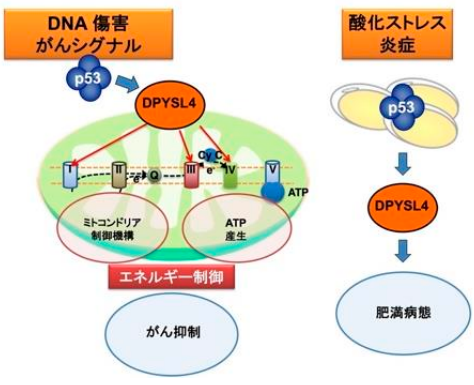
65　呼吸鎖超複合体を介した癌と生活習慣病の分子基盤解明	田中　知明

【目的】ミトコンドリアは約 1,200 種にも及ぶタンパクが複雑な構造体を構成し、ダイナミックに変化することで、生体に必要なエネルギーを産み出すと同時に、老化やがん化シグナル・代謝環境変化に応じて多くの細胞内代謝経路を統括する「要」として機能する。重要なことに、呼吸鎖複合体は、超複合体と呼ばれる高次構造を形成して機能的役割を果たすことが分かってきた。本研究では、「ミトコンドリア超複合体の多面的機能とその制御メカニズムは何か？そして、超複合体とそのエネルギー・代謝機能の変容は、肥満や糖尿病の分子病態にどのように寄与するのか？」という学術的命題に対し、細胞内代謝調節におけるがん抑制遺伝子 p53 に着目し、がんと肥満における共通の分子シグナル経路の中で代謝環境応答変化・細胞内外の代謝制御と細胞増殖・浸潤・腫瘍造成を直接的に結びつけるメカニズムを探索するという新たな切り口からアプローチすることで、がんと肥満の病態形成に共通するミトコンドリア分子基盤の探索とそのエネルギー代謝に与える病態整理的影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】大きく分けて五つの検討項目を検討した。1. RNA-seq と ChIP-seq による p53 依存的新規ミトコンドリア代謝調節機能分子の探索：ヒト前駆脂肪細胞を用いて、RNA-Seq 解析、p53ChIP-seq、ヒストンコードの特異抗体（AcH3、H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3）を用いた ChIP-seq による統合解析。2. CE-TOFMS を用いたメタボロームによる細胞内代謝産物の網羅的定量解析：メタボローム解析により、DPYSL4 の強制発現もしくはノックダウン時の細胞内代謝産物量の変化を解析した。3. 細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア機能解析 4. ミトコンドリア超分子複合体解析：ミトコンドリア内膜に存在する五つの複合体と DPYSL4 の会合と機能について解析した。5. マウスにおける病態モデルの作製と解析：細胞株で観察される DPYSL4 の役割が実際に生体においてどのようにがんと代謝変化の病態に関わるのかを検討した。

【結果】ゲノムワイドの統合解析から、ミトコンドリア局在分子である DPYSL4 を同定した。DPYSL4 は、核酸代謝酵素 dihydropyrimidinase と約 60%のアミノ酸の相同性を有する分子である。構造学的には 4 量体を形成し、DPYSL family はヘテロマーを形成することが分かっている。そこで、ミトコンドリアのエネルギー・代謝調節機能と機能的複合体との関わりを検討した。脂肪細胞と種々のがん細胞を用いて解析した結果、DPYSL4 はミトコンドリア超複合体に会合することでミトコンドリア機能を正に調節する機能を持つことが明らかとなった。マウスモデルを用いて DPYSL4 の病態的役割を検討した結果、がんに関しては肺転移能の抑制効果を認め、がん抑制機能を示した。一方で、DPYSL4 はヒト脂肪組織でも発現し、ヒト肥満脂肪組織においてマクロファージマーカー（INFγ、MCP1、CD68）の遺伝子発現とともに、DPYSL4 の高発現を認めた。特に、INFγの発現と肥満度を示す Body Mass Index（BMI）は、DPYSL4 の発現と相関していた。本研究結果から、がんと肥満を結ぶ新たなミトコンドリア機能制御因子 DPYSL4 を同定できた。DPYSL4 はがん細胞においてミトコンドリアでのエネルギー調節を介したがん形成や細胞増殖に関わる重要な p53 下流遺伝子であることが示された。一方で、脂肪組織においては、炎症が p53 - DPYSL4 シグナルを活性化させ、肥満病態に関与する可能性が示唆された。

