

ヒトミトコンドリアメタボリオーム構成成分の解析

●康東天

九州大学大学院医学研究院臨床検査医学

＜研究の目的と進め方＞

ミトコンドリアDNA (mtDNA) はミトコンドリアにおけるATP合成系の構築に必須の遺伝子をコードしており、その維持は個体の生存に不可欠である。ヒトmtDNAの維持におけるヌクレオイド構造の役割を明らかにするため、まずヌクレオイド構成成分の同定を目的とした。ヒトmtDNAヌクレオイドの精製には、その主要構成成分であるミトコンドリア転写因子A (TFAM) に対する抗体で免疫沈降するというアプローチを取った。特にヌクレオイドのコアな構成成分を明らかにする目的で、架橋剤を用い、mtDNAにクロスリンクされるタンパク質の同定を試みる。さらに同定された個々の蛋白質に関して、mtDNAの維持における役割を解明を目指すとともに、酸化ストレスなどエネルギー代謝に関連した病態下における量的変化を観察し、病態の指標になる可能性について検討する。

＜研究開始時の研究計画＞

(1) ミトコンドリアゲノム蛋白質複合体免疫沈降成分の同定

(i) 正常細胞に加えて、各種病態に対応した条件下の培養細胞のヌクレオイド蛋白質群の変化についても進める。
(ii) ミトコンドリアゲノム蛋白質の解析
作製した抗体を用いて細胞免疫染色し、localizationの解析。

さらに精製リコンビナント蛋白質のDNA結合能およびTFAMとの結合能を解析する。

(2) TFAMのDNA複製・修復への作用の解析

(i) ミトコンドリアDNAポリメラーゼガンマを用いてTFAM存在下でのDNA合成能を比べる。
(ii) ヒトMutYホモログやヒトOGG1などの8-oxoGを認識する修復酵素活性に対する、TFAMの影響解析。
(iii) TFAM過剰発現トランスジェニックマウス解析。
(iv) TFAM発現のノックダウンによるミトコンドリアゲノムの変化について。

＜研究期間の成果＞

(1) ミトコンドリアゲノム蛋白質複合体

(i) ヒトmtDNAに結合タンパク質

ホルムアルデヒドによる架橋反応後、mtDNA-タンパク質複合体を抗TFAM抗体で免疫沈降し、1次元SDS-PAGEに展開した(図1)。ゲル全体を40に細切り、トリプシン消化後LC/MS/MSにてすべての切片に含まれるタンパク質を同定した。HeLaおよびJurkat細胞を用いてそれぞれ2回計4回のすべての実験において、架橋剤プラス時のみに見出されるタンパク質のすべてを以下に示す。

①DNA、RNAに結合することが示唆されているもの

- ・ 130 kDa leucine-rich protein
- ・ Lon protease homolog
- ・ Single-stranded DNA-binding protein

②Heat shock protein

- ・ Heat shock protein 75 kDa

- ・ Stress-70 protein
- ・ 60 kDa heat shock protein
- ・ 10 kDa heat shock protein

③Ribosomal protein

- ・ Mitochondrial 39S ribosomal protein L45
- ・ Mitochondrial 39s ribosomal protein L39
- ・ Mitochondrial 39S ribosomal protein L40
- ・ Mitochondrial 60S ribosomal protein L12
- ・ Mitochondrial 60s ribosomal protein L49

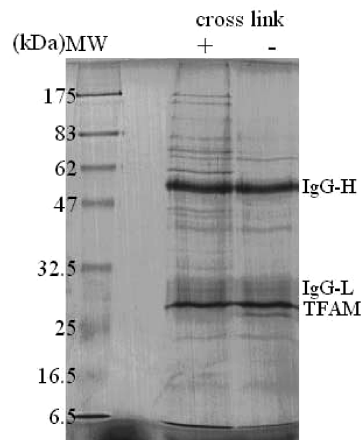


図1. クロスリンクを用いたミトコンドリアヌクレオイドの精製

④TCAサイクル関連

- ・ Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase
- ・ Citrate synthase
- ・ Aspartate aminotransferase
- ・ Acetyl-CoA acetyltransferase
- ・ Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit
- ・ Malate dehydrogenase
- ・ Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] alpha-chain

⑤脂肪酸β酸化系

- ・ Acyl-CoA dehydrogenase
- ・ 3-ketoacyl-CoA thiolase
- ・ Short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
- ・ 2,4-dienoyl-CoA reductase
- ・ Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase
- ・ Enoyl-CoA hydratase

非常に限られたグループに分類できることはこのクロスリンク免疫沈降系の特異性の高さを示している。また、mtDNAがTCAサイクルと脂肪酸β酸化系代謝経路の効率的な進行のための足場となっている可能性と両代謝経路タンパク質のいくつかは、ヌクレオイドの維持にも働くbifunctionalなタンパク質である可能性を示唆している(図2)。

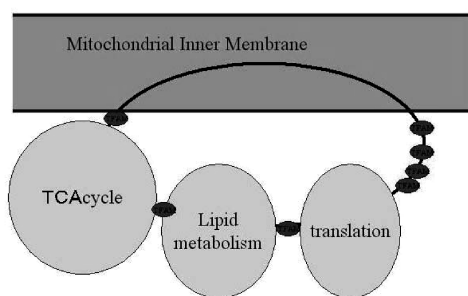


図2. mtDNAと会合している蛋白質群の概念図

(ii) ミトコンドリアゲノム蛋白質の解析

蛋白質同定作業の過程で、必ずしも毎回同定されないマイナーな成分の中にp38と称される以前は核局在とされていた蛋白質が見出された。そのミトコンドリアマトリックスへの局在と一本鎖DNAへの結合能を明らかにした(9)。

