

# D-アミノ酸 / D-アミノ酸オキシダーゼを利用した $H_2O_2$ 産生系の構築 および $H_2O_2$ がミトコンドリアに及ぼす影響の評価

## Construction of $H_2O_2$ -producing system based on D-amino acid oxidase and evaluation $H_2O_2$ effect for mitochondria

分子生物化学研究室

池谷知美 熊倉夏希

指導教員 藤川雄太 井上英史

東京薬科大学 生命科学研究科

キーワード：レドックスシグナル, 酸化ストレス, ミトコンドリア, マイトファジー

**【諸言】** ROS (活性酸素種, Reactive Oxygen Species) とは、反応性の高い分子群の総称をいい、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) やスーパーオキシド、一重項酸素などが知られている。体内で発生した ROS はカタラーゼなどの抗酸化系システムによって除去されるが、除去能を超えると酸化ストレスとなり、老化やがんの悪性化の一因となることが知られている。一方で、低濃度の ROS は、細胞増殖やアポトーシス、オートファジーといった細胞の恒常性を維持するシグナルにおいてセカンドメッセンジャーとして寄与することが明らかとなってきた。特に  $H_2O_2$  は半減期が長く、穏やかな化学的反応性を持つため、タンパク質中の反応性の高いシステイン残基やメチオニン残基の酸化還元状態を変化させるレドックスシグナルを司る。 $H_2O_2$  は主に細胞膜やミトコンドリアの呼吸鎖、そして小胞体において発生することが知られている。これらの場所から  $H_2O_2$  が発生する際には、同時に他のシグナル伝達カスケードなどが働くことから、生じる表現型が  $H_2O_2$  によるものなのか、他のシグナル伝達カスケードによるものなのかを区別できない。そこで、任意の場所およびタイミングで ROS を発生させる方法は、 $H_2O_2$  が原因となって細胞などに影響をもたらす因果関係を解析する上で非常に有用性が高いと考えられる。

ROS の多くはミトコンドリアで產生されることを考慮し、本研究では、ミトコンドリア特異的に任意のタイミングで  $H_2O_2$  を產生可能な系を構築し、細胞内への  $H_2O_2$  の影響を調べることとした。特に、ミトコンドリア特異的な分解機構であるマイトファジーに対する  $H_2O_2$  の影響を評価した。

**【方法】**  $H_2O_2$  を產生する系を構築するため、赤色酵母由来 D-アミノ酸オキシダーゼ (rgDAO) を利用した。この酵素は、D-アミノ酸を基質として  $H_2O_2$  を產生する酵素である。この酵素をミトコンドリアに局在させた細胞を構築し、この細胞に対して D-アミノ酸を添加することで、ミトコンドリアで  $H_2O_2$  を產生する。D-アミノ酸は、生体内にほとんど存在しないため、D-アミノ酸を投与した時のみ、 $H_2O_2$  を產生することができる。(図 1)

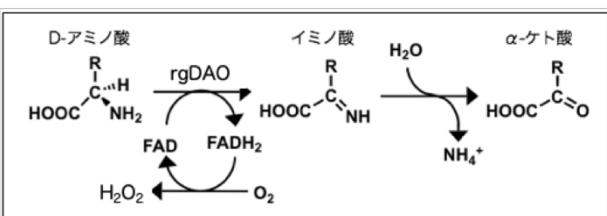


図1 rgDAO による D-アミノ酸の代謝および  $H_2O_2$  の產生

MCF7 細胞および HeLa 細胞に対し、ミトコンドリア移行シグナルを付加した rgDAO 発現プラスミドをトランスフェクションし、rgDAO 発現細胞を構築した (MCF7/mitoDAO,

