製したミトコンドリア c-*Src* において、GST-ATP5A1 との相互作用が顕著に減少していた。この結果は、ATP5A1 の修飾というよりは、むしろミトコンドリア c-*Src* の修飾変化により相互作用が制御される可能性を示している。現在、ミトコンドリア c-*Src* の修飾情報を質量分析装置により解析中である。以上の結果は、細胞質とは異なるミトコンドリア特有の環境下における新規の c-*Src* 活性制御機構の存在を示すものであると共に、エネルギー代謝制御機構の分子基盤の構築に重要な情報を与えるものである。ミトコンドリアのエネルギー産生異常は、脳筋症や肥満症および2型糖尿病をはじめとするエネルギー代謝疾患の原因になりうることから、本成果が新薬開発の現場に新しい戦略を与えることと期待される。

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1件)

① Ogura M, Yamaki J, Homma MK, Homma Y. Mitochondrial c-*Src* regulates cell

survival through phosphorylation of respiratory chain components, *Biochem J*, 査読有, **447**, 281-289, (2012), DOI: 10.1042/BJ20120509

[学会発表] (計6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* による細胞死制御メカニズム、日本生化学会東北支部第77回例会・シンポジウム、2011年7月23日、仙台

② 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、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、京都

③ 小椋正人、八巻淳子、本間美和子、本間好、呼吸機能におけるミトコンドリア内 c-*Src* の役割、第54回日本神経化学会大会、2011年9月27日、石川

④ Ogura M, Yamaki J, Homma MK, Homma Y, Mitochondrial c-*Src* regulates cell survival through phosphorylation of respiratory chain components、第55回日本神経化学会大会、2012年10月01日、神戸

⑤ Ogura M, Yamaki J, Homma MK, Homma Y, Identification and functional analysis of novel interaction proteins for regulation of reactive oxygen species generation in succinate dehydrogenase、第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡

⑥ Ogura M, Yamaki J, Homma MK, Kato S, Kobayashi K, Kobayashi K, Homma Y, Phosphorylation of respiratory complex I and II by c-*Src* is required for neuronal viability、第86回日本薬理学会年会、2013年03月21日、福岡

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 体重増加制御剤

発明者: 大島吉輝、菊池晴久、本間好、鈴木俊幸、小椋正人

権利者: 国立大学法人東北大学、公立大学法人福島県立医科大学

種類: 特許

番号: 特許第2012-230985号

出願年月日: 2012年10月18日

国内外の別: 国内

[その他]

福島県立医科大学

①研究者データベース

[http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/Profiles/31/
0003021/profile.html](http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/Profiles/31/0003021/profile.html)

②医学部生体情報伝達研究所 生体物質研究
部門ホームページ

[http://www.fmu.ac.jp/home/biomol/HTML/in
dex.html](http://www.fmu.ac.jp/home/biomol/HTML/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 正人 (OGURA MASATO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10548978