



Title	新規ミトコンドリア動態制御因子HPGBの細胞機能に関する研究
Author(s)	池田, 和哉
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58570
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【10】	
氏 名	池 田 和 哉
博士の専攻分野の名称	博 士（薬 学）
学 位 記 番 号	第 2 4 5 1 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	新規ミトコンドリア動態制御因子HPGBの細胞機能に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 橋 本 均 (副査) 教 授 藤 尾 慈 教 授 中 川 晋 作 教 授 松 田 敏 夫

論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアは、エネルギー産生をはじめとする、多様な細胞機能と密接に関連する細胞内小器官である。一般に、ミトコンドリアは粒子状に図解されるが、実際には細胞内で主として糸状に存在し、融合と分裂を伴う動的な形態変化（ミトコンドリア動態）を示す。近年、ミトコンドリアの動態制御は、ミトコンドリア間の物質交換、ミトコンドリアの細

胞内分布、機能低下したミトコンドリアの選択的排除に関与し、その機能障害が各種病態の分子基盤になるという概念が提示され、その分子機構の解明は、単に細胞生理に留まらず、疾患や創薬の研究領域でも重要な研究課題であると考えられている。一方、ミトコンドリア動態制御分子は、現在までに数種類が同定されており、各制御因子の 1) 細胞内局在 (ミトコンドリア内局在)、2) 動態に及ぼす作用 (分裂または融合)、3) 作用に関わる分子内ドメインなどの分子特性を明らかにすること、さらにはこれら分子群を含めた包括的機能解析を進めることが、今後のミトコンドリア動態制御の視点からの生理機能研究、疾患・創薬研究のアプローチには必須であると考えられている。我々は、糖尿病の新規創薬標的探索の過程で、II 型糖尿病モデル動物の過形成膵島で発現上昇する機能未知遺伝子を同定し、これを **hyperplasia-associated gene of pancreatic β cell** (HPGB, 膵 β 細胞過形成関連遺伝子) と命名した。本研究で私は、COS-7 細胞一過性発現系を用いた HPGB の細胞機能に関する検討を行い、主として以下 3 つの検討により、本因子が新規のミトコンドリア動態制御因子であることを明らかにした。

まず、HPGB 細胞内局在の解析を行った。免疫染色法や遠心分画サンプルの Western blot 解析、そして、界面活性剤と **proteinase K** を組み合わせた方法により、HPGB がミトコンドリアマトリックス、または、一部核へと局在し、小胞体やリソソームなどには局在しないことを明らかとした。さらに、N 末端への酸性アミノ酸の導入 (FLAG、HA タグの付加、N 末より 14、15 番目のロイシンをグルタミン酸に置換) により、HPGB のミトコンドリア局在性が完全に消失したことから、HPGB は N 末端にミトコンドリア局在化配列を有することを示唆した。マトリックスはミトコンドリア DNA を有し、各種代謝や酸化的リン酸化などミトコンドリア機能の中核となる領域である。したがって、HPGB はこれらミトコンドリアの機能を制御する新規因子であることが示唆された。

次に、HPGB の一過性発現によるミトコンドリア形態・機能に対する影響を検討した。その結果、HPGB の一過性発現によって、通常は糸状の形態を示すミトコンドリアが粒状に断片化すること、そして、ミトコンドリアの機能の指標となるミトコンドリア膜電位が低下することを明らかとした。また、HPGB の部分欠失変異体の作製と、機能解析から、N 末端より 20 から 49 番目のアミノ酸を欠失させた変異体 ($\Delta 20-49$) が、ミトコンドリア断片化誘発作用や膜電位低下作用を示さないことを見出し、本欠失領域が HPGB の機能ドメインに相当することを示唆した。一方、HPGB によるミトコンドリアの断片化は **cytochrome *c*** の細胞質への放出を伴わないことなどから、HPGB の一過性発現は細胞死や細胞生存活性には影響しないことを示した。これまで、ミトコンドリアの断片化と **cytochrome *c*** の放出を伴う細胞死との因果関係を示す報告や、それに反する結果が報告されていたが、HPGB に関する検討結果は、その反例の一つであると考えられた。

ミトコンドリアの形態的变化は、融合・分裂過程の割合の変化の結果と捉える事ができる。そこで、マトリックス局在性タンパクの発現細胞を用いた細胞融合実験により、HPGB の一過性発現がミトコンドリアの融合過程に与える影響を検討したところ、HPGB は少な

