

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590387

研究課題名(和文)ミトコンドリアRNAシャペロンp32の分子基盤と病態解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism and pathological analysis of mitochondrial chaperon protein p32

## 研究代表者

内海 健(Uchiumi, Takeshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80253798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアエネルギー代謝に必須の蛋白p32の分子機能を解明するため、p32コンディショナルノックアウトマウスの作製、解析を行った。脳特異的p32ノックアウトマウスを作製したところ生後8週齢で致死を示した。このマウスは神経細胞の軸索異常とオリゴデンドロサイトの分化異常を認めた。さらに、ミトコンドリアDNAがコードするタンパクの発現低下、酸化リン酸化能の低下を認めた。ER ストレス応答の亢進、酸素消費量の低下を認めた。P32はミトコンドリア代謝に必須のタンパクであり、p32異常が白質脳症につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The mitochondrial matrix protein p32/ C1qBP functions as an essential RNA and protein chaperon in mitochondrial translation, and is indispensable for embryonic development. To investigate the functional role of p32 in an organism, we deleted p32 selectively in neurons and glia (p32NesKO mice). The neuron-specific p32KO mice showed growth retardation and death by ~8 weeks. P32 KO mice causes significant axonal degeneration and demyelination in mid brain brainstem are particularly involved. We show that disruption of glial mitochondria activates an adaptive integrated stress response. We also observed that severe protein expression, dysfunction of the mitochondrial respiratory chain, and reduced oxygen consumption. Our data suggest that oligodendrocyte dysfunction and axon degeneration may be a contributor to mitochondria-related leukoencephalopathy.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア p32 翻訳 ノックアウトマウス

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは生体の好氣的 ATP の合成や脂肪酸の酸化などエネルギー代謝に中心的役割を担う細胞小器官であり、ミトコンドリア電子伝達系は生体の ATP 産生の 80% 以上を担っている。ミトコンドリアには独自のゲノム(mtDNA)が存在しコードしている 13 種類のタンパクはすべて電子伝達系に関与する蛋白である。このようなミトコンドリア DNA の維持機構に働く分子種に変異、破綻が生じれば、酸化的リン酸化能は低下し、いわゆるミトコンドリア病の原因となる。さらに、エネルギー代謝に必要なミトコンドリアの機能異常はパーキンソン病などの神経変性疾患や心血管系の異常、がん、糖尿病などのいわゆる Common disease の発症、さらに老化に関連すると考えられている。しかし、ミトコンドリア DNA の維持機構、特にミトコンドリア RNA chaperon: p32 を中心とした翻訳の分子基盤の解明はいまだ明らかでなく、この機構の解明が新たな治療へつなげる事が考えられる。

### 2. 研究の目的

ミトコンドリア DNA 維持に必須のミトコンドリア転写因子 TFAM の研究から、ヌクレオイドを構成する因子を多数同定してきた。p32 の機能解析として p32 は mtRNA に結合しミトコンドリア翻訳に影響を及ぼすことを初めて見出してきた。本研究では「ミトコンドリアエネルギー代謝に必須の蛋白 p32 の分子、細胞レベルでの機能解析、さらに種々の疾患への関与を解明するため、p32 コンディショナルノックアウトマウスの作製、解析を行う」ことを目的とする。具体的には p32 の分子機能 精製 p32 による RNA 結合、翻訳調節、相互作用する分子の同定と機能連関を明らかにする。さらに神経特異的、p32 コンディショナルノックアウトマウスの解析から個体への影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)p32 臓器特異的ノックアウトマウスの作製、解析  
Cre/loxP システムを用いた部位特異的ノックアウトマウスを作製する。まず初めに、p32 全身ノックアウトマウスを作製し、胎生致死であることは確認できた。脳での臓器特異的ノックアウトマウスも作製し生体内での p32 の役割を解明する。まず、生まれたノックアウトマウスの体重、寿命、行動を調べる。P32 ノックアウトした臓器を免疫染色と HE 染色し、マウス個体レベルでどの組織、細胞に障害があるのか、その障害がどう症状とリンクするのか推測する。また、それぞれのノックアウトした臓器より、ノックアウト細胞を樹立する。樹立後 wild, hetero, homo の細胞を使い、mRNA の局在分布の違い、ミトコンドリア機能評価を測定する。MEF 細胞との相違点、類似点を探ることで組織特異的な p32 の

