

論文の内容の要旨

論文題目 プロテオーム解析によるミトコンドリア新規複合体の同定

氏名 中野 栄治

ミトコンドリアでは解糖系、クエン酸回路、電子伝達系など様々な反応を経てアデノシン三リン酸(ATP)を産生するだけでなく、細胞内カルシウムイオン濃度調節や脂質酸化など多彩な機能を有している。ミトコンドリアによるエネルギー代謝は種々の臓器の機能に必須であり、腎臓では尿細管機能や腎糸球体の濾過機能に重要な役割を果たしている。腎糸球体における選択的濾過障壁機能の破綻はネフローゼ症候群の原因となるが、近年の網羅的遺伝子解析により、ミトコンドリアに局在する酵素をコードする一群の遺伝子異常が遺伝性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群(SRNS)の原因となることが明らかになった。その中の一つである *ADCK4* はコエンザイム Q10(CoQ10)の合成に関わる酵素 *aaRF domain containing kinase 4 (ADCK4)* をコードする遺伝子である。*ADCK4* に関してはこれまでに *COQ6* と細胞内で結合することや、*ADCK4* 変異患者の線維芽細胞で CoQ10 の産生が低下していることが報告されている。また、*ADCK4* をノックダウンした糸球体上皮細胞(ポドサイト)では遊走能が低下していること、また *ADCK4* 患者変異を導入した酵母細胞では増殖が低下することなど細胞に様々な影響を及ぼす可能性示されている。しかし、実際に *ADCK4* が CoQ10 合成またはその他機能で果たす分子生物学的なメカニズムは明らかになっていない。

本研究は *ADCK4* の細胞内局在および関連分子との機能的相互作用から CoQ10 合成へ与える影響を解明することを目的とし、以下の検討を行った。

(1) *ADCK4* のミトコンドリア局在機序と *ADCK4* 変異体における局在

ADCK4 の細胞内局在を検討するため、N 末端または C 末端にタグを付与した *ADCK4* を発現させると C 末端タグは上方(60 kDa)・下方(55 kDa)の 2 本のバンドを検出し、N 末端タグは上方のバンドのみ検出した。C 末端側を認識する抗 *ADCK4* 抗体ではどちらも 2 本のバンドが検出された。ミトコンドリア画分には上方(60 kDa)のバンドは検出されず、下方(55 kDa)のバンドのみが検出された。これらのことから、*ADCK4* は N 末端に近い部位で分子内切断をうけることが明らかになった。また、蛍光免疫染色では N 末端、C 末端の Flag タグが共にミトコンドリアに局在した。以上のことから、*ADCK4* は N 末端側で分子内切断をうけ、両断端がミトコンドリアに局在することが示された。SRNS の原因として報告のある *ADCK4* 変異が細胞内局在に与える影響を検討したところ、*ADCK4* 変異体はミトコンドリア局在自体には影響がなかった。

(2) ADCK4 の網羅的結合蛋白解析

ミトコンドリアにおける ADCK4 複合体を解析するために、Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) および銀染色のゲル抽出を用い、質量分析による結合蛋白の網羅的解析を行った。これら 2 つの方法の両者から、新規の ADCK4 結合蛋白としてピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ(PYCR)を検出した。PYCR はプロリン生合成の最終段階で働く酵素であり、 Δ 1-ピロリン-5-カルボン酸塩からプロリンへの NAD(P)H 依存性還元を触媒する。PYCR は PYCR1 と PYCR2 のアイソフォームがあり、85%のアミノ酸配列の相同性が認められる。PYCR1 変異は Autosomal recessive cutis laxa type 2B を引き起こし、PYCR2 変異は hypomyelinating leukodystrophy-10 の原因となる。SILAC 法および銀染色による方法の両者で PYCR が検出され、結合蛋白候補として有力と考えられた。

(3) PYCR と CoQ10 合成蛋白による蛋白複合体形成

PYCR のアイソフォームである PYCR1 と PYCR2 はいずれもヒト培養ポドサイトに存在し、また種々の細胞でミトコンドリアに局在していた。免疫沈降実験により ADCK4 が内在性の PYCR1 と PYCR2 の両者と結合することを確認した。また、Proximity ligation assay によりそれらと ADCK4 がミトコンドリアで結合することを明らかにした。さらに PYCR1 および PYCR2 は ADCK4 のみならず ADCK3 とも結合した。

次に PYCR と ADCK4 の結合領域を検討した。PYCR1 の欠失変異体と ADCK4 との結合実験により、ADCK4 が PYCR1 の dimerization 領域で結合することがわかった。COQ6 は ADCK4 と結合するが、免疫沈降実験により COQ6 と PYCR1 が結合することが示された。さらに、その結合には PYCR の dimerization 領域の後半部分が必要であった。ADCK4 と PYCR の結合には PYCR の dimerization 領域の前半と後半が必要であることから、COQ6 と PYCR の結合には ADCK4 を介していないことが明らかになった。これらのことから、ADCK4 と COQ6、PYCR1 は緊密なミトコンドリア内分子複合体を形成することが示された。