くともミトコンドリア内膜の融合を阻害する結果を得た。また、断片化作用などを欠失した変異体 $\Delta 20-49$ では、融合阻害作用も示さないことを見出した。さらに、ミトコンドリア外膜または膜間スペースに局在するタンパクの発現細胞を用いた細胞融合実験により、HPGB はミトコンドリア外膜の融合は阻害しないことを示した。そして、HPGB によるミトコンドリア内膜・外膜レベルでの断片化に関して、ミトコンドリア外膜分裂促進因子 **Fis1** のノックダウンは外膜断片化を阻害する一方、内膜断片化は阻害しないことを見出した。以上の結果から、HPGB はミトコンドリアの内膜融合を特異的に阻害することが示された。一方で、膜電位依存性蛍光色素を用いた検討から、HPGB が膜電位の低下しているミトコンドリアに集積することを示す結果を得た。したがって、HPGB は膜電位の低下したミトコンドリアに集積し、他のミトコンドリアと融合しないように隔離することで、機能低下したミトコンドリアを選択的に排除する機構に関与する可能性が考えられた。

以上の検討から、HPGB は N 末端の移行性配列依存的にミトコンドリアマトリックスに局在し、その一過性発現により細胞死を伴わないミトコンドリアの断片化と膜電位の低下を惹起する新規因子であることを明らかにし、その機能ドメインが分子中央部に存在する可能性、そして、ミトコンドリアの断片化機構にはミトコンドリア内膜融合の特異的阻害が大きく関与する可能性を示した。HPGB のようにミトコンドリア動態を抑制的に制御する因子は稀な例であり、特に内膜の融合を特異的に阻害する因子の発見は、他に類を見ないものである。ミトコンドリアの動態制御を介した機能維持機構は単純な融合促進と分裂促進のバランスのみで成り立つとは言い難く、細胞やミトコンドリアの状況に応じて細かな制御がなされることで、成立することが推測される。したがって、本研究による発見は、ミトコンドリア動態制御機構の新しいプレイヤーを登場させたことで、今後の本研究領域の発展と、関連する疾患群の分子基盤の解明に大きく寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

「新規ミトコンドリア動態制御因子HPGBの細胞機能に関する研究」と題する学位論文において池田は、近年急速に注目を集めている、ミトコンドリアの動態制御の新規因子を発見・同定し、その機能を分子生物学的・細胞生理学的に詳細に解明した。この研究は、ミトコンドリアの機能障害に対して脆弱な心臓や脳などの疾患の分子病態研究に展開する展望を持つもので、その意味において神経薬理学的にも非常に興味深い研究である。

以下、本学位論文で発表された研究成果とその評価を示す。

ミトコンドリアの動態制御は、ミトコンドリア間の物質交換・細胞内分布や、機能低下したミトコンドリアの選択的排除に関与し、その機能障害が各種の病態の分子基盤になるという概念が提示され、その分子機構の解明は、疾患や創薬の研究領域でも重要な研究課題である。神経薬理学分野では、糖尿病の新規創薬標的探索の過程で、II型糖尿病モデル動物の過形成膵島で発現上昇する機能が未知であった遺伝子 (**hyperplasia-associated gene of pancreatic β cell** (HPGB) ; 膵 β 細胞過形成関連遺伝子と命名) を同定した。そこで池田は、COS-7細胞一過性発現系を用いて、HPGBが新規のミトコンドリア動態制御因子であることを、以下の4点によって明らかにした。

- ① HPGBの細胞内局在の解析 様々な実験手法を使用し、HPGBにはN末端にミトコンドリア局在化配列があり、このため主にミトコンドリアマトリックスに局在することを明らかにした。
- ② HPGBによるミトコンドリアの形態と機能への影響 HPGBの一過性発現によって、通常は糸

状態であるミトコンドリアが粒子状に断片化すること、さらにミトコンドリアの膜電位が低下することを明らかにした。また、断片化作用には、HPGBの20から49番目のアミノ酸配列からなる領域が必要であることを示した。

- ③ ミトコンドリア内膜融合に対する特異的な阻害作用 ミトコンドリアの形態的变化は、融合・分裂過程のバランスの結果とも言えるものである。そこで、マトリクス局在性タンパクの発現細胞を用いた細胞融合実験により、HPGBがミトコンドリア内膜の融合を特異的に阻害する作用を持つことを明らかにした。
- ④ 機能との関連 膜電位が低下しているミトコンドリアにHPGBが集積することも明らかにした。この結果は、HPGBは機能低下したミトコンドリアを選択的に排除する機構に関与する可能性を示唆するものである。

HPGBのようにミトコンドリア動態を抑制的に制御する因子は非常に少なく、特に内膜の融合を特異的に阻害する因子は、世界で初めてのものとなる。ミトコンドリアの動態制御を介した機能維持機構は単純な融合促進と分裂促進のバランスのみで成り立つのではなく、細胞内の環境の変化に応じて、精巧かつダイナミックに調節されているものと推測される。本研究は、このような研究にも貢献する、新しいミトコンドリア動態制御機構を持つ分子を発見したものとして大いに意義がある。

以上の通り、本研究の成果は、薬学博士の授与に十分に値するものであると判断する。