

2018年3月

<海外文献紹介>

Rev1 contributes to proper mitochondrial function via the PARP-NAD⁺-SIRT1-PGC1 α axis.

NB Fakouri *et al.*

Sci Rep. 7, 12480, (2017).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28970491>

DNA 損傷修復が誘導されることで起こる DNA 複製（障害）ストレスが、ミトコンドリアエネルギー代謝を変化させることを報告したものです。データ内容と考察に若干の乏しさを感じましたので、誠に恐縮でございますが末尾に小生の考察も加えさせて頂きました。ご一読いただけましたら幸いです。

当論文では、損傷乗り越え型 DNA 合成酵素 Rev1 の欠損により、PARP1 依存性の DNA 損傷修復が誘導され DNA 複製ストレス状態となった MEF 細胞株およびマウス肝組織をもちいています。MEF 細胞と肝組織とでは部分的に異なる表現型が確認され、さらに雌雄差があったと報告しています。本論文では、その機序については全く検証しておらず、議論されておりませんでした。本論文紹介記事では、DNA 複製ストレスによるエネルギー代謝変動をより単純に議論する上で、ある程度十分な解析結果が示されていた MEF 細胞株の結果に焦点を当て紹介させて頂きます。

まず、Rev1 が核およびミトコンドリアに局在していることを確認した上で、Agilent Technologies (旧 Seahorse Bioscience) 社製の細胞外フラックスアナライザーによる酸素消費量解析を実施しています。一般的な結果表記と異なり、プロトン漏出量や非ミトコンドリア呼吸量が示されておらず、信憑性に欠けますが、筆者らは Rev1 欠損細胞では基礎呼吸量は高くなり、ATP 産生に依存した酸素消費量 (ATP 産生量) は上がったと報告しています。一方で、電子伝達活性のみに依存した酸素消費量変化 (予備呼吸量) は下がったと報告しています。同時に、Rev1 欠損細胞株ではミトコンドリア膜電位と ROS 産生量が増加したと報告しています。また、ATP 産生量は増加した一方で、細胞内 ATP 存在量が低下していたことから、Rev1 欠損細胞株では、ATP 消費量が増加しているのだろうと考察しています。

次に、一細胞当たり (核膜タンパク質 LaminB1 にて補正) の電子伝達鎖複合体 I (NDUFB8), II (SDHB), III (UQCRC2), IV (MTCO1) および ATP 合成酵素 (ATP5A)

の構成タンパク質存在量をウェスタンブロット法により解析しています。その結果、ATP 合成酵素に有意な変化は見られないが、電子伝達鎖複合体 I, II, III は有意に増加したと報告しています。この結果は、電子伝達活性のみに依存した酸素消費量（予備呼吸量）が減少したと矛盾しているように思われます。

さらに、電子顕微鏡により細長く断片化したミトコンドリア形態を観察し、ウェスタンブロット法によりミトコンドリアの分裂を促すリン酸化 DRP1 (Ser616)が穏やかに増加していることを確認しています。これに伴い、自食作用の最終段階で生成される LC3BII タンパク質量が増加していたことから、断片化したミトコンドリアがミトファジー（ミトコンドリア自食作用）の標的となっているだろうと考察しています。しかしながら、さらなる酸化ストレス刺激によるミトファジーの促進は誘導されなかったと報告しています。これは、AMPK 活性が誘導されないことが原因であったと、ウェスタンブロット法によるリン酸化 AMPK (Thr172)の定量結果から考察しています。

最後に、Rev1 欠損による DNA 損傷修復誘導とミトコンドリアエネルギー代謝変動を併せて考察するため、NAD⁺代謝に着目し、ウェスタンブロット法による解析をおこなっています。まず、NAD⁺を消費する PARP1 存在量が Rev1 欠損細胞株で増加していることを確認し、細胞内 NAD⁺の減少と共に Sirt1-PGC1a 存在量が低下していることを確認しています。さらに、ATP 存在量および Sirt1-LKB1-AMPK 活性の低下により Akt-mTOR シグナルが活性化し、SOD2 転写活性が低下することで、より酸化ストレス感受性を呈したと考察しています。

以上の結果から、当論文の著者らは、Rev1 欠損細胞では「PARP1 依存性 DNA 損傷修復の誘導→DNA 複製ストレスの惹起→NAD⁺存在量の低下→Sirt1-AMPK, PGC1a 活性の低下→ミトコンドリアエネルギー代謝の変動（低下？）・ストレス感受性の増加・自食作用（ミトファジー）の低下」が起きていると述べています。

以上が、当論文著者らの結語になります。本論文紹介記事では、筆者の勝手に(^_^)更に考察を追加させて頂きたいと思えます。著者らは、AMP アナログである AICAR を投与すると、基礎呼吸量や ATP 産生に依存した酸素消費量（ATP 産生量）は変化しないが、電子伝達活性のみに依存した酸素消費量変化（予備呼吸量）の変化（Rev1 欠損細胞では減少・コントロール細胞では増加）が増大すると報告しています。当論文で触れている Sirt1・AMPK・PGC1a 活性の低下では説明できないミトコンドリアエネルギー代謝活性および調節機構が存在することを意味しています。さらに著者らは、

Rev1 欠損細胞株は呼吸鎖（特にフラボタンパク質）依存性の酸化剤として知られるメナジオンに対し高感受性を示すこと、および電子伝達系複合体 I の阻害剤ロテノンの投与によりリン酸化 DRP1 (Ser616)を増加させ、ミトコンドリアの断片化を著しく促進することを示しています。すなわち、Rev1 欠損細胞株は複合体 I と II の阻害剤に対して著しく高い感受性を呈すことを報告しています。

これらの結果を踏まえ、「ミトコンドリアエネルギー代謝の低下あるいはその障害」と単純に表記した結論は相応しくないことを指摘しておきたいと思います。最近、ミトコンドリア電子伝達系には脂肪酸代謝を中心に *de novo* 合成や NAD⁺ 産生を促進する Reverse electron transport（複合体 II-I 電子伝達鎖）が存在していることが報告されており、当論文ではこれらのエネルギー代謝を検証すべきであったことを指摘させて頂き、本論文紹介記事を終了させて頂きたいと思います。最後までお読みいただき有難うございました。

（文責：石井恭正）