ミトコンドリア機能調節因子DPYSL4のがんと肥満におけるエネルギー制御機構



65. 呼吸鎖超複合体を介した癌と生活習慣病の分子基盤解明

田中　知明

千葉大学 大学院医学研究院 分子病態解析学

Key words：ミトコンドリア，呼吸鎖超複合体，脂肪細胞，がん，生活習慣病

緒　言

エネルギー摂取過剰や活動低下などの生活習慣の変化が原因の一つと考えられている肥満や 2 型糖尿病などの代謝疾患は、脳血管障害や心血管疾患などを引き起こすために社会的に問題となっている。日本人の糖尿病の死因の割合は、1991 年以降心血管疾患が減少する一方で、悪性新生物（がん）が増加する傾向にある。肥満・糖尿病では、特に大腸がん・腎臓がん・肝臓がんなどのリスクが高まることが明らかにされており、様々なトランスレーショナルリサーチからその関連性の根拠となるメカニズムが報告されている。一方で、多くのがんや代謝疾患では解糖系、グルタミン代謝、脂質合成系の亢進が認められ、がんの病態や悪性度に深く関わることから、腫瘍形成と脂肪生成には共通の分子機構が存在すると考えられている。その両者を結びつけるオルガネラとして、ミトコンドリアが病態生理的役割を果たすと想定されている。ミトコンドリアには、I から V までの呼吸鎖複合体が存在する。それらが重合し、超複合体と呼ばれる高次構造を形成することによって、電子伝達系と酸化的リン酸化を起こし、エネルギー供給すなわち ATP 産生を行う［1，2］。一方、ミトコンドリアはエネルギー供給だけでなく、TCA サイクルを通じて、脂肪酸合成など細胞の分化や増殖に必要なバイオマスを供給するという側面を持つ。このような多面的機能を有するミトコンドリアは、約 1,200 種にも及ぶタンパクが複雑な構造体を構成し、ダイナミックに変化することで、生体に必要なエネルギーを産み出すと同時に、老化やがん化シグナル・代謝環境変化に応じて多くの細胞内代謝経路を統括する「要」として機能する。特に、呼吸鎖超複合体による高次構造の形成が、機能的に重要な役割を果たしている。

このような背景の中、我々はこれまでに、がん抑制遺伝子 p53 研究と転写因子複合体解析の研究を推進してきた。分子間架橋を利用した高次クロマチン複合体の構成因子同定法［3］を応用し、Akt シグナルによる GATA3 転写複合体制御のスイッチ機構を解明するなど、代謝と複合体解析を融合させた先駆的研究を推進してきた［4〜6］。

本研究では、細胞内代謝調節におけるがん抑制遺伝子 p53 に着目し、がんと肥満における共通の分子シグナル経路の中で代謝環 境応答変化・細胞内外の代謝制御と細胞増殖・浸潤・腫瘍造成を直接的に結びつけるメカニズムを探索するという新たな切り口からアプローチすることで、がんと肥満の病態形成に共通するミトコンドリア分子基盤の探索とそのエネルギー代謝に与える病態整理的影響を明らかにすることを目的とした。本研究の成果は、ミトコンドリア超複合体の制御を標的とした、がんと生活習慣病に共通する革新的な診断・治療法開発への応用が期待できる（図 1）。

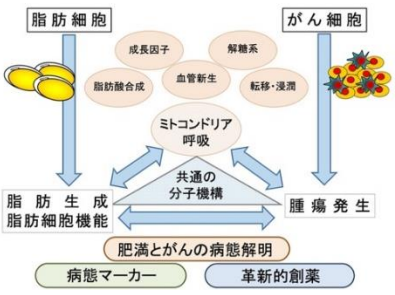


図 1. がんと生活習慣病に共通するミトコンドリア機能制御分子基盤と臨床応用

方　法

1. RNA-seq と ChIP-seq による p53 依存的新規ミトコンドリア代謝調節機能分子の探索

ヒト前駆脂肪細胞を用いて、ジェノトキシックストレス（Adriamycin : ADR）による処置を行い、RNA-Seq 解析と p53ChIP-seq の統合解析を行った。また、ヒストンコードの特異抗体（AcH3、H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3）を用いた ChIP-seq でヒストンコードのプロファイルを網羅的に解析した。RNA-seq で得られた新規の p53 誘導性代謝調節関連遺伝子群を同定し、その細胞内局在について GO データベースと Protein Atlas データベースで解析した。