HeLa/mitoDAO)。その後、蛍光免疫染色法を用いて、発現させた rgDAO がミトコンドリアに局在していることを確認した。次に、構築した系が期待した通りに機能するかを確認するために、D-アミノ酸を投与した際に  $H_2O_2$  が產生されるか、また、発現させた  $H_2O_2$  が細胞内のタンパクを酸化するかについて確認した。前者には、ミトコンドリア  $H_2O_2$  検出蛍光プローブ mito-PY を用いた。また、後者には、 $H_2O_2$  によって酸化され、共有結合性ダイマーとなるペルオキシレドキシン(Prx)の性質を利用し、非還元条件下での SDS-PAGE の後、ウエスタンプロットを行なった。

PINK1/Parkin を介したマイトファジーが誘導される過程において、ミトコンドリア膜電位の低下や E3 ユビキチンリガーゼ Parkin のミトコンドリアへの蓄積が見られることが知られている。<sup>1)</sup> D-アミノ酸を投与し、 $H_2O_2$  が產生された条件でも、ミトコンドリア膜電位の低下や Parkin のミトコンドリアへの蓄積が見られるか検証した。前者の評価には、ミトコンドリア膜電位感受性蛍光プローブ JC-1 を用いた。JC-1 は、ミトコンドリア膜電位が保たれている状態では重合体を多く形成し、赤色蛍光を発する。この特性を利用して、赤色の蛍光強度を指標として D-アミノ酸を投与した際の膜電位の変化を観察した。また、 $H_2O_2$  產生に伴う Parkin のミトコンドリア移行を検証するために、HeLa/mitoDAO 細胞にさらに mCherry-Parkin を発現させた細胞を構築した。この細胞に対して D-アミノ酸を投与し、mCherry-Parkin の局在を共焦点顕微鏡によって観察した。また、Parkin の局在化が  $H_2O_2$  による影響であることを裏付ける実験も行なった。 $H_2O_2$  除去酵素であるカタラーゼを mitoDAO および mCherry-Parkin と HEK293 細胞に共発現させ、この細胞に D-アミノ酸を投与し、mCherry-Parkin の局在の変化を観察した。

また、D-アミノ酸投与に伴うマイトファジーの進行具合への影響は、先行研究<sup>2)</sup>を元に、ミトコンドリアの形状および、Parkin の局在からを定量化した。

**【結果】** HeLa 細胞および MCF7 細胞に発現させた rgDAO がミトコンドリアに局在していることを確認した。また、投与する D-アミノ酸の濃度および投与時間に依存して  $H_2O_2$  が產生すること、発生した  $H_2O_2$  が細胞内のタンパクを酸化することも確認した。

D-アミノ酸を投与すると、その濃度および投与時間依存的に膜電位が低下した。膜電位の低下に伴い誘導される Parkin のミトコンドリアへの移行率は、投与する D-アミノ酸の濃度に依存して大きくなることが分かった。しかしながら、一定以上の D-アミノ酸濃度を投与することで移行は抑制された。ミトコンドリア局在化カタラーゼを共発現した HeLa 細胞に対し、D-アミノ酸を投与すると、コントロールに比べて Parkin のミトコンドリア移行が抑制されていた。

さらに、D-アミノ酸を投与すると、マイトファジーが誘導されることも確認した。しかし、一定以上の濃度を投与した場合、低濃度を投与した場合と比べて、マイトファジーの誘導率が低下した。

**【考察および結論】** 本研究では、D-アミノ酸を投与することでミトコンドリアマトリクス特異的に  $H_2O_2$  を產生する系を構築した。構築した本系を用いて、D-アミノ酸投与に伴う膜電位の低下や Parkin のミトコンドリアへの移行、マイトファジーの誘導が見られた。しかしながら、一定以上の濃度の D-アミノ酸を投与した際には Parkin の移行度やマイトファジーの誘導度が減少したことから、PINK1 を介した Parkin のミトコンドリア移行に対して、 $H_2O_2$  濃度依存的な影響が見られることが示唆された。今後、 $H_2O_2$  に酸化されるタンパクや ROS が関わる生命現象を明らかにする。

#### 【参考文献】

- 1) Narendra D, et al. J. Cell biol. (2008)
- 2) Lopez-Domenech G, et al. bioRxiv (2018)