

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460372

研究課題名(和文)ミトコンドリア内チロシンキナーゼc-Src調節とその生物学的意義に関する研究

研究課題名(英文)Regulation and biological significance of mitochondrial c-Src.

研究代表者

本間 好(Homma, Yoshimi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60192324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア内c-Src活性の阻害により著明に活性酸素の産生が増加する。c-Src活性維持および活性酸素産生抑制に関与する因子の一つflotillin-1を同定した。一方、c-Src基質であるコハク酸デヒドロゲナーゼAのリン酸化不可変異体をB細胞に発現し、恒常的に高レベルの活性酸素をB細胞内で産生するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスにおいては、メスでは正常な液性免疫反応を示したが、オスでは免疫反応が顕著に抑制された。

研究成果の概要(英文)：Suppression of c-Src activity enhances production of radical oxygen species (ROS) in mitochondria. We identified flotillin-1 as a c-Src substrate that prevent ROS production. We produced transgenic (Tg) mice expressing a phosphorylation-defective mutant of succinate dehydrogenase A in B cells. Splenic B cells in male, but not female, Tg mice produced enhanced ROS, and exhibited decreased humoral immune response.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：ミトコンドリア 活性酸素 チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞エネルギー生成の大半を担う細胞小器官であり、酸化的リン酸化による ATP 合成を行う一方、酸素呼吸に伴って生じる活性酸素種 (ROS) や他の代謝生成物の産生し、さらには細胞死因子の放出などを介してさまざまな細胞制御を行っている。一方、呼吸鎖コンポーネントは、ミトコンドリア内膜近傍やマトリックスに存在する多数のシグナル伝達分子によって厳密に制御されており、この制御系として、細胞質ゾルに存在するシグナル伝達経路と密接に関連した独自の調節システムを構成している。各種がん細胞やパーキンソン病神経組織においては、ミトコンドリアで産生した ROS が病態の形成に重要な役割を果たすことが知られている。正常細胞においても、ミトコンドリアで行われる酸素呼吸の過程で消費酸素の約 1% が ROS に変換される。ROS の産生は遺伝子異常や低酸素などにより著しく亢進し、核酸、タンパク質、脂質の過酸化反応を増加させ、その結果、更なる遺伝子変異やアポトーシスが進行する。

われわれは、特発性肺線維症の病態シグナル解析に関するこれまでの研究から、呼吸系や酸化系コンポーネントの多くがリン酸化を受けており、その責任キナーゼは c-Src や PKA などであること、これらのリン酸化の意義は、変異解析から、ATP 産生に必須である場合、膜電位に影響する場合、活性酸素の生成に影響する場合、影響がない場合などに大別されること、c-Src および PKA の活性は細胞培養条件で変化するが、活性化機構は細胞質ゾルや細胞表層に存在するメカニズムと異なることを明らかにした (Kabuyama Y, 2010)。また、c-Src がミトコンドリア内に高いレベルで発現していること、c-Src キナーゼ活性を抑制することにより活性酸素の産生が著明に増加することを見出した。さらに、c-Src 基質の網羅的な検索により、新しい 4 種の基質を同定し、その一種、呼吸鎖複合体

の活性中心サブユニットのコハク酸デヒドロゲナーゼ A (SDHA) については、リン酸化部位の一つが Tyr-215 であり、この部位特異的なリン酸化不可変異体 (SDHA^{Y215F}) の強制発現により活性酸素産生が顕著に増大し、神経細胞ではアポトーシスを誘導することを見出した。これらにより、c-Src による Tyr-215 リン酸化が活性酸素生成の抑制、すなわち効率的なエネルギー産生に必要であることを明らかにした (Ogura M, 2012)。

ROS 生成には、電子伝達系の FMN、FAD、CoQ などの一電子還元ラジカルが発生源となるが、その分子機構を理解する上でミトコンドリア内のシグナル分子による翻訳後修飾やその制御機構の解明が必須である。しかし、シグナル伝達経路自体に関しても、また、呼吸系コンポーネントの翻訳後修飾の意義に関しても知見が極めて少なく、ミトコンドリア内シグナル伝達系が細胞質ゾルのシグナ

