

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790324

研究課題名(和文)TFAMを中心としたミトコンドリアゲノムの分配調節機構の解明

研究課題名(英文)Segregation mechanism of human mitochondrial genome through TFAM

研究代表者

笠嶋 克巳(Kasashima, Katsumi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80382844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TFAMを中心としたミトコンドリアゲノム分配機構の解明を目的として関連因子を探索した結果、ミトコンドリアシャペロンであるClpXがミトコンドリアゲノムの分布・分配に関わることが明らかになった。ClpXはTFAMのDNA結合活性を上昇させることが明らかになり、TFAMの質を調節することによって本調節に関わることが強く示唆された。

TFAMの自己相互作用を詳細に調べた結果、TFAMが細胞内でも自己相互作用すること、またその相互作用ドメインが明らかになった。TFAMの相互作用不全変異体は積極的なタンパク分解を受けやすく、TFAM間相互作用がTFAMの量的調節に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The segregation of mitochondrial genome affects the transmission of mutant mitochondrial DNA (mtDNA) variant and clinical abnormalities of mitochondrial disorders. Recently, we clarified that human mitochondrial transcription factor A (TFAM) is required for equal distribution and symmetric segregation of mtDNA in cultured cells. To elucidate the molecular mechanism of the TFAM-mediated mtDNA segregation, we screened nucleoid factors involved in this process. We found a mitochondrial AAA+ chaperone Clp as a novel regulator. Because ClpX enhances the DNA-binding activity of TFAM in vitro, it is strongly suggested that ClpX regulates mtDNA segregation through quality control of TFAM.

By using separated fluorescent protein as reporter, we found that TFAM self-associates in mitochondria in vivo. The dimer mutant is actively degraded by proteasome system, suggesting that the self-interaction protects TFAM from degradation and regulates its expression levels.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA 分配 TFAM

1. 研究開始当初の背景

電子伝達系に必須なタンパクをコードするミトコンドリアゲノム（以下 mtDNA）の変異や損傷は、ミトコンドリア機能の低下を引き起こし、MELAS などの神経筋疾患の原因となる。mtDNA は一細胞内に数千コピー存在することから、変異した mtDNA が正常型 mtDNA を上回って蓄積した結果、病態を表すと考えられている。変異した mtDNA が蓄積する原因の一つとして、mtDNA の分配異常が示唆されているが、ヒト mtDNA の分配機構はほとんど明らかでなかった。

mtDNA は、タンパク質因子とともに核様体（ヌクレオイド）を形成しており、これらタンパク質が mtDNA の転写や複製、コピー数の維持など多様な維持調節に関わると考えられている。TFAM (mitochondrial transcription factor A) は、mtDNA と結合し、mtDNA の転写を活性化する因子として単離されたヌクレオイドの主要な構成タンパクである。国内外のグループの研究により、哺乳動物の TFAM は mtDNA のほぼ全領域と結合してその安定性を維持すること、つまりコピー数の調節にも関わることが示された。申請者は最近、TFAM をノックダウンしたヒト培養細胞では、mtDNA のコピー数が減少するだけでなく、蛍光色素で標識される mtDNA シグナルの分布が大きく変化（凝集）することを見いだした。さらに免疫染色と FISH (fluorescent in situ hybridization) 法を組み合わせることにより、TFAM をノックダウンした娘細胞間では不均等な mtDNA の分配が起こること、つまり TFAM が培養細胞における均等な mtDNA の分配に必要であることをはじめて明らかにした (Kasashima et al. Exp. Cell Res. 2011)。しかしながらその分子メカニズムや関連因子は、

