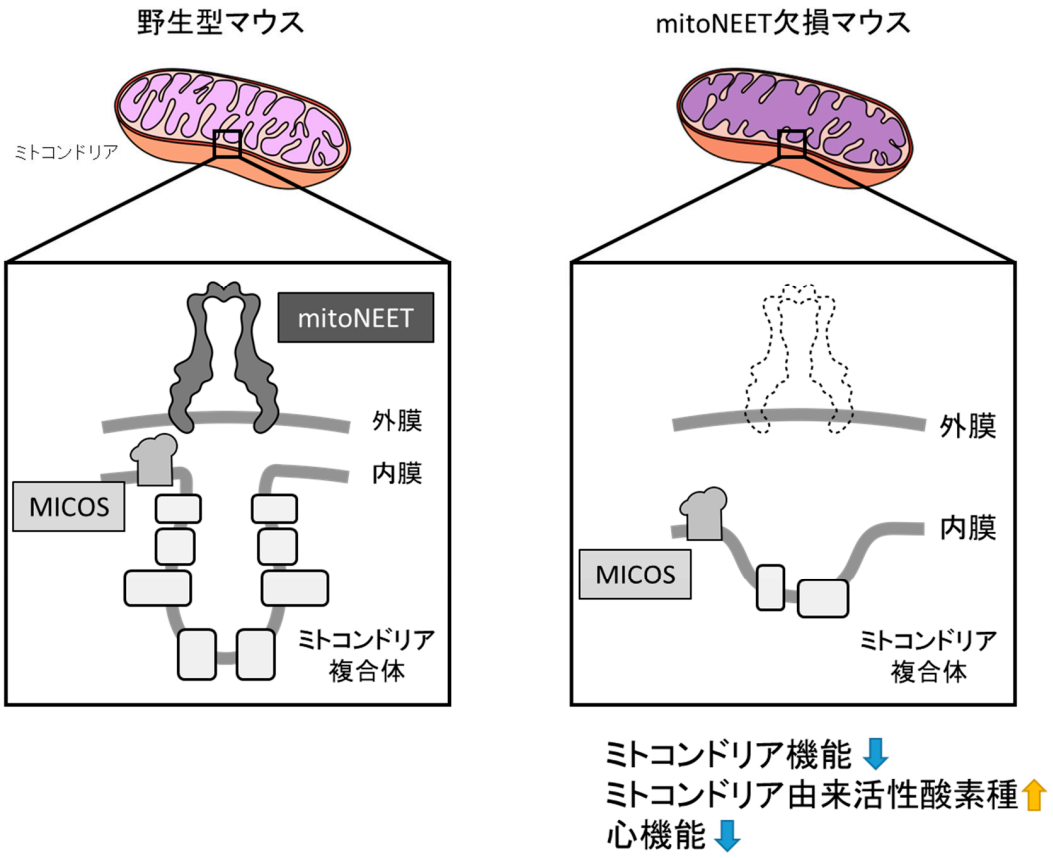
176　mitoNEETによるミトコンドリア形態・機能制御の機序解明	髙田　真吾

【目的】心不全の病態基盤は、心筋細胞肥大・細胞死や間質線維化からなる心筋リモデリングであるが、その形成・進展には心筋細胞ミトコンドリアの機能不全・酸化ストレスの亢進が密接に関与している。mitoNEET はミトコンドリア外膜に存在し、ミトコンドリアのエネルギー産生を調整すると報告されているが、その制御方法については明らかではない。

【方法および結果】そこで本研究はミトコンドリアの構造・機能制御における mitoNEET の役割を解明することを目的とした。その結果、mitoNEET（*Cisd1*）の欠損マウスの心筋ミトコンドリアの形態は電子顕微鏡画像から崩壊することがあきらかとなった。同様に、ミトコンドリア機能（高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置）、複合体（BN-PAGE）の発現レベルは低下、活性酸素種の産生は増加し、それらに伴い、心機能（心エコー）は低下した。mitoNEET はクリステ構造維持のために重要な MICOS 複合体の構成タンパクとの相互作用（質量分析および免疫沈降法）があることを見出した。mitoNEET はミトコンドリアの形態を制御することで機能および活性酸素種の産生を制御しうることが考えられる。ミトコンドリア形態および機能障害における mitoNEET の役割が明らかとなれば、心不全の形成・進展の分子機序に関する理解がさらに一層深まることが期待される。