ル系とどのように関連しているのか、また、ミトコンドリア機能をどのように調節するのか、など未解明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、特に非受容体型チロシンキナーゼである c-Src に着目し、以下の 2 つを目的とした。1) ミトコンドリア内 c-Src の調節機構を明らかにする。特に、形質膜直下に存在する c-Src の活性化機構と同様のメカニズムでミトコンドリア内 c-Src が活性化するかどうか、細胞質ゾルのシグナル伝達系と連動する c-Src 活性化機構が存在するのか、を検討する。2) ミトコンドリア内 c-Src 活性の低下による活性酸素産生増加のモデルとして、SDHA 変異体 (SDHA^{Y215F}) を組織特異的に発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、実際に活性酸素産生増加により誘起される病態の分子メカニズムを明らかにする。先行研究により、SDHA リン酸化不可変異体 (SDHA^{Y215F}) を B 細胞特異的に発現する Tg マウスが抗体産生能の低下することを見出している。この Tg マウスをモデルに、免疫不全状態が形成されるプロセスを分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

1) ミトコンドリア内 c-Src 活性調節機構の解明

各種細胞を用いたミトコンドリア内 c-Src 活性の測定: RPE 細胞よりミトコンドリア画分を精製し、それらに含まれる c-Src 活性を、ア) 免疫プロット法、イ) 基質ペプチドを用いた *in vitro* リン酸化アッセイ法、ウ) 質量分析装置によるリン酸化基質ペプチドを定量化する方法、により測定した。同様に、低酸素、高グルコース、酸化ストレスなどの刺激を加えた細胞を用いてミトコンドリア内 c-Src 活性を測定し、細胞内シグナル系との連動について検討した。

ミトコンドリア内 c-Src 複合体のプロテオーム解析: 種々の条件で培養した細胞よりミトコンドリア標品を精製し、免疫沈降により c-Src 複合体を得た。ミトコンドリアに局限して効率よく FLAG-c-Src を発現することを確認しているため、抗 FLAG 抗体により c-Src 複合体を容易に回収できた。Src 阻害剤 PP-2 によりミトコンドリア内 c-Src 活性が強く阻害されることから、これをコントロールとした。同様に、正常および疾患モデルマウス肝よりミトコンドリア標品を調製し免疫沈降により c-Src 複合体を得た。各免疫沈降サンプルについて、既報によりペプチドおよびリン酸化ペプチドを調製しプロテオーム解析を行った。得られた結果を総合して、ミトコンドリア内 c-Src 活性調節機構を明らかにした。

2) 活性酸素による疾患形成メカニズムの解明

Tg マウス作成と免疫反応解析：SDHA 変異体 (SDHA^{Y215F}) を B 細胞特異的に発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。種々の人工抗原に対する液性免疫反応を、継時的に抗体力価を測定し Tg マウスでの抗体産生低下を確認した。脾臓および腹腔洗浄液より B 細胞分画を分取し、各種 B 細胞表面マーカーの発現を FACS 解析することにより、抗体産生低下に密接に関連する B 細胞レパートアの変化を観察した。

B 細胞受容体シグナル伝達系の解析：脾臓および腹腔洗浄液より B 細胞分画を調製し、B 細胞受容体のシグナル伝達機能について、刺激に伴う受容体の自己リン酸化、Syk および BLNK などのリン酸化、PLC γ 2 のリン酸化、細胞内カルシウムイオン濃度上昇を指標に評価した。

タンパク質発現プロファイル解析：抗体産生能の低下が、B 細胞に発現するタンパク質の種類や発現量の変化に起因するかを確認するために、B 細胞の発現プロファイルを RNA-Seq 法により解析した。検出された変化について、長期的な酸化ストレスとどのように関連するのかを検討した。

4. 研究成果

1) ミトコンドリア内 c-Src 活性調節機構の解明

ミトコンドリアに限局して FLAG-c-Src を発現する RPE 細胞を作製し、抗 FLAG 抗体により c-Src 複合体を回収した。基質ペプチドを用いて、この複合体に含まれる c-Src 活性を測定した結果、ミトコンドリア内の c-Src 活性化機構は細胞質や形質膜における機構とは全く異なること、また、c-Src 活性化に必要な分子が存在することなどが明らかになった。一方、c-Src 複合体のプロテオーム解析の結果、flotillin-1 を含めたいくつかの分子が c-Src 活性化に必要であることが判明した。flotillin-1 については、c-Src によりリン酸化されること、このリン酸化が c-Src との相互作用に必要であることを明らかにした。一方、培養液中の高グルコース濃度や血清などの刺激によりミトコンドリア内の c-Src 活性が変化することから、ミトコンドリア内シグナル分子が細胞質ゾルのシグナル伝達系と密接に連動することが示唆された。