2. CE-TOFMS を用いたメタボロームによる細胞内代謝産物の網羅的定量解析

キャピラリー電気泳動と質量分析計を組み合わせたメタボローム解析によって、主に解糖系、グルタミン代謝、アミノ酸代謝、TCA サイクルに関わる分子の網羅的定量解析を行った。脂肪細胞やがん細胞を用いて DPYSL4 の強制発現もしくはノックダウン時の細胞内代謝産物量の変化を捉え、DPYSL4 が細胞内代謝のどの段階で作用するのかを検討した。

3. 細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア機能解析

細胞外フラックスアナライサーは、酸素消費速度と細胞外酸性化速度を測定することで、ATP 産生やミトコンドリアにおける呼吸状態を動的に定量解析することができる。しかしながら、この手法だけでは様々な代謝経路の中で具体的にどのような物質が律速となってミトコンドリアの呼吸状態が変化しているのかを同定することができない。この問題を解決するために、メタボロームによる網羅的解析を組み合わせた。

4. ミトコンドリア超分子複合体解析

ミトコンドリア内膜に存在する 5 つの複合体と DPYSL4 の会合と機能について解析する。DPYSL4 とその変異体を強制発現させたがん細胞からミトコンドリア分画を抽出し、ジギトニンで可溶化したのちに BN-PAGE および SDS-page による電気泳動を行う事で異なる超分子複合体形成を観察した。

5. マウスにおける病態モデルの作製と解析

細胞株で観察される DPYSL4 の役割が実際に生体においてどのようにがんと代謝変化の病態に関わるのかを検討する目的で、マウスを用いた病態モデル解析を行った。

結果および考察

1. がんと脂肪細胞に共通する p53 標的の代謝調節分子群の探索

次世代型シークエンサーを用いた ChIP-seq とトランスクリプトーム解析による細胞内代謝を制御する新規 p53 下流遺伝子の同定による新たな生理的役割の探索・代謝環境応答時の p53 依存的 epigenetics 解析を行った。その結果、p53 標的遺伝子として、核酸代謝に関わる酵素に高い相同性を持つ DPYSL4、ポリアミン代謝関連の SAT1 など 20 種類以上の遺伝子を同定した（図 2）。中でも Protein Atlas データベースを用いて、ミトコンドリア局在分子である DPYSL4 に着目した。DPYSL4 は、核酸代謝酵素 dihydropyrimidinase と約 60%のアミノ酸の相同性を有する分子である。構造学的には 4 量体を形成し、DPYSL family はヘテロマーを形成することが分かっている。しかし、*in vitro* での解析で DPYSL4 は DHPase 活性を認めず、DPYSL family が酵素活性を介して直接的にエネルギー産生を調節しているエビデンスはまだない。そこで、ミトコンドリアのエネルギー・代謝調節機能に関わるかどうか、そして、ミトコンドリアの機能的複合体を形成しているかどうかを検討した。

