

## ミトコンドリア DNA 維持に関わるヒトタンパク質 M-LP の機能解析

研究代表者： 飯田 礼子（医学系部門・准教授）

共同研究者： 植木 美鈴（医学系部門・助手）

概要	M-LP (Mpv17-like protein)は、腎糸球体硬化症やミトコンドリア DNA (mtDNA) 欠乏症の発症に関わる Mpv17 protein に高い相同性を有するミトコンドリアタンパク質である。最近、M-LP の欠失により、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の損傷の増加と、それに伴うミトコンドリア機能の低下が引き起こされることが明らかになった。mtDNA の安定性は TFAM が多数結合することで維持されているが、M-LP の発現レベルが低いと TFAM のリン酸化・分解が起り、mtDNA の損傷が増加する。本研究では M-LP の機能を明らかにするため、①M-LP-KO 細胞におけるミトコンドリアタンパク質のリン酸化状態の解析、および②個体レベルでの解析に有用な KO マウスの作製を行った。その結果、M-LP の欠失は一部の電子伝達系複合体タンパク質のリン酸化を促進することが示された。また、CRISPR/Cas9 システムの利用により、F2 世代においてホモ欠損型 M-LP-KO マウスが得られた。
関連キーワード	M-LP、ミトコンドリア、機能解析、リン酸化、KO マウス

### 研究の背景および目的

#### <研究の背景>

我々は、年齢依存性発現分子検索の過程で未知タンパク質 M-LP (Mpv17-like protein) を見い出した。本分子は、腎糸球体硬化症やミトコンドリア DNA (mtDNA) 欠乏症の発症に関わる Mpv17 protein に高い相同性を有している。従前の研究により、ヒト M-LP の局在や機能に関して次のような知見が得られた。①M-LP は、第 16 番染色体上の *Mpv17L* 遺伝子によってコードされ、少なくとも 2 種類の splicing isoform が発現している。②脳、心、腎、肝、肺、脾、骨格筋などに広く発現し、細胞内では主としてミトコンドリアに局在する。③M-LP は、DNA 修復、ミトコンドリア分裂などに関わる複数の分子 (RPS14、RPS3 および Bap31 など) と相互作用する。また、POLG や LIG3 などの mtDNA 修復酵素と共局在する。④ HK-2 などの培養細胞における M-LP の発現抑制は、mtDNA 損傷の増加、膜電位の低下、活性酸素の増加を惹起し、細胞増殖能が低下する。③M-LP ノックアウト (M-LP-KO) HepG2 細胞では、核および mtDNA 損傷の増

加に加えて、mtDNA 修復酵素 (OGG1、LIG3) や mtDNA の安定・維持に関わる TFAM のリン酸化型の増加とタンパクレベルでの低下が認められる。

これらの知見から、M-LP は mtDNA およびミトコンドリア機能の維持に関わることが強く示唆された。したがって、M-LP の機能の解明は、神経変性疾患などの老年性疾患機序の解明や治療法の開発に発展する可能性が高いと考えられる。

#### <研究の目的>

本研究の目的は、M-LP が担う生理的機能の分子メカニズムを解明であるが、特に次の 2 点について研究を行った。

- ①従前の結果は、M-LP がミトコンドリアにおけるリン酸化に関与する可能性を示唆していた。そこで、野生型 (M-LP-WT) および M-LP-KO 細胞を用いて、ミトコンドリアタンパク質のリン酸化状態の比較解析を実施した。
- ②本研究を個体レベルに発展させるために有用な KO マウスの作製を行った。

### 研究の内容および成果

#### <方法>

#### 1. ミトコンドリアタンパク質のリン酸化状態の解析

M-LP-WT および M-LP-KO 細胞より抽出したミトコンドリア分画を、リン酸化タンパク質に対する親和性を有する PhosphoCruz resin columns (Santa Cruz) に添加し、非結合成分を除去したのちリン酸化タンパク質を溶出させた。溶出分画を濃縮後、

Western blot 法によってミトコンドリアタンパク質を検出した。

#### 2. M-LP-KO マウスの作製

M-LP-KO マウスは、CRISPR/Cas9 システムを利用して作製した (MacroGen)。sgRNA は *Mpv17L* 遺伝子 exon 1 内の 23 塩基をターゲットとして設計した。sgRNA および Cas9 タンパク質を C57BL/6N マウスの