現在のところ不明である。

2. 研究の目的

本研究は TFAM を mtDNA 分配に関わる中心的な分子と位置づけ、主に TFAM 機能を調節する新規因子の単離および機能解析を行い、高等動物の mtDNA 分配メカニズムの解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) mtDNA 分配に関わる新規因子のスクリーニングには、ヒト HeLa 細胞を用いた。RNA interference (RNAi)用の shRNA 発現プラスミドおよび siRNA は、Lipofectamine 2000 を用いて導入した。核酸導入後の細胞は、PicoGreen (Molecular Probes 社、3 μ L/mL で一時間)もしくは SYBR Green I (Lonza 社、1 μ L/100 mL で 5 分)を用いて mtDNA ヌクレオイドを染色した。また生細胞ミトコンドリアの染色には、MitoTracker Red CM-H₂XRos (Molecular Probes 社、250 nM で 30 分)を用いた。これら生細胞の観察には、カールツァイス社の倒立型蛍光顕微鏡 (Axio Observer D1) を用いた。免疫染色は、細胞を 4%ホルマリンで固定し、0.1% Triton X-100 で可溶化した後、各種抗体による免疫反応を行った。

(2) N 末側ミトコンドリア標的配列を除いた成熟型の組換え TFAM タンパクおよび ClpX タンパク質を、ヒスチジンタグとの融合タンパク質として大腸菌より発現・精製した。ビオチンを付加した二本鎖 DNA と組換え TFAM タンパク質を混合し、ClpX タンパク質の有無においてストレプトアビジンビーズによるビオチン DNA のプルダウンを行った。プルダウン産物を SDS-PAGE で展開後ウエスタン

ブロッキングを行うことにより、DNA と結合した TFAM 量を定量・比較した。

(3) HeLa 細胞からディファレンシャル遠心分離法によって精製したミトコンドリアを用い、ケミカルクロスリンカー-BMH (10 mM で 30 分) でタンパク質間架橋を行った。タンパク質を抽出後、ウエスタンブロッティングにより TFAM 多量体を検出した。組換え TFAM タンパク質を 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT 溶液中で組換え ClpX タンパク質の有無下 37°C で 30 分インキュベートした。その後、0.02% グルタルアルデヒドで 37°C 20 分クロスリンクを行い、4 倍量の 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA を加えて反応を停止させた。2 μg の BSA をキャリアーとして TCA 沈殿を行い、沈殿物をウエスタンブロッティング解析し TFAM 多量体を検出した。

(4) mtDNA およびミトコンドリアを染色した生細胞を、ライカ社の共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5) およびハイブリッドディテクターを用いてタイムラプス解析 (40 秒毎に画像を撮影し、計 20 分間) を行った。

(5) 分割型蛍光タンパク質 monomeric Kusabira Green (mKG) の N 側断片 (mKGN)、および C 側断片 (mKGC) をレポーターとし、*in vivo* での TFAM 間相互作用を解析した。具体的には、TFAM の C 末側に mKGN および mKGC を融合させ、各タンパク質を HeLa 細胞のミトコンドリアに発現させ、相互作用の有無を蛍光シグナルによって検出した。

4. 研究成果

(1) 新規 TFAM 調節因子 ClpX の単離とその機能解析

mtDNA の維持調節に関わるヌクレオイド因子は、

これまでに Bogenhagen 博士らのプロテオーム解析によって明らかにされた約 60 種が報告されている。本研究ではこれら因子のうち機能未知な約 40 種類を siRNA もしくは shRNA を用いて網羅的にノックダウンした。その結果、ATPase ドメインを持つ AAA+タンパク ClpX をノックダウンすることによって、mtDNA ヌクレオイドが巨大化し、TFAM のノックダウンとよく似た表現型を示すことがわかった (図 1)。

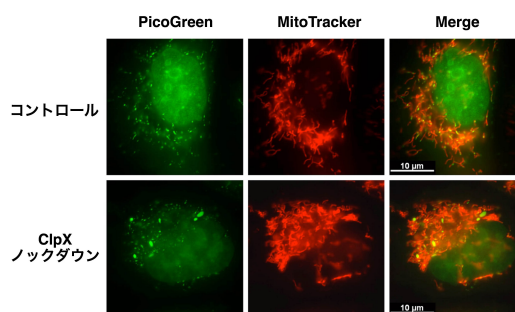


図1 shClpXによってClpXをノックダウンするとPicoGreenで染色されるmtDNAヌクレオイドシグナルが巨大化する。

ClpX ノックダウンによる mtDNA の巨大化は、TFAM ノックダウンと同様にヌクレオイドの巨大化であることが、mtDNA に対する *in situ* ハイブリダイゼーションで確認された。ClpX ノックダウン細胞では、TFAM タンパク質の発現量はほとんど変化していないことから、ClpX が TFAM の発現量を調節している可能性は低いと考えられた。

