

## 平成 28 年度 徳島大学先端酵素学研究所「共同利用・共同研究・熊本地震支援」報告書

1. 研究題目 インスリン分泌やインスリン作用におけるミトコンドリアストレスの影響
2. 申請項目 C. 熊本地震支援 B-8. 生体機能学分野(担当:親泊政一)
3. 申請者 熊本大学大学院生命科学研究部代謝内科学分野・講師・近藤龍也
4. 報告書

**研究概要:**申請者らはこれまでに、インスリン分泌やインスリン作用における細胞質や小胞体でのタンパク質の折り畳み異常に適應するためのストレス応答の役割について研究してきた。最近、線虫においてミトコンドリアでのタンパク質の折り畳み異常(ミトコンドリアストレス)が報告されているが、哺乳類での細胞機能調節での働きは全く分かっていない。ミトコンドリアストレスと代謝との関連をゲノム編集を用いた解析で明らかにする。

### 背景と目的

タンパク質の品質管理機構としての折り畳み異常タンパク質応答(UPR)の概念は、小胞体のみでなく、ミトコンドリアやゴルジ体といった他のオルガネラに対しても広まりつつある。ミトコンドリア UPR (mtUPR)はミトコンドリアストレスを検知し、核遺伝子にコードされたシャペロンやプロテアーゼの発現を介してミトコンドリアのタンパク質ホメオスタシスを維持するストレス応答である。線虫では ATFS-1 等の mtUPR に決定的な因子が見つかったが、哺乳類の mtUPR のメカニズムの大半は分かっていない。

哺乳類で比較的コンセンサスが得られている mtUPR のメカニズムは、ミトコンドリア内で機能するシャペロンである HSPD1 の CHOP を介した発現増加である。CHOP は小胞体ストレス等で誘導される統合的ストレス応答 (ISR) の一部であり、線虫とマウスで ISR のストレスセンサーである eIF2  $\alpha$ キナーゼが mtUPR に関わるという報告もある。さらに小胞体ストレスセンサーとして機能する eIF2  $\alpha$ キナーゼである PERK は、ミトコンドリアと小胞体の接触点 (MAM) の形成に寄与することが報告されていることから、オルガネラ連関の観点からも ISR と mtUPR に関連があるかは興味深い。そこで、本研究では mtUPR と ISR の関係の解明を目的とし、eIF2  $\alpha$ キナーゼをゲノム編集で全て破壊した細胞株で、ミトコンドリアストレスがミトコンドリア機能にどのような影響を及ぼすかを調べた。

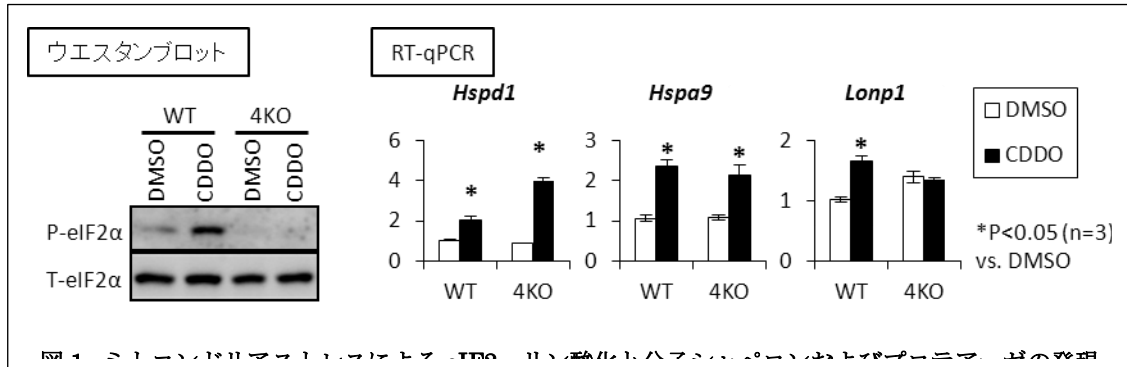
### 研究結果

- 1) eIF2  $\alpha$ キナーゼノックアウト細胞株の樹立

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を用いて、4 種類の eIF2  $\alpha$ キナーゼ (HRI, PKR, PERK, GCN2) を全てノックアウトした細胞株 (4KO) を樹立した。

## 2) ミトコンドリアストレスによる eIF2 $\alpha$ リン酸化と分子シャペロン, プロテアーゼの発現

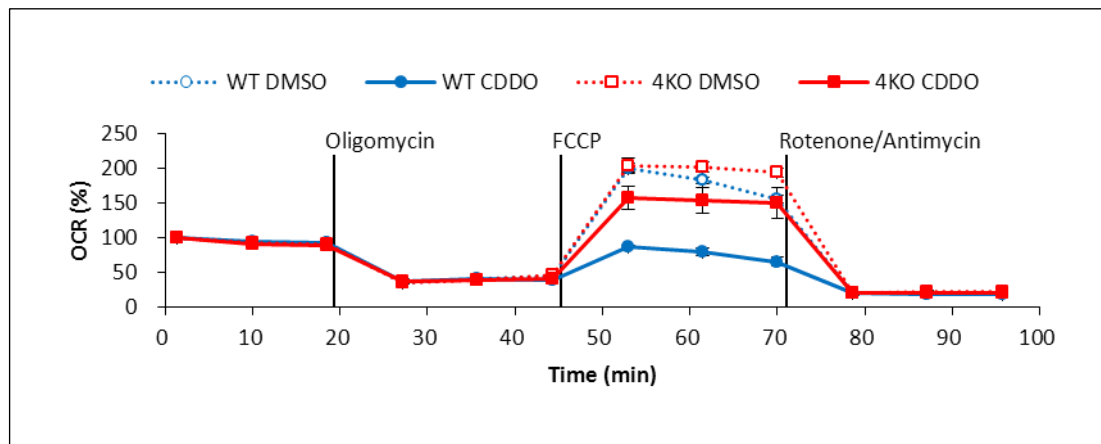
ミトコンドリアストレス誘導剤である CDDO を投与し, 翻訳開始因子 eIF2  $\alpha$  のリン酸化を指標に ISR が誘導されるかを調べた。野生株では CDDO による eIF2  $\alpha$  のリン酸化が観察されたが, 4KO 株では eIF2  $\alpha$  のリン酸化が観察されなかった(図 1 左)。また, CDDO 投与時に分子シャペロンである Hspd1 や Hspa9 の発現は 4KO 株でも野生株と同様に増加したが, プロテアーゼの Lonp1 の発現増加は



4KO 株では観察されなかった(図 1 右)。

## 3) 4KO 株におけるミトコンドリアの代謝機能の評価

CDDO 処理後, Seahorse XFe24 を用いてミトコンドリアの代謝機能を測定した。その結果, 野生株



と比較して 4KO 株では CDDO による最大呼吸量低下が軽減された(図 2)。

## 総括と今後

全ての eIF2  $\alpha$ キナーゼを破壊した 4KO 株の解析結果より, ISR がミトコンドリアストレス時のプロテアーゼ発現誘導とミトコンドリア代謝に関与する可能性が示された。今後は 4KO 細胞株でレスキュー実験を行い, どの eIF2  $\alpha$ キナーゼがミトコンドリアストレス時に機能するかを明らかにする。また, ミトコンドリアストレスによる代謝への影響を詳細に解明するため, ミトコンドリア量, ATP 産生量の解析を行う予定である。