

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860599

研究課題名(和文)新規ミトコンドリアタンパク質AMFのエネルギー代謝調節に関する機能解析

研究課題名(英文)Analysis of a novel mitochondrial protein AMF in energy metabolism

研究代表者

加藤 久和(Kato, Hisakazu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：30589312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓はポンプ機能を維持するため他臓器に比して激しくATPを消費するが、虚血におけるミトコンドリアATP産生を制御するメカニズムは明らかでない。本研究では、低酸素誘導遺伝子AMFがどのようにミトコンドリアATP産生制御に関わっているかについて検討した。(1) AMFの相互作用因子としてFoF1-ATP合成酵素を同定した。(2) ATP感受性FRETプローブを培養心筋細胞およびゼブラフィッシュ心臓に応用し、AMFの発現増強が虚血時のミトコンドリアATP産生低下を減弱させることが明らかとなった。これらの結果から、AMFはFoF1-ATP合成酵素を介して虚血心に対して保護的に働くことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Heart tissue consumes more energy than other organs to maintain cardiac pump function. Imbalances between energy demand and supply in an ischemic myocardium fall into the mechanical failure of heart. However, the mechanism by which mitochondrial ATP production is regulated under hypoxia is not fully understood. In this study, we revealed how a novel hypoxia-induced protein AMF affects mitochondrial ATP production under ischemic condition, mainly from the following experiments. (1) Immunoaffinity purification and mass spectrometric analysis revealed that AMF interacted with FoF1-ATP synthase complex. (2) Assessment of mitochondrial ATP concentration using FRET-based ATP biosensor allowed us to show that overexpression of AMF inhibited the decreases in mitochondrial ATP concentration under hypoxic condition in cultured cardiomyocytes and also in zebrafish heart. These results suggest that AMF functions as a guardian of ischemic heart via activating FoF1-ATP synthase.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア ATP 虚血

1. 研究開始当初の背景

生体の中でも心臓は絶え間ない収縮と弛緩の繰り返しによって莫大なエネルギーを消費する特異な臓器であり、心臓の酸素摂取量は他の臓器に比して量的余裕が少ない。そのため狭心症など心臓への血液供給が制限されるような状態や、高血圧・代謝疾患などに伴い心臓自体に負荷がかかる状態では、容易に虚血状態に陥り、ATP の需要と供給のバランスが崩れ、やがては心不全となる。絶え間ない自律拍動を必要とする心筋細胞が、ATP 産生効率の悪い解糖系を主としたエネルギー代謝でその機能を維持しているとは考えにくく、持続的に効率よく ATP を供給する代謝調節機構が存在すると考えられるが、そのメカニズムは明らかでない。

一方、エネルギー代謝調節機構の研究を行う上で細胞内 ATP 濃度の測定は不可欠であるが、従来では細胞を破壊するため、生細胞での測定が不可能であった。近年細胞質およびミトコンドリアの ATP 濃度をリアルタイムで測定することができる ATP 感受性 FRET プローブが開発され、京都大学との共同研究によりこの FRET プローブを心筋細胞およびゼブラフィッシュの心臓に導入して ATP 濃度を測定する実験系を新たに確立した。

研究代表者らは、エネルギー枯渇状態での ATP 合成制御メカニズムを解明することを目的として、ラット心筋細胞を用いてエネルギー飢餓（低酸素等）刺激によって変化する遺伝子発現パターンを網羅的にスクリーニングし新規遺伝子 AMF を同定した。AMF 遺伝子はその発現様式が特徴的であり、エネルギー飢餓刺激後すぐに発現誘導が認められ、その後速やかに発現が低下する。

2. 研究の目的

本研究では新規に同定したミトコンドリアタンパク質 AMF の生体内での機能を明らかにすることを目的とし、まず生化学的手法から AMF と相互作用する因子の同定を試みる。その後培養心筋細胞を用いた ATP 濃度の測定ならびにエネルギー代謝への影響を検討する。さらにゼブラフィッシュ、イヌをモデルとした虚血心、ヒトミトコンドリア病患者サンプルを用いた *in vivo* の解析から AMF の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AMF の相互作用因子の探索

培養心筋細胞にアデノウイルスを用いて tag 付-AMF を発現させ、抗 tag 抗体による免疫沈降法およびそのサンプルの質量分析装置による解析から相互作用するタンパク質をスクリーニングする。

(2) AMF の心筋細胞における ATP 濃度およびエネルギー代謝への影響の検討

培養心筋細胞にアデノウイルスを用いて ATP 感受性 FRET プローブをコードする遺伝子を導入することにより生細胞内ミトコンドリア ATP 濃度の変化を経時的に測定する。この細胞に AMF 遺伝子の強制発現またはノックダウンによる発現抑制を行うことで ATP 濃度がどのように変化するかについても検討する。