TFAM と ClpX が機能的に相互作用しているのか調べるために、それぞれ C 末にタグを付加したタンパク質を培養細胞に発現させ、タグに対する抗体を用いた免疫沈降解析を行った。しかしながら、本解析では相互作用を検出することはできなかった。そこで両タンパク質に対する特異的抗体を用いた免疫染色解析を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、両者が共局在していることが明らかになった (図 2)。

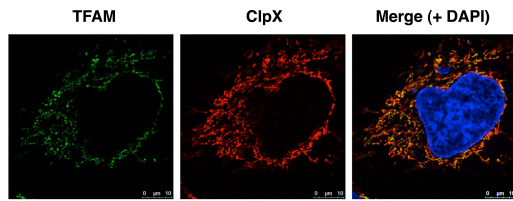


図2 TFAMとClpXはHeLa細胞内で共局在する
HeLa細胞をTFAM抗体およびClpX抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

これら特異的抗体と、特殊な核酸を連結した二次抗体を用いた PLA (Proximity Ligation Assay) 解析により、両タンパク質が相互作用していることが確認された。

ClpX のシャペロン活性が TFAM の機能を調節している可能性を考え、TFAM の二本鎖 DNA 結合能への影響を調べた。その結果、組換え ClpX タンパク質が *in vitro* における組換え TFAM タンパク質の DNA 結合活性を上昇させていることが明らかになった (図 3)。したがって、ClpX は TFAM の量ではなく質をコントロールすることによって mtDNA の分配に関わる可能性が強く示唆された。

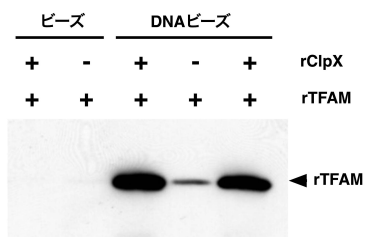


図3 組換えTFAM (rTFAM)をrClpXの存在/非存在下でDNAビーズを用いたプルダウン解析を行った。DNAと結合したTFAMを矢頭で示す。

(2) TFAM 間相互作用の解析

網羅的なノックダウンの結果、ヌクレオイド因子のノックダウンで mtDNA が巨大化するものは TFAM と ClpX のみであった。そこで我々を含めて複数のグループから報告のある TFAM 間相互作用についてさらに解析を進めた。まず、ミトコンドリア内でどのような複合体を形成しているのか

調べるために、単離ミトコンドリアを用いた *in situ* ケミカルクロスリンク解析を行った。その結果、TFAM はミトコンドリア内で二量体、三量体およびオリゴマーを形成していることが明らかになった。

つぎに TFAM のオリゴマー化に対する ClpX の影響を *in vitro* でのグルタルアルデヒドを用いたクロスリンク解析によって調べた。その結果、ClpX の存在によって TFAM のオリゴマーがほどこかれ、主に二量体として存在させることがわかった。

したがって TFAM のオリゴマー化調節が mtDNA の分配に関わる可能性が示唆された。

TFAM 間の相互作用ドメインに関しては、これまで複数のグループからの *in vitro* での結合解析より、複数のドメインの関与が報告されているが、*in vivo* での検証はされていない。そこで分割型蛍光タンパク質 monomeric Kusabira-Green (mKG) を用いた相互作用解析を行った。TFAM の C 末側に mKG_N 側断片および mKG_C 末断片を融合させ、HeLa 細胞のミトコンドリアに発現させた。その結果、ミトコンドリア上で mKG の蛍光シグナルが検出され、TFAM の *in vivo* での相互作用が確認された。欠失変異体を用いて同解析を行ったところ、N 末側の HMG ドメインが TFAM 間相互作用に必要であることが明らかになった。この領域は最近海外のグループの構造解析より明らかになった *in vitro* での TFAM 二量体に関わるドメインと同じであり、その報告をもとに二量体不全変異体を作製した。この変異体を細胞に発現させて TFAM ノックダウンのレスキュー解析を試みたが、野生型 TFAM と比較して発現量が低く、タンパク質分解システムで積極的に分解されていることが示唆された。

