

環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性を有する ヒトタンパク質 M-LP の生体内機能の解析

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、成長・加齢に伴い発現が変動する未知の生体分子として見出された。M-LP の欠失は、mtDNA 維持に関わるタンパク質のリン酸化状態を変化させ、mtDNA 損傷を引き起こすことが知られていたが、基盤となる分子メカニズムは不明であった。今回、M-LP を欠失させた細胞においてミトコンドリア内 cAMP 量が顕著に増加することや、タンパク質発現系を用いて合成した M-LP が cAMP 分解活性を持つことなどから、M-LP は細胞の生理的応答において情報伝達物質（セカンドメッセンジャー）として働く環状アデノシン-リン酸を分解するホスホジエステラーゼ（PDE）であることが明らかになった。既知 PDE に対する阻害剤はガン、心不全、喘息など、多様な疾患の治療薬として使用されているが、M-LP の分子構造や細胞内局在は従来の PDE ファミリーとは大きく異なる。したがって、M-LP は、既知 PDE と異なる細胞機能の調節に関与することが予測され、新しい治療法や治療薬の開発に発展する可能性がある。
関連キーワード	M-LP、ミトコンドリア、cAMP/PKA 経路、PDE

研究の背景および目的

M-LP (Mpv17-like protein) は、成長・加齢とともに発現が変動する未知の生体分子として見出されたタンパク質であり、腎糸球体硬化症やミトコンドリア DNA (mtDNA) 欠乏症の原因分子 Mpv17 protein に高い相同性を有する。これまでの研究により、M-LP が細胞質やミトコンドリアに局在すること、細胞レベルで発現を抑制するとミトコンドリア膜電位の低下、細胞増殖能の低下、mtDNA 損傷の増加などが起こることが明らかとなった。また、M-LP-ノックアウト (KO) ヒト肝癌由来細胞 (HepG2) では、mtDNA 維持に関わるタンパク質 Mitochondrial transcription factor A (TFAM) のリン酸化の増加とミトコンドリア内濃度の減少が認められたことから、M-LP 欠失による TFAM リン酸化状態の変化が mtDNA 損傷増加の要因となったものと考えられた。しかし、この現象の基盤となる分子メカニズムの詳細は不明であった。

我々は最近、M-LP が、細胞の様々な生理的応答において細胞内情報伝達物質（セカンドメッセンジャー）として働く環状アデノシン-リン酸 (cAMP および cGMP) を分解する酵素活性を有す

ることを初めて明らかにした。M-LP と同様の活性を示す酵素群は、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) ファミリーとして知られ、これまでに基質特異性や臓器分布などが異なる 11 のメンバーが同定されている。PDE は医薬品開発の重要なターゲットであり、各メンバーに対する阻害剤はガン、心不全、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、勃起障害 (ED) など、多様な疾患の治療薬として既に使用されている。一方、M-LP も PDE 活性を有するが、その分子構造や細胞内局在が PDE ファミリーとは大きく異なる。したがって、M-LP は、未知の細胞機能の調節に関与するものと予測され、新しい治療法や治療薬の開発に発展する可能性がある。本研究の目的は、M-LP の発現や阻害が細胞および個体に及ぼす効果を解析することによって M-LP の機能を解明し、臨床応用を目指すことである。ここでは、①M-LP の発現抑制が細胞に及ぼす変化、②無細胞タンパク質発現系により作製したヒト M-LP (M-LPH) が示す PDE 活性の解析、③M-LPH 欠失変異体の解析による M-LP 分子内活性部位 について報告する。

研究の内容および成果

<方法>

1. ミトコンドリア内 cAMP の測定

野生型 HepG2 細胞および M-LPH-KO 細胞よりミトコンドリアを単離したのち、ミトコンドリア

内の cAMP 量を Direct cAMP ELISA Kit (Enzo) を用いて測定した。

2. 無細胞タンパク質発現系による M-LPH の合成
M-LPH の合成には、M-LPH発現ベクター

(pT7-IRES/M-LPH1) およびHuman Cell-Free Protein Expression System (タカラバイオ) を使用した。

3. PDE活性の測定

細胞抽出液のPDE総活性および無細胞タンパク質発現系によって発現させたM-LPHの活性測定は、それぞれtotal phosphodiesterase activity assay kit (BioVision) およびCyclic Nucleotide Phosphodiesterase Assay Kit (Enzo)を用いて実施した。