(3) ゼブラフィッシュを用いた虚血時のエネルギー代謝調節機構における AMF の機能解析

前述の ATP 感受性 FRET プローブを心臓で発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを既に確立している。この個体を用いて生きた心臓で虚血における ATP 濃度の変化を経時的に測定する。

(4) イヌ虚血再灌流モデルを用いた AMF の *in vivo* における遺伝子発現解析

研究代表者らはこれまでにイヌを用いた虚血再灌流モデルを確立し研究を行ってきた。そこで *in vivo* の虚血時における AMF の発現を検討する目的で、イヌの虚血再灌流モデルを作成し、虚血再灌流後の心臓について虚血領域および非虚血領域における AMF 遺伝子の発現変化を比較検討する。

(5) ヒトミトコンドリア病患者サンプルを用いた AMF の遺伝子変異解析

国立精神・神経医療研究センターとの共同研究によりヒトミトコンドリア病患者由来の血液サンプルを用いて AMF の遺伝子変異の探索を行う。

4. 研究成果

(1) AMF の相互作用因子の探索

培養心筋細胞にアデノウイルスを用いて FLAG-AMF を発現させ、抗 FLAG 抗体による免疫沈降法および質量分析により相互作用因子をスクリーニングしたところ、FoF1-ATP 合成酵素複合体のサブユニットを複数同定した（図 1A）。これらの相互作用は内因性の AMF においても起こっていることが明らかとなった（図 1B）。

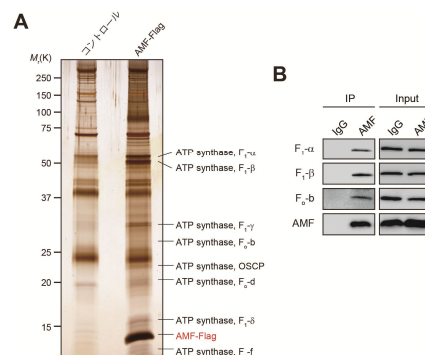


図 1 (A) AMF-Flag 免疫沈降後サンプルの銀染色 (B) 内因性 AMF の免疫沈降とウェスタンブロット

(2) AMF の心筋細胞におけるミトコンドリア ATP 濃度への影響の検討

培養心筋細胞にアデノウイルスを用いて ATP 感受性 FRET プローブを発現させ生細胞内ミトコンドリア ATP 濃度を経時的に測定する実験系を作成した。この細胞の内因性 AMF をノックダウンした結果、ミトコンドリア ATP 濃度の著明な低下を認めた。さらに AMF 遺伝子を強制発現させると、低酸素条件下でのミトコンドリア ATP 濃度の低下が減弱することが明らかとなった (図 2)。

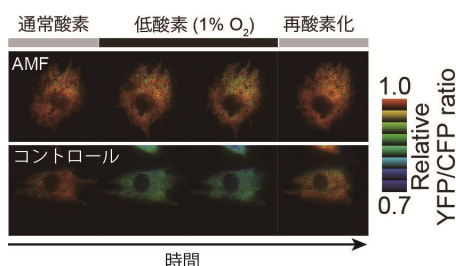


図2 低酸素下におけるミトコンドリア ATP 濃度の変化

これらの結果から、AMF タンパク質はミトコンドリアにて FoF1-ATP 合成酵素複合体と結合し、ミトコンドリア ATP 産生を促進していることが明らかとなった。この成果を PNAS 誌に発表した。

(3) ゼブラフィッシュを用いた虚血時のエネルギー代謝調節機構における AMF の機能解析

研究代表者らは培養心筋細胞で用いた ATP 感受性 FRET プローブを心臓特異的に発現するトランスジェニック (TG) ゼブラフィッシュを確立している。まず、ゼブラフィッシュ AMF 遺伝子をクローニングし、AMF が発現すると mCherry 蛍光を発するコンストラクトを作成した。TG 個体から得られた受精卵に前述のコンストラクトを顕微注射した。2~3 日後の個体をアガロースで固定して Dual CCD カメラを装備した蛍光顕微鏡にて観察した。さらにこの個体を低酸素 (5%O₂) に曝露した条件下で心臓のタイムラプス観察を行ったところ、AMF 遺伝子が発現する領域 (mCherry 蛍光陽性) では、発現しない領域に比してミトコンドリア ATP 濃度の低酸素による低下が減弱していた。この結果は培養心筋細胞で行った結果と一致するものである。

