

Title	Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation
Author(s)	木岡, 秀隆
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34175
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	木岡 秀隆
論文題名 Title	Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation (ミトコンドリア内ATP濃度の評価を用いた酸化リン酸化活性化因子G0/G1 switch gene 2の同定)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>真核細胞は細胞活動に必要なエネルギー通貨とも呼ばれるアデノシン三リン酸 (ATP) の大部分をミトコンドリアでの酸化リン酸化 (OXPHOS) により産生している。OXPHOSによるATP産生は収縮のために大量にエネルギーを消費する心筋細胞では特に重要である。細胞の活動を維持するためには需要に応じたエネルギー供給が必須であるがエネルギー危機状態においてその恒常性を維持するための調節機構は良く知られていない。本研究では、心筋細胞を用い、エネルギー危機状態と言える低酸素下において直接OXPHOS機能を調節する新規たんぱく質の同定を目的とした。</p>	
<p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>従来の単離ミトコンドリアを用いたOXPHOS活性評価法では、実験の前に細胞をホモジナイズする必要があり、生きた細胞のままOXPHOS活性を評価することが不可能であった。まず初めにこの問題を克服するために、我々はFRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を用いた蛍光ATP濃度可視化Probe (ATeam) をミトコンドリアマトリックスに発現させることによりミトコンドリア内のATP濃度を選択的に評価することを可能とした (Mit-ATeamアッセイ法)。OXPHOS阻害剤を用いた実験からミトコンドリア内ATP濃度はOXPHOS機能を鋭敏に反映していることが示され、Mit-ATeamアッセイ法を用いることにより生きた細胞においてOXPHOSの活性評価が可能となった。</p> <p>次に心筋細胞において低酸素刺激によって早期に発現誘導される遺伝子群をcDNA microarray法により抽出し、G0/G1 switch gene 2 (G0s2) に着目した。G0s2は心臓、骨格筋、肝臓、脂肪細胞に発現が見られる分子量13kDaの疎水性領域を持つたんぱく質であることが報告されていたが心筋細胞のエネルギー代謝における役割は不明であった。前述のMit-ATeamアッセイ法により評価したところ、G0s2のKnock downにより心筋細胞のOXPHOS活性が低下することが示された。一方でG0s2を強制発現させた心筋細胞は低酸素下においてもATP産生を維持することが示され、G0s2はOXPHOS活性を増強している事が示唆された。</p> <p>次にそのG0s2がミトコンドリアでのATP産生を増強するメカニズムを調べるためにFlagタグ付きG0s2 (G0s2-Flag) を心筋細胞に強制発現させることによりG0s2結合タンパク質の同定を試みた。Flag抗体を用いた免疫沈降によりG0s2-Flagと共沈するたんぱく質を質量分析法により同定したところミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖複合体V (別名F₀F₁-ATP合成酵素) のサブユニットが複数同定された。F₀F₁-ATP合成酵素はミトコンドリア内膜を挟んだプロトン濃度勾配を利用し、回転しながらATPを産生する極めて重要でユニークなタンパク質複合体であることが知られていたがそのATP合成活性制御については不明であった。G0s2とF₀F₁-ATP合成酵素との結合は内因性G0s2に対する抗体を用いた免疫沈降法にて確認された。更に、免疫染色によりG0s2の細胞内局在がミトコンドリアであることが示され、F₀F₁-ATP合成酵素との共局在が示された。</p> <p>次に、セミ・インタクト細胞を用いてミトコンドリアでのATP産生を直接評価した。内因性G0s2の発現を認めないHeLa細胞にG0s2を強制発現させたところATP産生能が増強することが示された。一方心筋細胞において内因性G0s2の発現をノックダウンしたところATP産生能が低下した。</p> <p>以上のことより、G0s2は心筋細胞において低酸素刺激早期に誘導され、F₀F₁-ATP合成酵素と相互作用することによりATP産生を増強し、低酸素に対して保護的に働いていることが示された。</p>	
<p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>今回の研究により我々が同定した低酸素刺激により誘導されるミトコンドリアタンパク質、G0s2がエネルギー危機状態において保護的に働くタンパク質であることが示された。また、ミトコンドリア内ATP濃度の評価が生細胞でのOXPHOS活性評価に有用であることを示した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 木岡 秀隆

	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	大阪大学教授 高島 成二
	副査	大阪大学教授 澤 芳樹
	副査	大阪大学教授 辻本 貞英

論文審査の結果の要旨

真核細胞は細胞活動に必要なエネルギーであるアデノシン三リン酸 (ATP) の大部分をミトコンドリアでの酸化的リン酸化により産生している。本研究では蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いた蛍光ATP濃度可視化プローブを用いることで、心筋細胞において低酸素刺激により発現誘導されるG0/G1 switch gene 2 (G0s2) がミトコンドリアでのATP産生を司るF₀F₁-ATP合成酵素と直接結合することによりATP産生能を増強していることが示された。また、G0s2の強制発現により低酸素に対する耐性を得ることが示され、G0s2がエネルギー危機状態において保護的に働くタンパク質であることが示された。さらに、ミトコンドリア内ATP濃度の評価が生細胞での酸化的リン酸化能評価に有用であることが示されており、今後のエネルギー代謝研究に有益であると考えられる。本研究は学位の授与に値すると思われる。