

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460378

研究課題名(和文) 哺乳類のミトコンドリアストレス伝達経路の解明

研究課題名(英文) Analysis of mitochondrial stress signaling pathway

研究代表者

矢野 正人 (Masato, Yano)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：60315299

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)：ミトコンドリア内に不良タンパク質が蓄積した場合、ミトコンドリアストレス伝達経路が活性化され、その情報がミトコンドリアから核へと伝えられる。すると、ミトコンドリアのunfolded protein response (UPR) が活性化され、分子シャペロンやプロテアーゼ類の発現が誘導される。本研究では、哺乳類におけるミトコンドリアストレス伝達経路を解明するため、その候補因子であるABCB10等の機能解析を試みた。その結果、ABCB10の発現量を低下させると、ミトコンドリアのUPRが低下することがわかった。このことから、ABCB10はミトコンドリアストレス伝達経路に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When abnormal proteins accumulate in mitochondria, the mitochondrial stress signaling pathway is activated, and the signal is transmitted from the mitochondria to the nucleus. Then, the mitochondrial unfolded protein response (UPR), which induces the expression of nuclear-encoded mitochondrial molecular chaperones and proteases, is activated. In this study, to elucidate the mitochondrial stress signaling pathway in mammals, the function of candidate factors, such as ABCB10, in this pathway was analyzed. As a result, depletion of ABCB10 reduced the mitochondrial UPR, suggesting that ABCB10 is involved in the mitochondrial stress signaling pathway.

研究分野：生化学

キーワード：ミトコンドリア ストレス ABCB10 TMEM65

1. 研究開始当初の背景

当時、ミトコンドリアの機能不全は、老化やそれに関連する様々な病態の発症に大きな影響を与えることが明らかにされつつあった(Raffaello A. et al., *Biochim. Biophys. Acta* (2011) 1813, 260-268)。ミトコンドリアの機能不全が起こる原因としては、活性酸素種(ROS)の産生増加による酸化ストレスの亢進がよく知られている。ミトコンドリアにおいては、酸化リン酸化によるATP合成に伴い常にROSが産生されているが、ROSはミトコンドリア遺伝子の変異だけでなく、ミトコンドリアの脂質やタンパク質の酸化修飾を引き起こす。このようなROSの産生増加による酸化ストレスの亢進とミトコンドリア機能の低下は、加齢とともに徐々に進行してゆくことが知られており、老化やそれに関連する疾患の原因の1つであると考えられている。