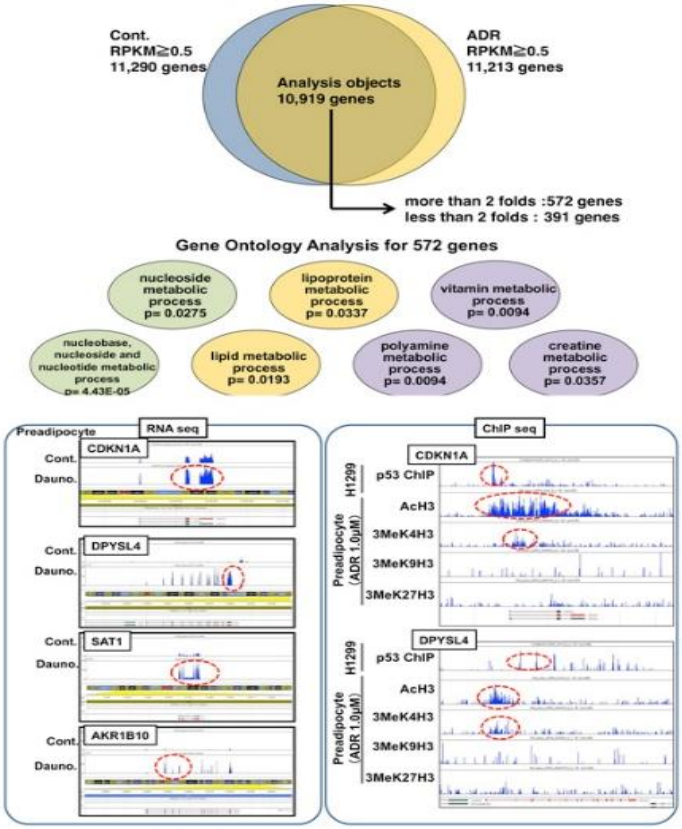


図 2. RNA-seq と p53 ChIPseq による p53 依存的代謝調節関連分子群の同定
ヒト前駆脂肪細胞を用いて、無処理（Cont）またはドキソルビシン（ADR：1μM）を 24 時間処理した。ベン図は、前脂肪細胞の DEG を示している。ゲノムマップは、ヒト前脂肪細胞における CDKN1A と DPYSL4 遺伝子座の p53-ChIP および DNA 損傷時の AcH3 および 3meK4H3 の ChIP-seq。

2. DPYSL4 は呼吸鎖超複合体と会合してエネルギー代謝調節機能を示す

メタボローム解析からがん細胞において DPYSL4 ノックアウト細胞では、フマル酸・コハク酸の増加という好気的回路の抑制を認めるものの解糖系代謝産物への変化はほとんど見られず、ミトコンドリア制御を裏付ける結果が得られた（図 2）。この時の、ミトコンドリア呼吸機能を、フラックスアナライザーを用いて解析した。DPYSL4 ノックアウト細胞を用いた酸素消費解析から、ノックアウトは野生株に比べて酸素消費の低下を認めた。逆に、DPYSL4 の強制発現で、酸素消費と ATP 産生の増加を認めた。興味深いことに、DPYSL4 の変異体の導入では、酸素消費や ATP 産生の増加作用を認めなかった（図 3）。これらの結果は、CRISPR/Cas9 によって作製した *DPYSL4* ノックアウト脂肪細胞においても同様であった。以上より、メタボローム解析と細胞外フラックスアナライザーを用いた解析からがんと脂肪細胞において、DPYSL4 はミトコンドリアにおいて酸素消費と ATP 産生作用を持つことが示された。次に、ミトコンドリアでの会合状態を検討するために、BN/SDS/PAGE による二次元展開とサイズ分画法を融合したミトンドリア超複合体構成因子の包括的同定を行った。ミトコンドリア超複合体解析の独自ノウハウである生化学的二次元プロファイリングを用いて、DPYSL4 が超複合体（Ⅰ・Ⅲ・Ⅳ complex）に会合することを明らかにした（図 4）。次に、正常細胞である脂肪細胞での内因性 DPYSL4 の発現とミトコンドリア複合体解析を行い、同様に複合体Ⅰ／Ⅲ2／Ⅳに存在することを明らかにした。そして、DPYSL4 の変異体はミトコンドリアの超複合体に会合しないことが示され（図 4）、酸素消費や ATP 産生の増加作用を認めないことを反映していた。これらのことから、DPYSL4 はミトコンドリア超複合体に会合することでミトコンドリア機能を制御することが明らかとなった。