機能評価を行うことができる。

### (2)p32 ノックアウト細胞のミトコンドリア機能解析

作製したノックアウト細胞の増殖、形態を確認する。そして特にミトコンドリアでの機能解析を進める予定である。ノックアウト細胞のミトコンドリア形態を、免疫染色 (Mito Tracker Red, p32) 電子顕微鏡で確認する。ミトコンドリアでコードされているタンパク質 (coxI, coxII, ND2) やミトコンドリア膜に局在する complexI ~ complexIV の複合体構成タンパク質 (NDUFA9, SDHA, UQCRCFS1, coxVa) の発現量を Western Blotting で調べる。

(3)酸素消費量は、クラーク型酸素電極付き液相酸素測定システムを用いて測定する。呼吸鎖活性は、complexI, II, III, IV 全ての基質、阻害剤を用いて波長変化をモニターし測定する。

### (4)p32 ノックアウト細胞の解析

神経、オリゴデンドロサイト細胞を単離し機能解析を進める翻訳活性化に関与する、S6K, Ribosomal p70S6K のリン酸化の程度を western blot 法にて確認する。

### 4. 研究成果

1. p32 神経特異的ノックアウトマウスは、生後 4 週齢から体重が減少し始め、振戦を起こすようになり約 8 週齢で死亡した。脳組織を HB, KB 染色するとノックアウトマウスでは白質部位に空胞が確認でき、さらに脱髄を起こしていた。空胞は週齢を重ねるごとに増加した。これらの症状は、白質脳症の典型例であると考えられる。

2. 神経細胞、軸索、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなど、脳組織の免疫染色を行った。p32 神経特異的ノックアウトマウスでは、オリゴデンドロサイトが空胞を取り囲む像が確認できた。よって、この空胞はオリゴデンドロサイトの異常、髄鞘形成不全によるものだと考えられる。また、アストロサイト、神経細胞体にはあまり変化が認められなかった。

3. 神経細胞を用いた primary culture では神経細胞の neurite の伸びには差がないが、p32 ノックアウト神経細胞では軸索形成が低下していた。さらに、長期培養で neurite の崩壊を観察した。

4. 生後 2 日目のマウス脳からオリゴデンドロサイト前駆細胞を抽出し培養すると、p32 ノックアウトのオリゴデンドロサイトは細胞数は減少し、分化も未成熟であった。電子顕微鏡解析より、p32 ノックアウトマウスでは髄鞘形成に異常をきたし、数も激減した。これらのことより神経特異的 p32 ノックアウト

トマウスは白質脳症になり、その原因はオリゴデンドロサイト分化異常による髄鞘の形成不全、神経細胞軸索の維持機構の破綻によると考えられた。このマウスをさらに解析し、白質脳症の病態原因究明できればと考えている。

#### 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13件)

1. Kanki T., Kurihara Y., Jin X., Goda T., Ono Y., Aihara M., Hirota Y., Saigusa T., Aoki Y., Uchiumi T., Kang D. : Casein kinase 2 is essential for mitophagy : EMBO Reports 14, 788-794, 2013

2. Kashiwagi E., Shiota M., Yokomizo A., Itsumi M., Inokuchi J., Uchiumi T., Naito S. Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor and contributes to castration resistance in prostate cancer cells Endocrine-Related Cancer 20, 431-441. 2013

3. Itsumi M., Shiota M., Yokomizo A., Kashiwagi E., Takeuchi A., Tatsugami K., Inokuchi J., Song Y., Uchiumi T., Naito S. : Human heterochromatin protein 1 Isoforms regulate androgen receptor signaling in prostate cancer : Journal of Molecular Endocrinology 50, 401-409, 2013

4. Uchiumi T.\*, Tanamachi H, Kuchiwaki K, Kajita M, Matsumoto S, Yagi M, Kanki T, Kang D. : Mutation and functional analysis of ABCC2/multidrug resistance protein 2 in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. : Hepatol. Res. 43, 569-575, 2013

5. Fang J, Uchiumi T.\*, Yagi M, Matsumoto S, Amamoto R, Takazaki S, Yamaza H, Nonaka K, Kang D.: Dihydroorotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction. Biosci. Rep. 33, 217-227, 2013

6. Song YH, Shiota M, Yokomizo A, Uchiumi T., Kiyoshima K, Kuroiwa K, Oda Y, Naito S. Twist1 and Y-box-binding protein-1 are potential prognostic factors in bladder cancer. Urol Oncol. 6, 2013

7. Yagi M., Uchiumi T., Takazaki S., Okuno B., Nomura M., Yoshida S.-I., Kanki T., Kang D. : P32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation: Importance of its RNA-binding ability Nuc Aci Res, 40: 9717-9737. 2012.