研究代表者らは、過去に、短寿命・インスリン分泌不全・脂肪萎縮・高血糖など、多彩な病態表現型を示すスフィンゴミエリン合成酵素1(SMS1)ノックアウト(SMS1-KO)マウスの解析を行った。その結果、『SMS1-KOマウスの膵細胞における酸化ストレスによるミトコンドリア機能不全が、インスリン分泌不全となる原因の1つである』ことを見出した(Yano M. et al. *J. Biol. Chem.* (2011) 286, 3992-4002)。このことから、『酸化ストレスの亢進によるミトコンドリアの機能不全が、SMS1-KOマウスの多種多様な病態に共通する根本的原因である可能性』が出て来た。実際、その後の解析により、SMS1-KOマウスにおける脂肪萎縮については、脂肪細胞のミトコンドリア機能の低下がその原因の1つであることがわかった(Yano M. et al. *PLOS ONE* (2013) 8, e61380)。また、SMS1-KOマウスにおける細胞応答を調べた結果、ミトコンドリア合成に関わる転写因子(PGC-1 α など)やATP合成に関わる呼吸酵素複合体の構成因子だけでなく、ミトコンドリア内に局在するプロテアーゼ類や分子シャペロン類の発現量も増加していることがわかった。これらのことから、SMS1-KOマウスでは、酸化ストレスによりミトコンドリア内に不良タンパク質が蓄積しやすくなっており、それらを除去するためのミトコンドリアのunfolded protein response(UPR)(以下、ミトコンドリアストレス応答)を誘導するためにミトコンドリアストレス伝達経路が活性化されているのであろうと推定した。ミトコンドリアストレス伝達経路とは、酸化ストレスなどで生じたミトコンドリア機能不全の原因となる不良タンパク質の蓄積を抑制するために、ミトコンドリアから核へと伝えられる情報伝達経路である。その情報伝達経路の最終段階であるミトコンドリアストレス応答では、ミトコンドリア内で働くプロテアーゼ類や分子シャペロン類が核DNAから発現し、ミトコンドリア内に運ばれて、不良タンパク質の除去や再生が行われる。しかし、当時、ミトコンドリアから核にストレス情報が伝達される機構については、解析が進んでいた線虫でも部分的にしか解明されておらず、哺乳類ではほとんどわかっていなかった(Haynes C.M. et al., *Mol. Cell* (2010) 37, 529-540)。線虫においては、ペプチドトランスポーターであるHAF-1が、ミトコンドリアストレスを伝達する因子として働いていると考えられていた。HAF-1は、ミトコンドリア内でタンパク質が分解されてきたペプチドを細胞質に放出する役割を持ち、それにより放出されたペプチドがある種の転写因子等を活性化することで、ミトコンドリアストレス情報が核に伝達されていると考えられていた。線虫のHAF-1のオルソログであると推定される哺乳類のタンパク質にABC10があるが、研究代表者らは、過去のSMS1-KOマウスを用いた解析から、ABC10の発現量がSMS1-KOマウスの細胞で上昇していることを見出していた。このことから、もしかすると、哺乳類のABC10は、線虫のHAF-1と同様にペプチドトランスポーターとしての機能を持ち、ミトコンドリアのストレス情報を核へ伝達してミトコンドリアストレスを軽減させる作用を持つのではないかと推定した。また、上記の解析過程において、機能不明(当時)のタンパク質TMEM65の発現量もSMS1-KOマウスの細胞で上昇していることがわかった。さらには、TMEM65がミトコンドリアに局在するタンパク質であることもわかった(Nishimura N. et al., *PeerJ* (2014) 10, e349)。これらのことから、ABC10だけでなく、TMEM65もミトコンドリアストレス伝達経路に関与する因子である可能性が考えられた。そこで、本研究においては、ABC10およびTMEM65の機能を解析することで、哺乳類におけるミトコンドリアストレス伝達経路の解明を試みた。

2. 研究の目的

過去のSMS1-KOマウスを用いた研究結果から、SMS1の欠損は、酸化ストレスの亢進やミトコンドリア機能の低下だけでなく、ミトコンドリアストレス応答の活性化を引き起こすことがわかった。また、その際、ABC10やTMEM65の発現量が増加することがわかった。これらの結果に基づき、本研究では、哺乳類におけるミトコンドリアストレス伝達経路の解明を目的とし、それに関連する可能性のあるABC10およびTMEM65の機能解析を試みた。

3. 研究の方法

1) 細胞の培養およびノックダウン

HepG2およびHeLa細胞の培養は、10%Fatal bovine serum(FBS)添加DMEM培地を用いて、37℃、5%CO₂雰囲気下で行った。ノックダウンには、27mer siRNA duplex(OriGene社)を用

いた。コントロール実験用には、Universal scrambled negative control siRNA duplex を用いた。細胞内への siRNA 導入には、Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen 社) を用いた。細胞への siRNA 導入を開始してから 72 時間後に、MitoSOX(Red) (Thermo Fisher Scientific 社) による ROS 産生細胞の検出、細胞からの RNA の回収、ミトコンドリアの回収等を行った。

2) 過剰発現細胞の培養

コントロール用 HeLa 細胞、ABCB10-FLAG、ドミナント・ネガティブ型 ABCB10 (ATPase ドメインを除去した ABCB10)、TMEM65-FLAG 過剰発現 HeLa 細胞の培養は、37 °C、5%CO₂ 雰囲気下において、G418 を含む 10% Fetal bovine serum (FBS) 添加 DMEM 培地を用いて行った。