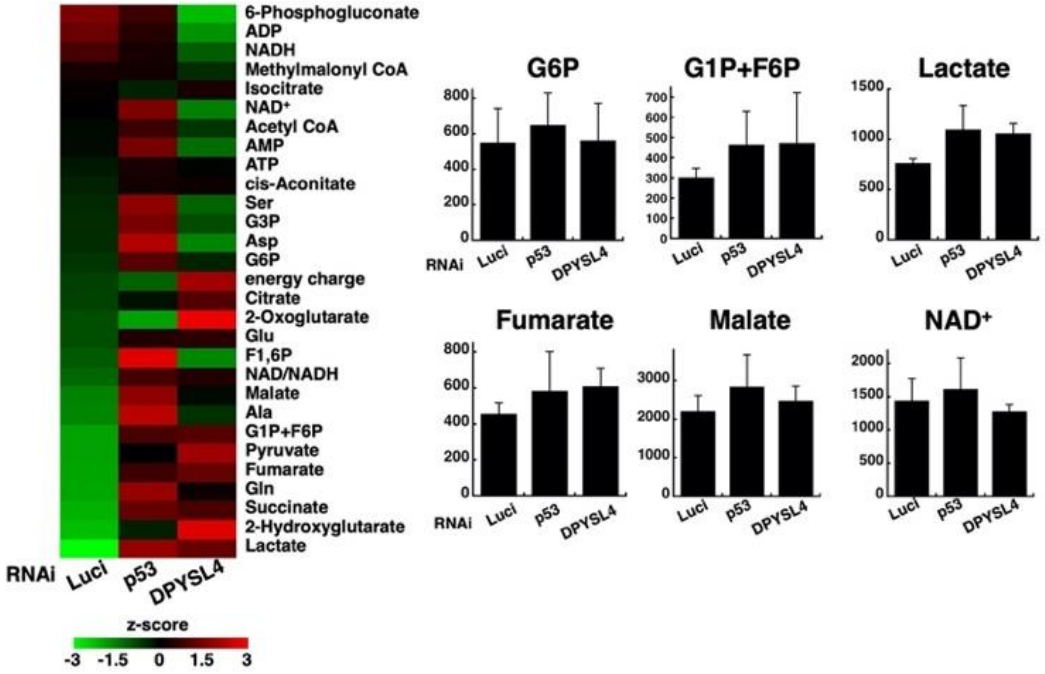


図 3. DPYSL4 ノックダウン効果がもたらす細胞内代謝産物の変化

HCT116 $p53^{+/+}$細胞を、Luci、p53、または DPYSL4 の RNAi で 48 時間処理した後、新鮮な培地に切り替えた。その後、メタボローム解析を施行した。解糖系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路の代謝物の Z スコアをデンドログラム付きのヒートマップ（教師なしの階層的クラスタリングにより配置）で示した。ヒストグラムは、選択した代謝物の平均濃度（pmol／1,000 細胞）をエラーバーとともに示している。

