

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840070

研究課題名(和文) 老化機序の鍵を握る、核構造と代謝ネットワーク相互作用の解明

研究課題名(英文) The study of crosstalk between nuclear structure and cellular metabolism

研究代表者

瀬戸山 大樹 (SETOYAMA, DAIKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30550850

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)：細胞の核膜構造の安定性と老化プロセスの関係が示唆されているがその分子機構は不明である。本研究において、核膜異常と細胞内代謝の関係性について検証した。ラミンAの機能異常を引き起こすプロジェリンを発現させると、主要なエネルギー産生系代謝経路に影響はなく、むしろ、ミトコンドリアのタンパク質翻訳系に作用する可能性を見出した。本研究結果は、これまで知られていない核とミトコンドリア相互作用の一作用点を明らかにした重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although the stability of nuclear membrane is correlated with the cellular aging process, the molecular mechanism is still unknown. In this study, the relationship between cellular metabolism and the nuclear membrane abnormality was investigated. When expressed in cell, the progerin protein, the dominant negative mutant of lamin A, did not influence a major energy-generating metabolism including glycolysis and TCA cycle. Rather, the protein increased the quantity of N-formylmethionine, which resides in mitochondria and play roles in translation process. These results raise the possibility of previously undescribed crosstalk between nuclear stability and mitochondrial physiology.

研究分野：分子生物学

キーワード：核膜構造 老化 代謝 メタボローム ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

生物の老化現象は不可避だが、複雑な諸要因がどのように相互作用しながら老化プロセスを踏むのか全く解明されていない。近年、この過程における細胞の代謝制御の役割が示唆されているが、代謝を司る低分子化合物(代謝物)の包括的变化に着目した研究実績例はきわめて少ない。近年注目を集めるメタボローム解析技術は、質量分析装置に基づき多くの低分子化合物を同時に測定するシステムであり、細胞内のエネルギー代謝物や生体脂質などの定性および定量分析を可能とする。我々はこれまで、複数種の質量分析装置を駆使して、細胞内代謝物数百種以上の測定システムの構築を進めてきた。

一方、老化と代謝の研究を進めるうえで、老化モデル細胞系の構築が必要とされる。すなわち、代謝物解析技術の確立と合わせて、老化モデル細胞の確立は老化と代謝研究の進展にとって喫緊の課題であるといえる。

早老症として有名なハッチソン・ギルフォード・プロジェリア症候群(プロジェリア)はラミンA 遺伝子(LMNA)の一塩基変異(C1824T)に起因するものである。核タンパク質ラミンA は主に核膜構造の維持等に関与し、このタンパク質の機能異常は様々な疾病と関連している。プロジェリア細胞は、ラミンA のスプライシング異常産物プロジェリントタンパクの発現が正常ラミンA タンパク質の機能を阻害することにより、核膜構造の異常をひき起こすとされる。しかし、その結果引き起こされる老化プロセス、特に、代謝異常との関係性については全く解明されていない。すなわち、プロジェリア細胞は老化と代謝の関係を解き明かす良いモデル細胞系として利用できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、プロジェリア細胞を使い、核膜構造異常が細胞内の主要なエネルギー産生系に与える影響をまず検証し、核膜変化にตอบสนองする代謝酵素(代謝ネットワークの作用点)を決定するのが狙いである。この目的のために必要な課題として、下記の3点について中心的に研究を行った。

- 1) 質量分析技術を深化させ、代謝物の分子網羅性および分析精度を向上し、細胞内代謝をこれまで以上に包括的に捉える技術開発を行う。
- 2) ヒトのラミンA機能阻害細胞を構築する。
- 3) 核構造変化による代謝酵素制御の作用点を決定する。

3. 研究の方法

上記の背景、およびこれまでの研究成果を踏まえて、下記の研究を行った。

- 1) 質量分析の分子網羅性を高めるため、複

数種の分析プラットフォーム(主にGC-MS、LC-MS、およびLC-FT-MS)を整備し、水溶性代謝物と脂質の検出を可能とする分析技術の開発を行った。

- 2) ヒトの培養細胞(HeLa 細胞、HEK293 細胞)を用い、CRISPR/Cas9 系によるLMNA ノックアウト細胞作成を試みた。また、プロジェリンを薬剤誘導的に発現するプロジェリア細胞株を作成した。
- 3) プロジェリア細胞における代謝物変動を観察した。また、エネルギー産生の中央代謝経路(解糖系およびTCA 回路)の活性を評価するグルコースフラックス解析を行った。