4. M-LPH欠失変異体発現用ベクターの作製

M-LPH欠失変異体発現用ベクターの作製には、KOD-Plus-Mutagenesis kit (Toyobo)を使用した。

<結果と考察>

1. M-LPHの発現抑制によって細胞内で引き起こされる変化

TFAM のリン酸化にはプロテインキナーゼA (PKA) が関与することが知られている。M-LPH-KO細胞で観察されたTFAMリン酸化の増加は、ミトコンドリアにおけるcAMP/PKA経路の活性化に起因すると推測された。そこで、野生型 (M-LPH-WT) およびM-LPH-KO細胞について、ミトコンドリア内のcAMP量を測定したところ、M-LPH-KO細胞における顕著な増加が認められた (図1A)。ミトコンドリア内cAMP量は、合成酵素

アデニル酸シクラーゼと分解酵素PDEによって制御されている。M-LPH-KO細胞内のPDE総活性は、野生型細胞の約1/2まで低下していたことから (図1B)、M-LPHがPDEとして機能している可能性が示唆された。

2. 無細胞タンパク質発現系により作製したM-LPHが示すPDE活性

M-LPHがPDE活性を持つことを直接確認するため、タンパク質発現系を用いてM-LPHを合成した。合成M-LPH は 82.0 ± 13.5 mU1/mgの活性を有し、非選択的PDE阻害剤IBMX (40 μ M) はこの活性を阻害した (図1C)。したがって、M-LPHは細

3. M-LPH 欠失変異体の解析による M-LP 分子内活性部位

胞内でPDEとして機能していると考えられた。

M-LPH-KO細胞に、図1Dに示す全長M-LPおよび欠失変異体発現ベクターを導入し、細胞内PDE総活性を測定した。その結果、PDE活性の維持にはC末端領域および2番目と3番目の膜貫通ドメインの間にあるループ領域が最も重要であることが示された (図1E)。

今回、M-LPはHepG2細胞のミトコンドリアPDEとして機能し、cAMP/PKA経路に関与していることが明らかとなった。ミトコンドリアはATP産生やアポトーシスに関与する極めて重要な細胞内小器官であるが、ヒトでは、ミトコンドリアマトリックス内のPDEは同定されていなかった。今後、個体レベルに研究を展開し、各器官におけるM-LPの詳細な機能の解明を目指す。

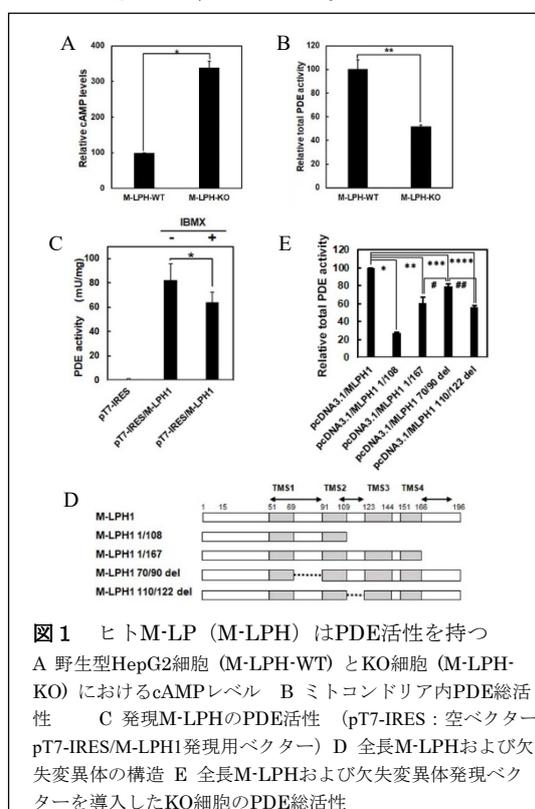


図1 ヒトM-LP (M-LPH) はPDE活性を持つ
A 野生型HepG2細胞 (M-LPH-WT) とKO細胞 (M-LPH-KO) におけるcAMPレベル B ミトコンドリア内PDE総活性 C 発現M-LPHのPDE活性 (pT7-IRES: 空ベクター pT7-IRES/M-LPH1発現用ベクター) D 全長M-LPHおよび欠失変異体の構造 E 全長M-LPHおよび欠失変異体発現ベクターを導入したKO細胞のPDE総活性

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. BBA-Molecular Cell research, 1867, 118792 (2020).

「特記事項」

特許出願中。特願 2020-77450 号

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

◇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

◇令和 2 年度福井大学産学官連携本部可能性試験 助成事業

「治療薬の開発を目指す環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) 活性を有する新規タンパク質 M-LP の機能解析」 15 万円