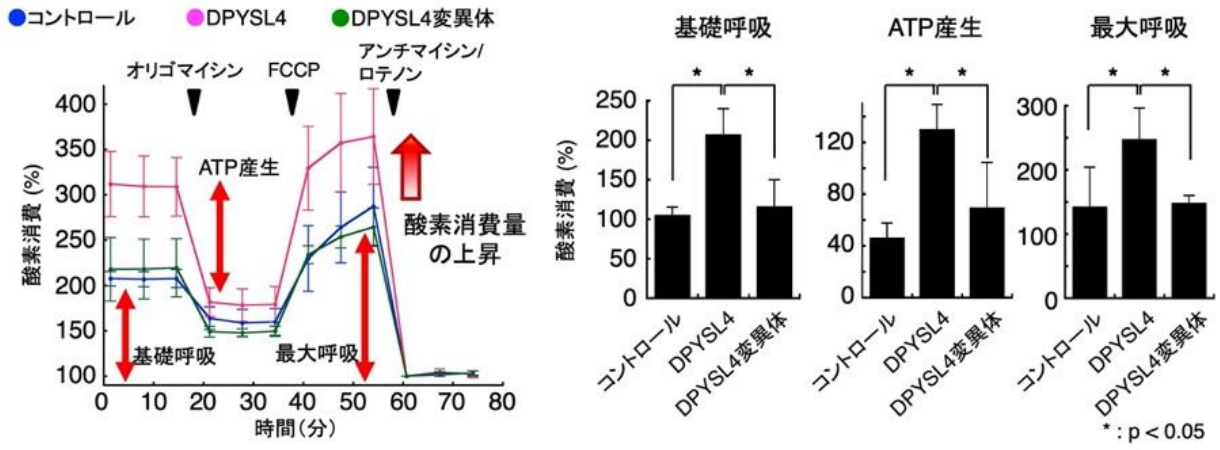


図 4. DPYSL4 の過剰発現による ATP 産生と酸化的リン酸化の調節機能

H1299 細胞を用いて、mock、FL-DPYSL4（FL）、または DPYSL4 Δ mid（Δ mid）を 72 時間過剰発現させた後、OCR をフラックスアナライザーで記録した。DPYSL4（FL）は完全長を示し、DPYSL4（Δ mid）はアミノ酸 194～243 を欠く cDNA コンストラクトを示している。統計は t 検定を用いて、*P＜0.05 を示す。

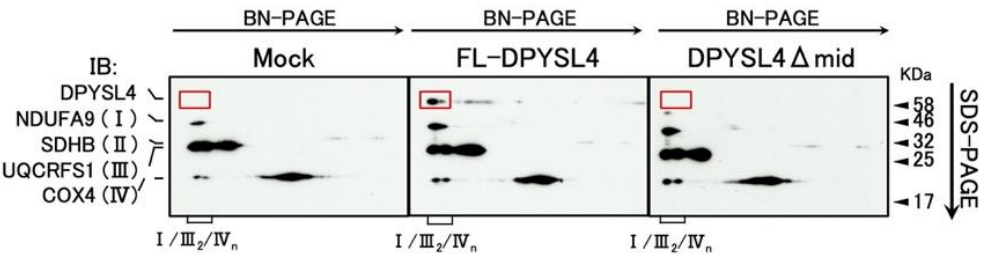


図 5. SuperComplex アッセイによる DPYSL4 と呼吸鎖超複合体の会合

H1299 細胞を Mock、FL-DPYSL4、または DPYSL4 Δ mid を 72 時間過剰発現させた後、ミトコンドリア・スーパーコンプレックス・アッセイを行い、BN-PAGE に続いて SDS/PAGE の 2 次元分解による解析を行った。イムノブロッティングは、DPYSL4-FLAG（赤枠）を検出するために抗 FLAG M2 を用い、複合体 I、III、IV を検出するためにそれぞれ抗 NDUFV1、抗 SDHB、抗 ISP、抗 COX4 を用いて行った。

3. がんと肥満脂肪組織における DPYSL4 の病態生理的役割

マウスにおける病態モデルから、がんの増殖能や転移能を検討した。がん細胞において、DPYSL4 を強制発現させ、NOD/SCID マウスの皮下へ移植し、腫瘍造成能を観察した。その結果、DPYSL4 の存在はコントロールに比べて腫瘍造成能が低下した。また、同様に DPYSL4 を強制発現させたがん細胞を尾静脈注射にて移植し、肺への転移能を検討した。その結果、DPYSL4 の存在はコントロールに比べて、その転移能が低下した（図 5）。以上のことから、がん抑制機能を有することが明らかとなった。

最後に、DPYSL4 はがんだけでなく脂肪細胞でも発現し、ミトコンドリア機能を制御することから、肥満病態における DPYSL4 の役割の検討として、ヒト脂肪組織における発現解析を行った。まず、p53 の免疫染色からヒト肥満脂肪組織では、非肥満脂肪組織に比べて p53 陽性細胞率の増加を認めた。次に、DPYSL4、およびマクロファージマーカー（INFγ、MCP1、CD68）の遺伝子発現解析からこれらの遺伝子の高発現を認めた。特に、INFγの発現と肥満度を示す Body Mass Index（BMI）は、DPYSL4 の発現と相関していた。

本研究結果から、がんと肥満を結ぶ新たなミトコンドリア機能制御因子を発見した。DPYSL4 はがん細胞においてミトコンドリアでのエネルギー調節を介したがん形成や細胞増殖に関わる重要な p53 下流遺伝子であることが示された。一方で、脂肪組織においては、炎症が p53－DPYSL4 シグナルを活性化させ、肥満病態に関与する可能性が示唆された［7］。