4. 研究成果

- 1) 我々が保有する5種類の質量分析装置(GC-MS、LC-MS×2、LC-FT-MS、LTQ-MS)と様々な質量分析前部の分離モードを組み合わせることで、低分子化合物約1,000種のターゲット分析プラットフォームを確立した(下図)。更に、LC-FT-MSを使い、リン脂質を始めとする多様な脂質分子の網羅的分析法リビドミクスを可能とするプラットフォームを整備した。

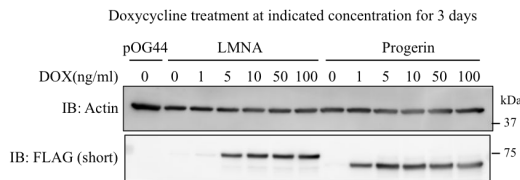
In-House Metabolite Method Library

No	Target	Number	Separation	MS	Mode	Column
1	Central metabolism	98	Ion-pair RP	LCMS	MRM	ACQUITY UPLC C18 BEH
2	Nucleotide	35	Ion-pair RP	LCMS	MRM	Synergi Hydro RP
3	Amino acid-related	120	HILIC	LCMS	MRM	Luna HILIC
4	Acyl-carnitine	36	HILIC	LCMS	PIS	Luna HILIC
5	Water-soluble, nontarget1	-	HILIC	FTMS	HR Scan	Zic-pHILIC
6	Base and Nucleoside	15	RP	LCMS	MRM	KINETEX C18
7	Tryptophan-metabolism	18	RP	LCMS	MRM	KINETEX Phenyl Hexyl
8	Water-soluble, nontarget2	-	RP	FTMS	HR Scan	Discovery HS F5
9	Bile acid	17	RP	LCMS	MRM	ACQUITY C18 BEH
10	Glycerophospholipid	-	RP	LCMS	PIS/NLS	KINETEX C8
11	Free Fatty acid	50	GC	GCMS	MRM	DB5-MS
12	Comprehensive	475	GC	GCMS	MRM	DB5
13	lipids, nontarget	-	RP	FTMS	HR Scan	Accucore C18
14	Lipid mediator	190	RP	LCMS	MRM	KINETEX C8
15	Acy-CoA (short)	5	RP	LCMS	NLS	KINETEX C18
16	Acy-CoA (long)	5	RP	LCMS	NLS	ACQUITY UPLC C18 BEH
		Total	1064			

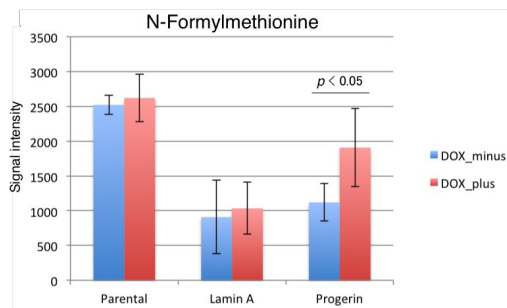
ターゲット約1,000種 + ノンターゲット

- 2) まず、ラミンAの機能阻害細胞(ノックアウト細胞)をゲノム編集により構築するため、HeLa 細胞にLMNAのガイドRNAを挿入したpCas-Guide-EF1-GFPベクターを導入し、GFPを指標に細胞をセルソーターにより単離した。しかし、GFP陽性細胞の生育が非常に悪いため、その後の培養が不可能となった。これに関して、複数種のガイドRNAについて独立に作成を試みたが同様の結果が得られたため、オフターゲットの影響によるものではないと考えられる。この結果は、ラミンAの機能阻害は細胞の増殖等に影響を及ぼす可能性を示唆する。次に別の手法によりラミンAを機能阻害するため、Flp-In HEK293 systemを用いて、プロジェリン(ラミンAのドミナントネガティブ変異体)を薬剤誘導的に発現させる安定発現株の樹立を試みた。その結果、