(4) イヌ虚血再灌流モデルを用いた AMF の in vivo における遺伝子発現解析

研究代表者らはイヌの虚血再灌流モデル作成を確立してきた。そこでイヌの虚血再灌流モデルを作成し、虚血再灌流後の心臓について虚血領域および非虚

血領域を複数の部位でサンプリングし RNA およびタンパク質の抽出を行った。RNA は定量 PCR 法、タンパク質はウェスタンブロット法にて AMF の領域ごとの発現比較を行った。興味深いことに、虚血領域では非虚血領域に比して AMF の発現が亢進していることが明らかになった。この結果から in vivo においても AMF は虚血における心筋の ATP 減少に応答していることが示唆された。

(5) ヒトミトコンドリア病患者サンプルを用いた AMF の遺伝子変異解析

当研究室は数年前から国立精神・神経医療研究センターと共同研究を行っておりヒトミトコンドリア病患者由来の血液サンプルの解析を続けている。AMF 遺伝子は核ゲノムにコードされているが、その遺伝子変異が病因であることが報告されており、AMF 遺伝子についても前述の成果から遺伝子変異を伴っている可能性が示唆され、血液サンプルを用いて AMF の遺伝子変異の探索を行っている。未だ変異の発見には至っていないが引き続き継続して探索を行う予定である。

以上の結果から、ミトコンドリアタンパク質 AMF は低酸素、虚血に反応してその遺伝子発現を亢進し、FoF1-ATP 合成酵素複合体と結合することによりミトコンドリアでの ATP 産生効率を促進していると考えられる (図 3)。ゼブラフィッシュを用いた実験の成果について現在論文投稿中である。虚血における ATP 産生能の維持はエネルギー消費の激しい心臓や骨格筋などでは機能維持に大変重要であり、虚血性心疾患の治療標的となりうる。しかしながら今回の成果では AMF がどのように FoF1-ATP 合成酵素に働き ATP 産生を亢進させているのか未だ不明な点も多い。今後は既に明らかにされている FoF1-ATP 合成酵素複合体の結晶構造解析の知見と併せてその ATP 産生制御機構の解明を目指す。

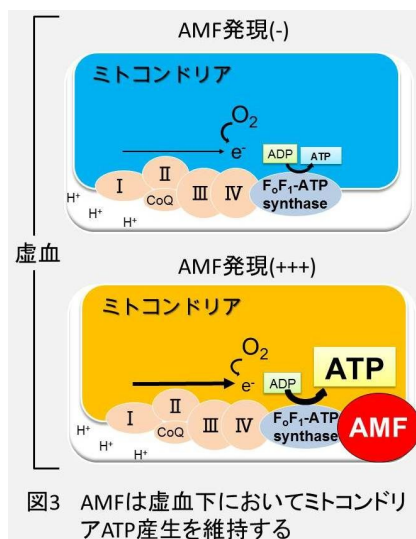


図3 AMFは虚血下においてミトコンドリアATP産生を維持する

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 4 件)

1. Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5. *Nat Commun*. 2015;6:6137. doi: 10.1038/ncomms7137. 査読有
2. Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto Y, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(5):1553-8. doi: 10.1073/pnas.1419767112. 査読有
3. Matsuoka K, Asano Y, Higo S, Tsukamoto O, Yan Y, Yamazaki S, Matsuzaki T, Kioka H, Kato H, Uno Y, Asakura M, Asanuma H, Minamino T, Aburatani H, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S. Noninvasive and quantitative live imaging reveals a potential stress-responsive enhancer in the failing heart. *FASEB J*. 2014; 28(4):1870-9. doi: 10.1096/fj.13-245522. 査読有
4. Kioka H*, Kato H*, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S. Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(1):273-8. doi: 10.1073/pnas.1318547111. (*共同第一著者) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Hisakazu Kato, Hidetaka Kioka, Makoto Fujikawa, Toshiharu Suzuki, Hiromi

Imamura, Masasuke Yoshida, Yoshihiro Asano, Seiji Takashima. Hypoxia-inducible protein MENT enhances mitochondrial ATP production by interacting with FoF1-ATP synthase. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 神戸国際展示場(神戸市・ポートアイランド)

2. Hisakazu Kato, Hidetaka Kioka, Yoshihiro Asano, Seiji Takashima. Evaluation of Mitochondrial ATP Levels in Vivo Identifies G0/G1 Switch Gene 2 as a Therapeutic Target of Ischemic Heart Failure. 第 18 回日本心不全学会学術集会 2014 年 10 月 11 日 大阪国際会議場(大阪市北区・中之島)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科医化学講座
<http://medbio.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 久和 (Kato Hisakazu)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号: 30589312