(3) 生細胞におけるヌクレオイド動態観察システムの構築

生細胞における mtDNA の観察は、これまで主に蛍光色素 PicoGreen を用いて行ってきたが、退色が早いことによりタイムラプス解析を行うことが困難であった。本研究では他の DNA 結合性蛍光色素 SYBR Green I を試したところ、より短時間・低濃度で染色可能であり、実際に PicoGreen よりも退色が遅いことがわかった。さらに共焦点レーザー顕微鏡のハイブリッドディテクターと共用することにより、20 分間ではあるが mtDNA の動態をタイムラプス解析することが可能となった。

以上本研究より、新規の mtDNA 調節因子 ClpX は、TFAM の質を調節していると考えられ、TFAM の効率的な二量体化そして DNA への結合を調節することによって、mtDNA の分配を調節していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Kasashima K, Nagao Y, and Endo H. Dynamic regulation of mitochondrial genome maintenance in germ cells. *Reprod. Med. Biol.*, 査読有、Vol. 13 (2014) p11-20.

DOI: 10.1007/s12522-013-0162-0

② Tetsuka S, Tominaga K, Ohta E, Kuroiwa K, Sakashita E, Kasashima K, Hamamoto T, Namekawa M, Morita M, Natsui S, Morita T, Tanaka K, Takiyama Y, Nakano I, and Endo H. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with an onconeural antibody against

creatine kinase, brain-type. *J. Neurol. Sci.*, 査読有、vol. 335, No. 1-2 (2013) p48-57.
DOI: 10.1016/j.jns.2013.08.022.

③ Akimoto C, Sakashita E, Kasashima K, Kuroiwa K, Tominaga K, Hamamoto T, and Endo H. Translational repression of the McKusick-Kaufman syndrome transcript by unique upstream open reading frames encoding mitochondrial proteins with alternative polyadenylation sites. *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有、vol. 1830, No. 3 (2013) p2728-2738.

DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.12.010

④ Sumitani M, Kasashima K, Yamamoto DS, Yagi K, Yuda M, Matsuoka H, and Yoshida S. Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an antisporozoite antibody in their salivary glands. *Insect Mol. Biol.*, 査読有、vol. 22, No. 1 (2013) p41-51.

DOI: 10.1111/j.1365-2583.2012.01168.x.

⑤ Kasashima K, Sumitani M, and Endo H. Maintenance of mitochondrial genome distribution by mitochondrial AAA+ protein ClpX. *Exp. Cell Res.*, 査読有、vol. 318, No. 18 (2012) p2335-2343.

DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.07.012.

[学会発表] (計 5 件)

① 笠嶋克巳、ミトコンドリア内における TFAM 間相互作用に必要なドメインの同定 第 87 回日本生化学会大会 平成 26 年 10 月 17 日、京都国際会館 (京都・京都)

② Katsumi Kasashima, Molecular mechanism of

TFAM-regulated mitochondrial DNA/nucleoid distribution, The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria, 平成 25 年 10 月 29 日、沖縄残波岬ロイヤルホテル (沖縄・残波岬)

③ 笠嶋克巳、TFAM によるミトコンドリアゲノム分配機構の解析 第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

④ 笠嶋克巳、ミトコンドリアシャペロン ClpX による TFAM 調節機構の解析 第 12 回日本ミトコンドリア学会年会 平成 24 年 12 月 20 日、筑波大学 (茨城・つくば)

⑤ 笠嶋克巳、ヒト ClpX は TFAM を介してミトコンドリアゲノムの分布を調節する 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場 (福岡・福岡)

[図書] (計 1 件)

遠藤仁司、笠嶋克巳 ミトコンドリア膜の機能的
新タンパク質類-プロヒビチン **生体の科学**、
vol. 63 (2012) p432-433

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠嶋克巳 (KASASHIMA, Katsumi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 80382844