(4) PYCR 変異体による ADCK4 の局在変化

次に PYCR のミトコンドリア局在に PYCR のどの領域が関与するかを明らかにするため、欠失変異体の細胞内局在を検討した。PYCR1 の Δ 2-98 はミトコンドリアに局在せず、また Δ 7-40 は部分的なミトコンドリアへの局在を認めた。このことから、PYCR1 の N 末端側の配列がミトコンドリア局在に必須であることが明らかになった。また Δ 117-145 欠失変異体もミトコンドリア局在が完全に阻害された。一方で dimerization 領域の欠失はミトコンドリアへの局在には影響せず、dimerization および ADCK4 や CoQ6 との結合はミトコンドリア局在に必須ではなかった。

次に Autosomal recessive cutis laxa type 2B および hypomyelinating leukodystrophy-

10 で同定された患者変異が PYCR のミトコンドリア局在に変化を与える可能性を検討した。PYCR1 R119H および PYCR2 R119C の患者変異型ではミトコンドリア以外の局在が主体であった。このことから、PYCR の R119 変異による病原性には PYCR 蛋白のミトコンドリア局在の障害が関与する可能性が示唆された。さらに、ミトコンドリアへ局在しない PYCR 変異体が ADCK4 に与える影響を検討した。ミトコンドリアへの局在が変化する PYCR1 欠失変異体(Δ 2-98、 Δ 117-145)および PYCR1 患者変異体(R119H)では共発現した ADCK4 のミトコンドリア局在を阻害することが示された。

(5) PYCR の CoQ10 産生に対する影響

新規複合体の機能として PYCR が CoQ10 の合成に与える影響について検討した。siRNA を用いて PYCR1 および PYCR2 をノックダウンし、細胞内の CoQ10 量をコントロールと比較した。HEK293T 細胞およびヒト培養ポドサイト細胞では、細胞内の CoQ10 量にコントロールとの有意な差は認めなかった。また HEK293T 細胞ではミトコンドリア画分の CoQ10 量にも有意な差は認めなかった。さらに、PYCR1 欠失変異体および PYCR1 患者変異体のドミナントネガティブな作用を考慮し、変異体を遺伝子導入した細胞における CoQ10 量をコントロールと比較した。その結果、コントロールと変異体では細胞内の CoQ10 量に有意差は認められなかった。これら結果からは PYCR による CoQ10 産生への影響は示されなかった。

(6) ADCK4 のキナーゼ活性

ADCK4 のパラログである ADCK3 は酵母のコエンザイム合成蛋白に対するキナーゼ活性を有していることが報告されているが、ADCK4 のキナーゼ活性についてはこれまで検討されていない。 $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ キナーゼアッセイを用い、ADCK4 をキナーゼとしたリン酸化の反応を検討した。HEK293T 細胞から抽出した ADCK4 をミトコンドリア溶解液と反応させると、30~35kDa 付近に明らかに増強されたリン酸化のバンドが検出された。さらに、ADCK4 免疫沈降物に対してリン酸化反応を行ったところ、ミトコンドリア画分との反応で増強されたバンドと同様の分子量でリン酸化反応を認めた。このことから、ミトコンドリアに存在する ADCK4 複合体はそれ自身にキナーゼと基質を含むことが明らかになった。

本研究では、ADCK4 がミトコンドリアに局在する機序を明らかにし、ADCK4 および COQ6 がプロリン合成に関与する PYCR1 とミトコンドリア内で複合体を形成することを明らかにした。さらに、病原となる PYCR1 および PYCR2 の特定の変異は ADCK4 のミトコンドリア局在を阻害することを示した。これらの結果は ADCK4 が PYCR1 と新規の複合体を形成し、ミトコンドリア内で別々の役割を持つと考えられていた機能的複合体同士が相互に関連を持つ可能性を示唆するものである。加えて、ADCK4 複合体がキナーゼ

と基質を含むリン酸化反応を示し、キナーゼ反応が ADCK4 の機能発現に関わる可能性も見出された。

本研究で見出した新規の ADCK-COQ6-PYCR 複合体はミトコンドリアの多様な機能に関与する可能性が示唆される。今後新規の複合体の機能や ADCK4 のキナーゼとしての役割を明らかにすることにより、遺伝性ネフローゼ症候群のみではなく、種々のミトコンドリア病の多様な病態を解明する手がかりとなる可能性がある。