3) 定量的リアルタイム PCR (qPCR)

培養細胞からの全 RNA の回収には、TRIzol reagent (Invitrogen 社) を用いた。全 RNA からの cDNA の合成には、PrimeScript RT-PCR kit (TaKaRa 社) を用いた。FastStart Essential DNA Green Master および LightCycler Nano (Roche 社) を用い、cDNA を template とし qPCR を行った。相対量解析のための内部コントロールとして、 α -アクトチンのデータを使用した。

4) 培養細胞からのミトコンドリアの回収

各種培養細胞をミトコンドリア回収 buffer (3 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 0.21 M マンニトール, 0.07 M スクロース, 0.2 mM EGTA) 中に懸濁し、ダウンスホモジナイザーを用いて氷上で細胞を破碎した。その後、4 条件下において、500 ×g で 5 分間遠心分離することで上澄みを回収し、さらにその上澄みを 10000 ×g で 5 分間遠心分離することで、ミトコンドリアを含む沈殿を回収した。回収された沈殿を、ミトコンドリア回収用 buffer でさらに 3 回洗浄 (10000 ×g で 5 分間遠心分離した後にミトコンドリア回収用 buffer に再懸濁するのを 3 回繰り返す) したものを単離ミトコンドリアとして以下の実験に使用した。

5) ミトコンドリアからのペプチド放出の測定

単離ミトコンドリアを 1 mM ATP を含むミトコンドリア回収 buffer に添加し、37 °C で 3 時間インキュベートした。その後、氷上で冷却し、4 条件下において 10000 ×g で 5 分間遠心分離を行い、ミトコンドリアを沈殿として除去するとともに、上澄み (ミトコンドリアから放出されたペプチド類を含むと予想される) を回収した。次に、この上澄みを限外濾過膜で濾過し、分子量ごとに分画した。具体的には、30kDa 用、10kDa 用、3kDa 用の NanoSep centrifugal device (Pall 社) を用いて、分子量 30kDa 以上の画分、10 ~ 30kDa の画分、3 ~ 10kDa の画分、3kDa 以下の画分に分離した。それぞれの画分に含まれるペプチド・タンパク質の定量は、QuantPro BCA assay kit (Sigma-Aldrich 社) を用いて行った。

6) クロスリンカーを用いた架橋実験

ミトコンドリア内のタンパク質を架橋させる際には、架橋試薬 Disuccinimidyl suberate (DSS) を用いた。反応は、室温で 30 分間行い、反応を停止する際には、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) を加えた。

7) FLAG 融合タンパク質に結合するタンパク質の検出

FLAG タグ付き ABCB10 (ABCB10-FLAG) または TMEM65 (TMEM65-FLAG) の過剰発現細胞から単離したミトコンドリアを 1% Triton X-100 を含む buffer で溶解して遠心分離した後、その上澄みを抗 FLAG 抗体結合ビーズと混合した。そのビーズを同 buffer で洗浄した後、3 × FLAG ペプチドを添加し、抗 FLAG 抗体に結合しているタンパク質を溶出した。その溶出液を SDS-PAGE で展開し、銀染色を行うことで、そこに含まれているタンパク質を検出した。