受精卵にマイクロインジェクションし、仮親に移植することによりファウンダーマウス (F0) を得た。続いて、塩基配列分析によってなるべく大きな欠失が生じ、さらにフレームシフトが起こった F0 マウスを選択し、野生型 C57BL/6N と交配させて F1 ヘテロマウスを作製し、さらに F1 マウスどうしの交配により産仔 (F2) を得た。遺伝子型解析は、マウス DNA を鋳型とし、遺伝子欠損部位の両側に設定した 2 つのプライマーを用いた PCR により実施した。

## <結果と考察>

### 1. ミトコンドリアタンパク質のリン酸化状態の解析

M-LP-WT および M-LP-KO 細胞より得られたリン酸化タンパク質について、電子伝達系複合体 I の構成成分である NDUFS4、複合体 IV の構成成分である COX4 および複合体 V のインヒビターである ATP1F1 に対する特異抗体を用いて Western blot 法によって解析した。その結果、NDUFS4 および COX4 のリン酸化が M-LP-KO により増加することが示された。一方、ATP1F1 のリン酸化のレベルの変化は認められなかった。NDUFS4 のリン酸化は、複合体 I の構成を促進させることにより、また、COX4 のリン酸化は、ATP による COX 活性に対するアロステリック阻害を抑制することにより、それぞれ酸化リン酸化を活性化する方向に作用することが知られている。一方、ATP1F1 のリン酸化は、複合体 V との結合能を消失させるため、ATP 合成の阻害活性が弱められ、結果的に酸化リン酸化を抑制すると報告されている。したがって、今回の結果から、M-LP の欠失によって酸化リン酸化が促進されることが示唆された。

### 2. M-LP-KO マウスの作製

得られた F0 マウスの中から exon 1 内の 295bp が欠失したもの (図 1A、レーン 3) を選択し、野生型と交配させることにより F1 ヘテロマウスを得

た (図 1B)。次に、F1 どうしの交配によってホモ欠損型 M-LP-KO マウスを得ることができた (図 1C、レーン 1, 6, 9, 13-15)。KO マウスにおいて、外表上明らかな形態異常は見られなかったが、体重の増加速度が野生型より速い傾向が見られた。現在、統計的解析に必要な匹数を確保するための維持・繁殖を行っており、今後、生化学的および病理組織学的な解析を行う予定である。

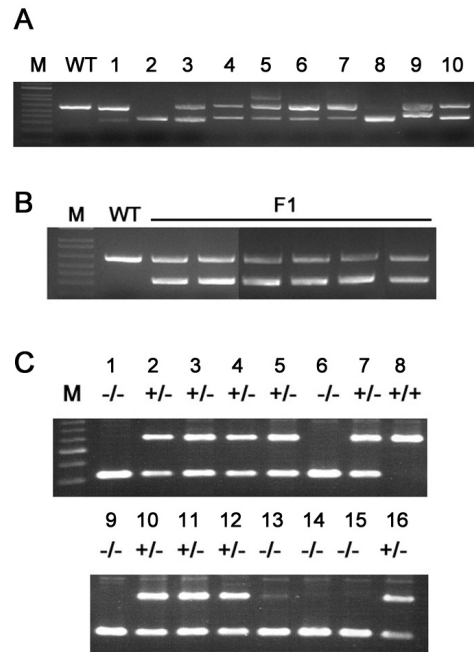


図 1. F0~F2 マウスの遺伝子解析

M: マーカー、WT: 野生型

- A F0 マウス、 B F1 マウス、  
C F2 マウス 2-5, 7, 10-12: ヘテロ、1, 6, 9, 13-15: KO、8: 野生型

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文」

R. Iida, M. Ueki, T. Yasuda: Human Mpv17-like protein with a mitigating effect on mtDNA damage is involved in cAMP/PKA signaling in the mitochondrial matrix 投稿準備中

### 「学会発表」\*

飯田 礼子、植木 美鈴、竹下 治男、藤原 純子、木村 かおり、安田 年博: 年齢依存性発現分子 Mpv17-like protein のミトコンドリア DNA 維持における役割 第 28 回日本 DNA 多型学会、2019

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 科研費 挑戦的研究 (萌芽) 2019-2021 年度 「DNA 損傷に関わる年齢依存性発現分子の機能解析—法医学から老化医学への展開」 飯田 礼子 (代表) 480 万円
2. 科研費 基盤研究 (B) 2021-2022 年度 「DNA 損傷抑制および低酸素応答に関わる生体分子の分子論的解析と法医学への応用」 飯田 礼子 (代表) 申請中

\* 第 28 回日本 DNA 多型学会学術集会において優秀研究賞を受賞した。