(2) TFAMのDNA複製・修復への作用の解析

(i) 複製への関与に関しては、ミトコンドリアDNAポリガラーゼガンマのAおよびBサブユニットと、それに加えミトコンドリアRNAポリメラーゼの発現精製し、転写反応とミトコンドリアDNA複製が共役していることが初めてin vitroの再構成系で示すことに成功した。現在さらにその反応様式を詳細解析中である。(ii) TFAMは8-oxoGに高い親和性をもち、同部へのp53のリクルートを促進することを示した(5)。(iii) TFAM過剰発現トランスジェニックマウスを作製し、心不全モデルにおいてTFAMの過剰発現が心機能の維持と生存率の改善に劇的な効果を示すことが示された(11)。(iv) TFAM過剰発現細胞株の作製とRNAiノックダウンにより、TFAMが主要なmtDNAコピー数の制御因子であり、ヌクレオイド構造がmtDNA安定性に必須であることを明らかにした(6)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

約5年前に申請者がTFAMを中心としたmtDNAヌクレオイド構造の存在を提唱したときには、多くが否定的な反応であったが、昨年ミトコンドリアに関する国際学会では、「今はその説を信じている」と2-3人の知人の研究者から直接話しかけられ、ヒトmtDNAの維持においてヌクレオイド構造が必須であるとの概念は市民権を得たと考えている。国内においてはヒトmtDNAヌクレオイド関連蛋白質の検索をしているのは問うグループだけであるが、国外ではフィンランド英国の研究グループが行っている。昨年クローズドの非公式研究会でデータを発表した。当該グループの研究者はまだ網羅的な検索するに十分なヒトmtDNAヌクレオイドの分離すら十分にされていない状況で我々の再現性のある進行状況に比べ完全に立ち遅れていた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

mtDNAヌクレオイド関連蛋白質の病態での変化の測定を本公募研究での当面の最終目標としていたが、LC/MS/MSシステムでの定量アッセイ系が確立できず達成できなかった。その主な原因はmtDNAと確実に会合している蛋白質を同定するためにクロスリンク法採用したため、回収率の確定が困難であったことが大きかったと思われる。

〈今後の課題〉

mtDNAヌクレオイドの分子レベルでの構造を核DNAヌクレオソームと同レベルまで解析していく必要がある。

また、mtDNAヌクレオイドの分離方法を改善し、プロテオミクスのその構成蛋白質の動的な変化を捉えられるシステムの確立が、病態におけるミトコンドリア機能変化のマーカーとなる成分の発見に必要であると考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文

1. 0311011435
Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N, Kang D. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res*; 31: 1640-5 (2003) .
2. 0311011517
Chumpia W, Ohsato T, Kuma H, Ikeda S, Hamasaki N, Kang D. Affinity purification of antibodies by using Ni²⁺-resins on which inclusion body-forming proteins are immobilized. *Protein Expr Purif*; 32: 147-50 (2003) .
3. 0311011458
Okamoto M, Ohsato T, Nakada K, Isobe K, Spelbrink J, Hayashi JI, Hamasaki N, Kang D. Ditercalinium chloride, a pro-anticancer drug, intimately associates with mammalian mitochondrial DNA and inhibits its replication. *Curr Genet*; 43: 364-70 (2003) .
4. 0311011504
Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation*; 107: 1418-23 (2003) .
5. 0311011504
Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, Kang D, Kohno K. p53 Physically Interacts with Mitochondrial Transcription Factor A and Differentially Regulates Binding to Damaged DNA. *Cancer Res*; 63: 3729-3 (2003) 4.
6.
Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N, Kang D. Architectural role of TFAM in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol*; 24: 9823-34 (2004) .
7.
Sunayama J, Ando Y, Itoh N, Tomiyama A, Sakurada K, Sugiyama A, Kang D, Tashiro F, Gotoh Y, Kuchino Y, Kitanaka C. Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32. *Cell Death Differ*; 11: 771-81 (2004) .
8.
Urata M, Wada Y, Kim S, Chumpia W, Kayamori Y, Hamasaki N, Kang D. High-Sensitivity Detection of the A3243G Mutation of Mitochondrial DNA by a Combination of Allele-Specific PCR and Peptide Nucleic Acid-Directed PCR Clamping. *Clin Chem*; 50: 2045-51 (2004) .
9.
Cheng X, Kanki T, Fukuoh A, Ohgaki K, Takeya R, Aoki Y, Hamasaki N, Kang D. PDIP38 associates with proteins constituting mitochondrial DNA nucleoid. *J Biochem*; 138: 673-8 (2005) .
10.
Hara K, Okamoto M, Aki T, Yagita H, Tanaka H, Mizukami Y, Nakamura H, Tomoda A, Hamasaki N, Kang D. Synergistic enhancement of TRAIL- and tumor necrosis factor alpha-induced cell death by a phenoxazine derivative. *Mol Cancer Ther*; 4: 1121-7 (2005) .
11.
Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, Hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H. Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. *Circulation*; 112: 683-90 (2005) .
12.
Yamaguchi H, Kajitani K, Dan Y, Furuichi M, Ohno M, Sakumi K, Kang D, Nakabeppu Y. MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, protects the dopamine neurons from oxidative damage in nucleic acids caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Cell Death Differ* in press.