mitoNEET によるミトコンドリア形態・機能制御機



176. mitoNEET によるミトコンドリア形態・機能制御の機序解明

髙田　真吾

*北海道大学 大学院医学研究科 循環病態内科学

Key words：クリステ構造，ミトコンドリア由来活性酸素種，心不全，ミトコンドリア内膜複合体

緒　言

心不全の病態基盤は、心筋細胞肥大・細胞死や間質線維化からなる心筋リモデリングであるが、その形成・進展には心筋細胞ミトコンドリアの機能不全・酸化ストレスの亢進が密接に関与している［1］。

mitoNEET は、ミトコンドリア外膜に局在し, 糖尿病治療薬であるピオグリタゾンの標的蛋白として同定された［2］。このタンパクは、ミトコンドリアに存在すること、またそのアミノ酸配列 Asn-Glu-Glu-Thr（N-E-E-T）より命名された。mitoNEET はミトコンドリア外膜に存在する膜貫通型タンパクであるが、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生を調整することが報告されている［2, 3］。さらには、全身の mitoNEET 欠損マウスにおいて、ADP 依存的なミトコンドリア呼吸能が低下していることが報告された［2］。しかしながら、そのミトコンドリア機能制御方法については明らかではない。

最近、ミトコンドリア内膜のクリステ内膜の襞構造を裏打ちする mitochondrial contact site and cristae organizing system（MICOS）複合体と外膜の間の直接的な相互作用が注目されており、ミトコンドリアの形態と機能の間に強い関連があることが示唆され、クリステは必要に応じてその形態を変化させることが知られている［4］。実際に、クリステ構造の変化と一致して、ミトコンドリア呼吸鎖タンパク複合体同士の複合体である supercomplex の形成・分解が起こる。特に、supercomplex の分解は活性酸素種（ROS）産生の増加や呼吸能の低下を引き起こす［5］。本研究の目的は、mitoNEET 欠損に起因するミトコンドリア形態制御の破綻が、呼吸能低下や酸化ストレスを介してミトコンドリア機能障害を引き起こし、心筋機能に関与するという仮説を検証するものである。

方　法

1. 心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスの作製

全身の mitoNEET の欠損はミトコンドリア機能を低下させる可能性が示唆されていた［2］。そこで、我々は心筋における mitoNEET の役割を詳細に解析するため、Cre-loxP システムを用いて心筋特異的な mitoNEET（*Cisd1*）ノックアウト（cKO）マウスを作製した。

2. mitoNEET ノックアウトマウスの表現型解析

野生型（WT）と mitoNEET cKO マウスを用いて、ミトコンドリアの形態（電子顕微鏡、ブルーネイティヴゲル電気泳動法（BN-PAGE））・呼吸能および過酸化水素による ROS（高感度ミトコンドリア呼吸能測定器、Oxygraph-O2k）および心機能（心エコー）における影響を比較、検討した［6, 7］。

3. mitoNEET と内膜タンパクとの相互作用の解析

mitoNEET がミトコンドリア内膜蛋白と複合体を形成しているかを特定するため、mitoNEET の過剰発現系の細胞に免疫沈降・銀染色・質量分析を用いて解析した［6, 7］。

*現在の所属：北海道大学 大学院医学研究院 循環病態内科学教室

結　果

mitoNEET cKO の各組織の mitoNEET タンパク発現レベルを検討したところ、心筋特異的に欠損していることを確認した。

mitoNEET cKO マウスを用いて行った検討の結果、心臓ミトコンドリアにおける微細構造の解析において、ミトコンドリアが膨潤しクリステ構造が崩壊していることを見出した（図 1）。