正常および肥満や糖尿病のモデルマウスの肝臓よりミトコンドリア分画を得た。それぞれのミトコンドリアサンプルより c-Src 複合体を回収しプロテオーム解析を行った。また、チタンカラムにより濃縮した c-Src 基質リン酸化ペプチドについても同様に解析した。その結果、数十種類以上のタンパク質（多くはリン酸化型）がミトコンドリア内で c-Src と様々な複合体を形成していることが示された。また、肥満や糖尿病のモデル動物の肝臓ミトコンドリアでは、c-Src 複合体の構成成分が正常の場合と大きく異なること

が判明した。

2) SDHA^{Y215F} Tg マウスの解析

c-Src 活性低下による酸化ストレスが惹き起こす病態プロセスを解明するために、c-Src リン酸化不可変異体 (SDHA^{Y215F}) を B 細胞特異的に発現させた独自の Tg マウスを作製した。この個体の脾臓 B 細胞では、恒常的に正常レベルの 3 倍程度の活性酸素 ($O_2^{\cdot -}$) を産生していることを確認した。また、抗原刺激に伴う抗体産生能がオス個体で顕著に抑制されることが明らかになった。この抑制は、IgG₁、IgG₃、IgM のすべてのサブクラスで観察された。興味深いことに、メスではこのような抗体産生の抑制は全く観察されず、正常な免疫反応を示した。

抗原感作オス Tg マウスの脾臓においては胚中心の形成が著しく阻害されており、また表面抗原の解析から成熟 B 細胞数が著しく減少していることが判明した。これらの変化は、T 細胞依存抗原および非依存抗原の両方で観察された。以上の結果から、増加した活性酸素（酸化ストレス）が B 細胞の増殖を阻害する可能性が示唆された。

抗原感作オス Tg マウス脾臓 B 細胞においては、B 細胞受容体活性化に伴う細胞内カルシウムイオン濃度上昇が著しく阻害され、シグナル伝達系が減弱していた。しかし、B 細胞受容体シグナル伝達系に参与する主なシグナル分子 (Btk、PLC γ 2、Lyn) の発現レベルやリン酸化レベルには明らかな変化は認められなかった。

さらに解析を進めた結果、オス Tg マウス B 細胞において B 細胞補助受容体である CD19 の発現レベルが著しく低下していることが判明した。CD19 mRNA レベルはコントロールと同等であった。これらの結果から、活性酸素が CD19 タンパク質の不安定化を引き起こし、B 細胞受容体機能を低下させ、結果として B 細胞の増殖・分化を抑制し胚中心形成および抗体産生を阻害する可能性が示唆された。

RNA-seq 法でオス Tg マウス B 細胞およびコントロール B 細胞の発現解析を行った。その結果、コントロールに比べて発現量が 1.5 倍以上増加した 404 遺伝子、1.5 倍以上減少した 931 遺伝子を同定した。増加した遺伝子の中には glutathione peroxidase 3 などの抗酸化タンパク質が含まれた。また、pathway 解析 (DAVID resources) により、SLE、細胞外マトリックス (ECM)、グルタチオン代謝などを含む 9 pathways が高い関連性を示した。以上の結果は、オス Tg マウス B 細胞において強い酸化ストレス応答が誘起されていることを示している。酸化ストレスに対する感受性には顕著な性差があり、オスにおいては正常レベルの 3 倍程度の活性酸素量で病態が形成されることを示せたことは意義深い。

本研究で作製した Tg マウス(bSDHAY^{215F})
を理化学研究所バイオリソースセンターに
寄託した(寄託番号 D16-0175)。

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 2 件)

Ogura M, Yamaki J, Homma MK, Homma Y.
Phosphorylation of flotillin-1 by
mitochondrial c-Src is required to
prevent the production of reactive
oxygen species. FEBS Lett 588:
2837-2843, 2014

Ogura M, Inoue T, Yamaki J, Homma MK,
Kurosaki T, Homma Y. Mitochondrial
reactive oxygen species suppress
humoral immune response through
reduction of CD19 expression in B cells
in mice. Eur J Immunol 47:406-418, 2017

[学会発表] (計 3 件)

小椋正人、八巻淳子、本間美和子、本間
好。ミトコンドリア内 c-Src による活性
酸素種産生制御機構の解明。65 回日本薬
理学会北部会、福島、2014

Homma Y. Enhanced metabolic ROS
production by a loss of protein
phosphorylation in mitochondria. 21th
International CH Symposium on Cancer
Research, Moscow, Russia, 2016

Ogura M, Yamaki J, Homma MK, Homma Y.
Phosphorylation of respiratory chain
components by mitochondrial c-Src is
required for neuronal viability.
Neuroscience2016, San Diego, USA, 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

本間 好 (Homma, Yoshimi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 60192324