8. Fang J, Uchiumi T., Yagi M, Matsumoto S, Amamoto R, Saito T, Takazaki S, Kanki T, Yamaza H, Nonaka K, Kang D. : Protein instability and functional defects caused by mutations of dihydro-orotate dehydrogenase in Miller syndrome patients. : Biosci. Rep. 32: 631-639. 2012.

9. Shiota M., Song Y., Takeuchi A., Yokomizo A., Kashiwagi E., Kuroiwa K., Tatsugami K., Uchiumi T., Oda Y., Naito S. : Antioxidant therapy alleviates oxidative stress by androgen deprivation and prevents conversion from androgen dependent to castration resistant prostate cancer. : J. Uro, 187: 707-714. 2012.

10. Matsumoto S., Uchiumi T., Saito T., Yagi M., Takazaki S., Kanki T., Kang D. : Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins. Mitochondrion, 12: 391-398. 2012.

11. Matsumoto S., Uchiumi T., Tanamachi H., Saito T., Yagi M., Takazaki S., Kanki T., Kang D: Ribonucleoprotein Y-box-binding protein-1 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA : Biochem. J. 443: 573-584. 2012.

12. Kashiwagi E., Shiota M., Yokomizo A., Itsumi M., Inokuchi J., Uchiumi T., Naito S. : Downregulation of phosphodiesterase 4B (PDE4B) activates protein kinase A and contributes to the progression of prostate cancer ; Prostate, 72 : 741-751. 2012.

13. Kurihara Y., Kanki T., Aoki Y., Hirota Y., Saigusa T., Uchiumi T., Kang D. : Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast . J. Biol. Chem. 287 : 3265-3272. 2012.

[学会発表](計10件)

1. Uchiumi T., Saito, T. Yagi, M. and Dongchon Kang (2014) 2014. 6.15-19

Cardiomyocyte Specific Deletion of p32/C1qbp Causes Mitochondrial Cardiomyopathy and induced the mitochondrial UPR response and autophagy  
EuroMit 2014, Poster Tampere, Finland

2. Yagi, M, Uchiumi T. and Dongchon Kang (2014) 2014. 6.15-19

Neuron-specific disruption of p32 gene in mouse causes selective loss of oligodendroglia cells

leading to vacuolar degeneration in mid-brain  
EuroMit 2014, Poster Tampere, Finland

3. 第 14 回 日本ミトコンドリア学会  
福岡 2014. 12.3-5  
心筋特異的 p32 ノックアウトマウスは拡張型  
心筋症を発症するが mtUPR, autophagy を誘  
導し生存する  
内海健、八木美佳子、康東天  
一般口演

4. 第 14 回 日本ミトコンドリア学会 福  
岡 2014. 12.3-5  
神経特異的 p32 ノックアウトマウスはオリゴ  
デンドロサイト分化異常によって白質脳症  
になる  
八木美佳子、内海健、康東天  
一般口演

5. 第 61 回 日本臨床検査医学会 福岡  
2014.11.22-25  
ミトコンドリア蛋白質 p32 の RAS 依存性発ガ  
ン形質転換への関与  
内海健  
シンポジウム

6. 第 61 回 日本臨床検査医学会 福岡  
2014.11.22-25  
神経特異的 p32 ノックアウトマウスはオリゴ  
デンドロサイト分化異常によって白質脳症  
になる  
八木美佳子、内海健、康東天  
一般口演

7. 第 46 回 日本臨床検査自動化学会  
神戸 2014. 10.9-11  
前立腺がんにおける mtCK(mitochondria  
creatine kinase)発現様式とメタボローム  
内海健、康東天  
一般口演

8. Uchiumi, T. and Dongchon Kang (2013)  
2013.11.6-7  
p32/gC1qR is indispensable for fetal  
development and mitochondrial translation:  
importance of its RNA binding ability  
J-mit Tokyo (invited speaker) Tokyo

9. 第 72 回日本癌学会 2013.10.3-5 横浜  
The mtCK expression is down-regulated in  
prostate cancer progression and correlated with  
mitochondrial OXPHOS function  
Takeshi Uchiumi, Rie Amamoto, YooHyun Song,  
Yoshinao Oda, Akira Yokomizo, Seiji Naito,  
ポスター

10. 第 53 回 日本臨床化学会 徳島  
2013. 8.30-9.1  
mtCK(mitochondria creatine kinase)の前立  
腺がんにおける発現様式  
内海健、康東天  
一般口演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
(内海 健)

研究者番号：80253798

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：