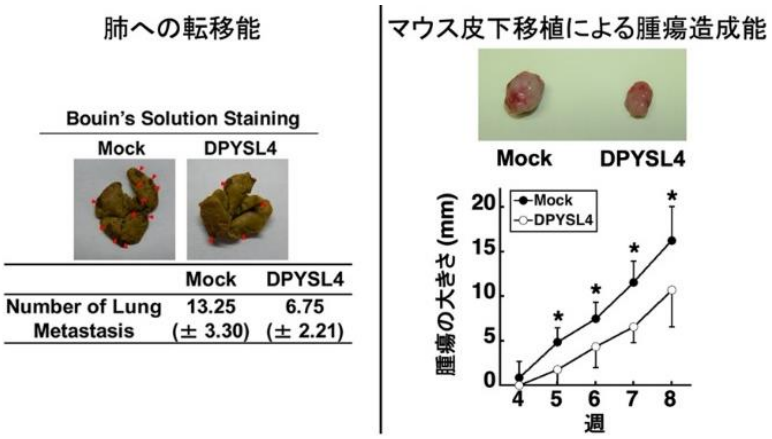


図 6. 生体内における DPYSL4 の癌抑制機能

H1299細胞をMockないし、DPYSL4を発現するレンチウイルスを3日間感染させた後、NOD/SCIDマウスを用いて、肺転移モデルまたはXenograftモデルを施行した。または肺転移モデルに注入した。

左）肺転移モデル。Bouln染色を用いて転移箇所を評価した。赤い矢印は転移を示す。

右） Xenograftモデル。腫瘍の成長を経時的に測定した。統計はt検定を用いて、*P＜0.05を示す。

謝　辞

最後に、上原記念生命科学財団の研究助成金を賜りましたことに心より感謝するとともに、本研究をご支援いただきましたこと、財団の関係者の方々に厚く御礼申し上げます。また、本研究の推進に際して、ご助力いただいた千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学講座のメンバーに心から感謝いたします。

文　献

1） Esther Lapuente-Brun, Raquel Moreno-Loshuertos, Rebeca Acín-Pérez, Ana Latorre-Pellicer, Carmen Colás, Eduardo Balsa, Ester Perales-Clemente, Pedro M Quirós, Enrique Calvo, M A Rodríguez-Hernández, Plácido Navas, Raquel Cruz, Ángel Carracedo, Carlos López-Otín, Acisclo Pérez-Martos, Patricio Fernández-Silva, Erika Fernández-Vizarra, José Antonio Enríquez. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. Science. 2013 Jun 28;340(6140):1567-70. doi: 10.1126/science.1230381.

2） Sara Cogliati, Enrique Calvo, Marta Loureiro, Adela M Guaras, Rocio Nieto-Arellano, Carolina Garcia-Poyatos, Iakes Ezkurdia, Nadia Mercader, Jesús Vázquez, José Antonio Enriquez. Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. Nature. 2016 Nov 24;539(7630):579-582. doi: 10.1038/nature20157. Epub 2016 Oct 24.

3） Tanaka T, Ohkubo S, Tatsuno I, Prives C. hCAS/CSE1L associates with chromatin and regulates expression of select p53 target genes. Cell. 2007 ; 130(4):638-650.

4） Hosokawa H, Tanaka T, Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Endo Y, Onodera A, Tumes J D, Kanai A, Sugano S, Nakayama T. Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish Th2 cell identity. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 ; 110(12):4691-6.

5） Hosokawa H, Tanaka T, Kato M, Tohyama H, Hanazawa A, Tamaki Y, Hirahara K, Sakikawa I, Morita A, Nagira M, Suzuki, Y and Nakayama, T. Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 ; 110(46):18626-31.

6) Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Nakayama T. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFNγ in memory-type Th2 cells. Nat Commun. 2016 ; 7:11289.

7) Nagano H, Hashimoto N, Nakayama A, Suzuki S, Miyabayashi U, Yamato A, Higuchi S, Fujimoto M, Sakuma I, Beppu M, Yokoyama M, Suzuki Y, Sugano S, Ikeda K, Tatsuno I, Manabe I, Yokote K, Inoue S, Tanaka T*. p53-Inducibe DPYSL4 Associates with Mitochondrial Supercomplexes and Regulates Energy Metabolism in Adipocytes and Cancer Cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2018 ;115 (33) 8370-75. http://doi.org/10.1073/pnas.1804243115.