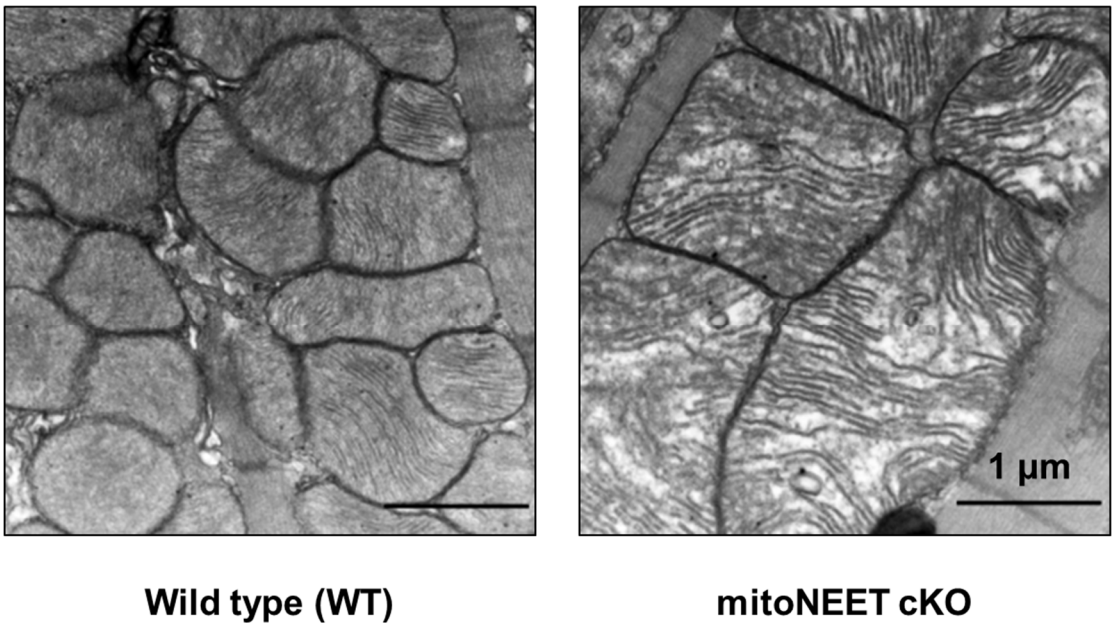


図 1. WT（左）および mitoNEET cKO 群（右）における代表的な心筋ミトコンドリアの電子顕微鏡像

クリスタ構造の崩壊と一致して、BN-PAGE 解析によるミトコンドリア複合体レベルが低下していることがわかった（図 2）。また、mitoNEET cKO マウスにおける心筋はミトコンドリア機能不全が生じていた。同様に、mitoNEET cKO マウスにおいて、心筋ミトコンドリア由来 ROS が上昇していた。さらに、mitoNEET cKO マウスは心機能不全に陥っていた。

