

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

2020年 5月 11日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 東北大学加齢医学研究所・分子腫瘍学研究分野
 職 名 講師
 研究代表者名 菅野新一郎

下記のとおり 年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:191011)

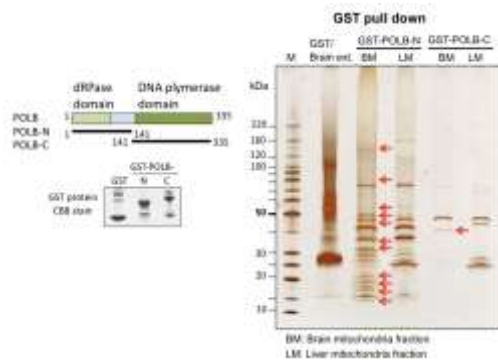
1. 共同利用研究 課題名	脳・神経系細胞におけるミトコンドリア POLB の機能と制御機構の解明			
2. 共同利用研究 目的	脳や骨格筋および心筋など ATP を大量に消費する臓器では、老化の進行によるミトコンドリアの機能不全がアルツハイマーや老人性難聴、サルコペニアなどの疾患の原因になっていると考えられている。我々は以前、核の DNA 酸化損傷修復 (DNA 塩基除去修復) に関わる DNA polymerase beta (POLB) が、脳や骨格筋・心筋および腎臓の細胞では核だけではなくミトコンドリアにも分布し機能していることを明らかにした。POLB には通常のミトコンドリア移行シグナルはなく、臓器特異的にミトコンドリアに移行するメカニズムやミトコンドリアでの制御機構などはまったく明らかになっていない。そこで POLB のミトコンドリアでの相互作用タンパク質を明らかにし、ミトコンドリアのゲノム安定性や機能維持にどのように関わるのか、また、老化によるミトコンドリア機能不全とどのような関係にあるのかを明らかにする。			
3. 共同利用研究 期間	2019年 7月 1日 ~ 2020年 3月 31日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 菅野新一郎	東北大学加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野	講師	研究統括 (研究を計画し実行する)	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル統合経路研究部 ゲノム機能制御研究分 野	氏 名	横井雅幸

※ 次の6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:191011)

6. 共同利用研究計画

(1) ミトコンドリア POLB の機能と制御機構を明らかにするため、ミトコンドリアにおける POLB のプロテオーム解析をする。



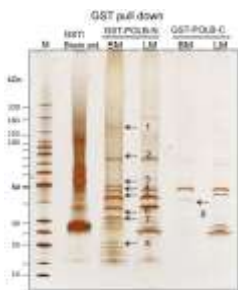
予備実験としてミトコンドリアに POLB が分布する脳と分布しない肝臓のミトコンドリア抽出画分を用いて GST-POLB deletion mutant リコンビナントタンパク質を用いた GST pull down を行い、結合タンパク質の違いを調べた。その結果、POLB の dRPase domain を含む領域で脳と肝臓では著しく結合するタンパク質が異なることを発見した。これらのタンパク質を nanoLC/MS/MS を用いて同定する。

(2) ミトコンドリアの POLB 相互作用タンパク質の解析

プロテオームの結果得られたミトコンドリア画分の POLB 相互作用タンパク質について、DNA 修復と関わるのかをノックダウンや

over expression で明らかにする。

7. 共同利用研究の成果



(1) ミトコンドリア POLB の機能と制御機構を明らかにするため、脳と肝臓のミトコンドリア画分を用いてミトコンドリアにおける POLB のプロテオーム解析をした。ミトコンドリアに POLB が分布する脳と分布しない肝臓のミトコンドリア抽出画分を用いて GST-POLB deletion mutant リコンビナントタンパク質を用いた GST pull down を行ったところ、脳と肝臓では著しく結合タンパク質が異なっていることが分かった。脳由来のミトコンドリアでは POLB がミトコンドリアの ATP dependent RNA helicase DHX30 や RNA 結合タンパク質である PTC3 と結合し、ミトコンドリア RNA transcription complex と相互作用していることが分かった。これらの違いは主に活性の高い脳由来のミトコンドリア内タンパク質の構成の違いによると考えられた。

(2) シグナルペプチド非依存性のミトコンドリア移行システム

ミトコンドリア内にミトコンドリア移行シグナルを持たない DNA repair 酵素が多数発見されている。POLB もミトコンドリア移行シグナルを持たない酵素で、神経系や筋肉細胞、腎臓ではミトコンドリアに分布するが肝臓などの細胞ではまったく分布していない。ミトコンドリア移行シグナルを持つタンパク質はミトコンドリア外膜にある Tom complex に結合し内膜の Tim complex を通してミトコンドリア内に移行する。面白いことに POLB の相互作用タンパク質の解析で内膜にある Tim50 が検出された。また、新しく神経疾患の原因遺伝子の幾つかのタンパク質がミトコンドリアに分布しているのを発見したが、いずれもミトコンドリア移行シグナルを持たず Tim50 と結合することが示された。そこで POLB がミトコンドリアに分布する腎由来の HEK293 細胞と分布しない骨肉腫由来の U2OS 細胞のミトコンドリア画分を用いて Tim50 抗体で免疫沈降した。構成タンパク質を比較したところ、Tim complex の構成タンパク質に多くの違いがあることが示された。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

なし

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

なし。