4. 研究成果

培養細胞内の ABCB10 をノックダウンさせた際の他の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により調べた。その結果、ABCB10 をノックダウンした場合には、各種ミトコンドリアストレス応答因子 (ミトコンドリア内で働くプロテアーゼ LONP1 や分子シャペロン HSPD1、DNAJA3 など) の mRNA 発現量が低下していた。このことから、哺乳類の ABCB10 は、ミトコンドリアストレス情報伝達経路上の因子であると推定した。また、ABCB10 をノックダウンすると、SOD2、SESN3、GSTA1、GSTA2 などの酸化ストレス制御因子群の mRNA 発現量も有意に増加することがわかった。このとき、細胞内の ROS が僅かではあるが増加していることがわかった。さらに、細胞内タンパク質のカルボニル化も僅かではあるが亢進していることがわかった。なお、タンパク質のカルボニル化は ROS の増加により亢進することが知られている。これらのことから、ABCB10 のノックダウンにより一時的に ROS の産生が亢進するが、それを感知して発現誘導される酸化ストレス抑制因子 (SESN3 など) によって、ROS の多くは除去されると推定された。また、ABCB10 が HAF-1 と同様にペプチドトランスポーターとして働いている可能性を検討した。具体的には、ABCB10 やドミナント・ネガティブ型 ABCB10 (ATPase ドメインを除去した ABCB10) の過剰発現細胞、または、ABCB10 をノックダウンした培養細胞から回収したミトコンドリアを用いて、ATP 存在下におけるミトコンドリアからのペプチド放出量を測定した。しかし、いずれの場合もコントロールと比較して有意差はなかった。このことから、哺乳類の ABCB10 は、線虫の HAF-1 とは異なる様式で、ミトコンドリアストレス情報を下流に伝達しているのではないかと推察した。以上の ABCB10 に関する研究結果をまとめ論文発表した (雑誌論文)。なお、上記の結果

を受け、ABCB10は何らかの他のタンパク質と相互作用することでミトコンドリアストレス情報伝達に参与している可能性がある」と推定し、次に、ABCB10と相互作用(結合)するタンパク質の同定を試みた。まず、架橋試薬DSSを用いて、ABCB10に近接しているミトコンドリアタンパク質があるか調べた。具体的には、FLAGタグ付きABCB10(ABCB10-FLAG)を過剰発現しているHeLa細胞からミトコンドリアを単離し、それにDSSを添加してタンパク質の架橋を行い、得られたサンプルを用いてウエスタンブロットを行った。その結果、高分子量化したABCB10-FLAGが検出された。このことから、ABCB10-FLAGと近接しているミトコンドリアタンパク質があることがわかった。また、免疫沈降法を用いて、ABCB10-FLAGと直接結合するミトコンドリアタンパク質があるか調べた。具体的には、単離したミトコンドリアのTriton X-100抽出液に、抗FLAG抗体結合ビーズを添加し、それに結合するタンパク質を回収し、その後、FLAGペプチドを加えることで、結合したタンパク質の溶出を行った。得られたサンプルをSDS-PAGEで展開して銀染色を行ったところ、ABCB10-FLAGや内在性ABCB10であると推定されるバンドだけでなく、それら以外にも異なる分子量のバンドが複数検出された。このことから、ABCB10は、ミトコンドリアにおいて、何らかの他のタンパク質群と相互作用していることが示唆された。

TMEM65をノックダウンさせた際の他の様々なmRNAの発現量をリアルタイムPCR法により調べた。その結果、TMEM65の発現量を減少させた際には、細胞質の脂質代謝関連因子であるFABP1のmRNA発現量が増加することがわかった。また、FABP1のタンパク質発現量も増加していることがウエスタンブロット法により確認された。さらに、TMEM65をノックダウンすると、酸化ストレス制御因子であるSESN3のmRNA発現量も増加することがわかった。また、抗FLAG抗体結合ビーズを利用し、ABCB10の場合と同様にして、TMEM65-FLAGと結合している他のミトコンドリアタンパク質があるか調べたが、本研究終了時までには、その候補タンパク質を見出すことはできなかった。

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)

Masato Yano, ABCB10 depletion reduces unfolded protein response in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2017) 486, 465-469. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.063 (査読あり)

[学会発表](計 1件)

矢野 正人, 田中 遥, 福嶋 美喜子. 哺乳類 ABCB10 のミトコンドリアストレス応答伝達経路への関与に関する解析. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 26 日, 仙台(仙台国際センター)

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 正人 (YANO, Masato)
熊本保健科学大学・保健科学部・教授
研究者番号: 60315299

(2)研究分担者

なし