コントロールである野生型ラミン A とプロジェリンがそれぞれ、独自の至適ドキシサイクリン(DOX)濃度により発現誘導する細胞株を得た(下図)。



- 3) DOX 誘導によりプロジェリンを発現させ、ラミン A を機能阻害した細胞の代謝物変化、特に中央代謝に関わる中間体を観察した。その結果、解糖系および TCA 回路中間体の代謝物に顕著な量的変動は見られなかった。従って、核膜構造の変化により、エネルギー産生の主要な代謝系には直接影響を及ぼさない可能性が示唆された。一方、他の代謝物の中で、ミトコンドリアのタンパク質翻訳の開始メチオニンとして利用される N-ホルミルメチオニンの量がプロジェリン誘導細胞のみ有意に増加していることがわかった(下図)。この結果は、核膜構



造の変化がミトコンドリア内のタンパク質発現系に作用している可能性を示唆しており、大変興味深い。以上の研究により、核膜の障害シグナルがミトコンドリアの生理機能と深く関わっている可能性を示唆した。

#### 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5件)

瀬戸山大樹、康東天. 質量分析による代謝解析アプリケーション~ミトコンドリア障害を捉えるバイオマーカー探索~. 査読有り、福岡医学雑誌 107巻 7号

Wang L, Ishihara T, Ibayashi Y, Tatsushima K, Setoyama D, Hanada Y, Takeichi Y, Sakamoto S, Yokota S, Mihara K, Kang D, Ishihara N, Takayanagi R, Nomura M. 査読有り, Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced

obesity and metabolic deterioration. Diabetologia. 2015 Oct;58(10):2371-80.

Iwasa K, Setoyama D, Shimizu H, Seta H, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Nagai C, Nakahara K. Identification of 3-methylbutanoyl glycosides in green Coffea arabica beans as causative determinants for the quality of coffee flavors. 査読有り, J Agric Food Chem. 2015 Apr 15;63(14):3742-51.

Ohgidani M, Kato TA, Setoyama D, Sagata N, Hashimoto R, Shigenobu K, Yoshida T, Hayakawa K, Shimokawa N, Miura D, Utsumi H, Kanba S. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease. 査読有り, Sci Rep. 2014 May 14;4:4957.

Fujimura Y, Ikenaga N, Ohuchida K, Setoyama D, Irie M, Miura D, Wariishi H, Murata M, Mizumoto K, Hashizume M, Tanaka M. Mass spectrometry-based metabolic profiling of gemcitabine-sensitive and gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. 査読有り, Pancreas. 2014 Mar;43(2):311-8.

[学会発表](計6件)

瀬戸山大樹, 後藤和人, 内海健, Dongchon Kang, ミトコンドリア異常を反映する新たな血しょうバイオマーカーの探索, 2015年11月21日、第62回日本臨床検査医学会学術集会

植柳泰, 瀬戸山大樹, KANG DONGCHON, 血中カルジオリピンの分子種組成に着目した臓器別ミトコンドリア障害の診断法の開発, 2015年10月1日、第九回メタボロームシンポジウム

野見山倫子, 瀬戸山大樹, 安川武宏, KANG DONGCHON, ミトコンドリア DNA 修復障害を感知するマトリクス内代謝応答, 2015年10月1日、第九回メタボロームシンポジウム

瀬戸山大樹, 後藤和人, 八木美佳子, 内海健, KANG DONGCHON, 臓器別ミトコンドリア機能障害を捉える血漿診断法の開発, 2015年10月1日、第九回メタボロームシンポジウム

瀬戸山大樹, 後藤和人, 堀田多恵子, 内海健, KANG DONGCHON, 質量分析法による糖尿病マウス血中に存在する糖化代謝物の同定, 2015年3月17日、第60回日本臨床検査医学会九州地方会/第26回日本臨床化学会九州支部総会

瀬戸山大樹, 後藤和人, 内海健, KANG DONGCHON, 糖尿病診断マーカーとしての糖化代謝物の有用性検討~病態モデルマウス血しょうのパイロット研究~,

2014年11月24日、第61回日本臨床  
検査医学会学術集会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Human plasma metabolites predict severity  
of depression.

発明者: 加藤隆弘, 瀬戸山大樹, 橋本亮太,  
功刀浩, 服部功太郎, 康東天, 神庭重信

権利者: 加藤隆弘, 瀬戸山大樹, 橋本亮太,  
功刀浩, 服部功太郎, 康東天, 神庭重信

種類: 特許

番号: 62/254,185

出願年月日: 2015年11月12日

国内外の別: 米国

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cclm2.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸山 大樹 (SETOYAMA, DAIKI)

九州大学病院・検査部・助教

研究者番号: 30550850