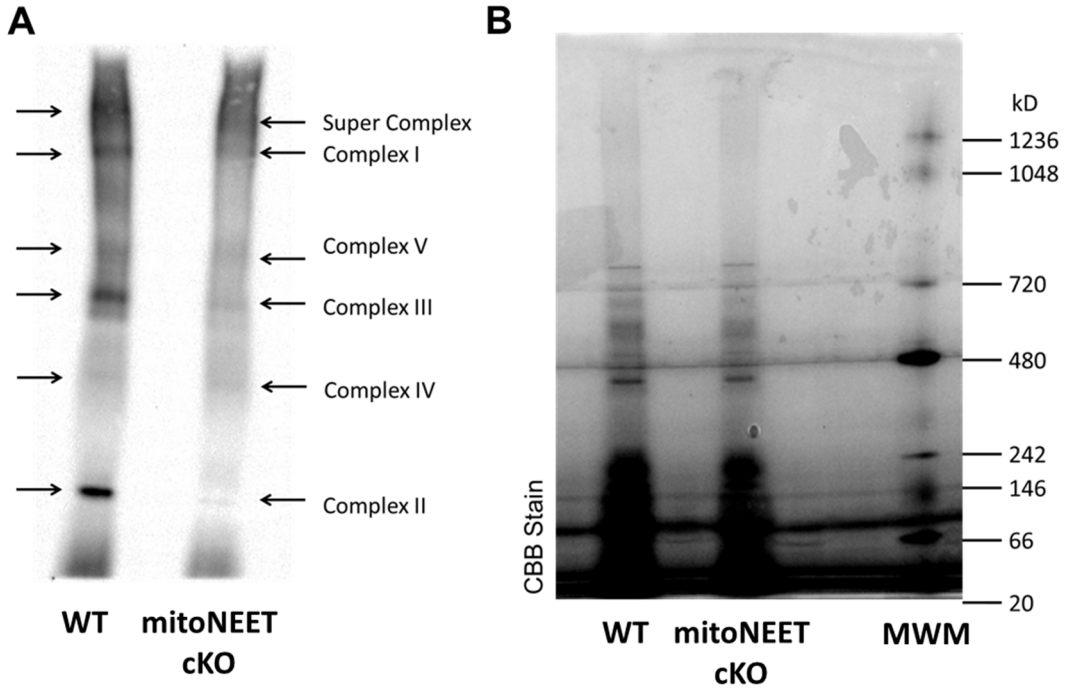


図2. ブルーネイティヴ電気泳動法によるミトコンドリア複合体の免疫ブロッド(A)
およびCBB染色による総タンパク量（B）

mitoNEETがクリステ構造維持のために、どのタンパクと複合体を形成しているかを特定するため、mitoNEETの過剰発現系の細胞に免疫沈降を行い、相互作用のある蛋白に対して質量分析を行った。その結果から、ミトコンドリア内膜に存在し、クリステ構造に関連のあるMICOS複合体の構成タンパクとの相互作用を確認した。

考　察

本研究により、mitoNEET が欠損すると、ミトコンドリアの形態の異常が起こるとともに、ミトコンドリアの機能低下およびROS の上昇することがわかった。それらと一致して、心機能は低下した。また、mitoNEET はミトコンドリアのクリステ構造に重要な MICOS 複合体の構成タンパクと相互作用があった。

MICOS 複合体の構成タンパクの欠損により、ミトコンドリア形態が崩壊し、ミトコンドリア膜電位および細胞内ATP レベルが低下することが報告されている［8］。したがって、mitoNEET はMICOS 複合体の構成タンパクと関連することで、ミトコンドリアの形態を制御することで機能およびROS を制御することが考えられる。ミトコンドリア形態および機能障害における mitoNEET の役割が明らかとなれば、心不全の形成・進展の分子機序に関する理解がさらに一層深まることが期待される。さらに、ミトコンドリア機能障害は加齢や癌・糖尿病・神経変性疾患など数多くの疾患の病態形成に関与することが明らかにされており、本研究の成果は幅広い疾患の予防・治療の開発に寄与する新たなパラダイムをもたらすと期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学の絹川真太郎、降旗高明、前川聡である。本稿を終えるにあたり、本研究に多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

1) Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Dec;301(6):H2181-90. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21949114 DOI: 10.1152/ajpheart.00554.2011

2) Wiley SE, Murphy AN, Ross SA, van der Geer P, Dixon JE. MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 27;104(13):5318-23. Epub 2007 Mar 21. PMID: 17376863 DOI: 10.1073/pnas.0701078104

3) Holland WL, Sun K, Park J, Spurgin SB, Lin Y, Askew GR, Simcox JA, McClain DA, Li C, Scherer PE. MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. Kusminski CM. Nat Med. 2012 Oct;18(10):1539-49. Epub 2012 Sep 9. PMID: 22961109 DOI: 10.1038/nm.2899

4) Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. Trends Biochem Sci. 2016 Mar;41(3):261-273. doi: 10.1016/j.tibs.2016.01.001. Epub 2016 Feb 6. PMID: 26857402 DOI: 10.1016/j.tibs.2016.01.001

5) Cogliati S1, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, Cipolat S, Costa V, Casarin A, Gomes LC, Perales-Clemente E, Salviati L, Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. Cell. 2013 Sep 26;155(1):160-71. PMID: 24055366 DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.032

6) Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba I, Nagashima S, Yanagi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Tsutsui H, Hatakeyama S. The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 2016 Nov;100:43-53. Epub 2016 Sep 25. PMID: 27677939 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.09.013

7) Takada S, Masaki Y, Kinugawa S, Matsumoto J, Furihata T, Mizushima W, Kadoguchi T, Fukushima A, Homma T, Takahashi M, Harashima S, Matsushima S, Yokota T, Tanaka S, Okita K, Tsutsui H. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of glucagon-like peptide-1 receptor signalling. Cardiovasc Res. 2016 Sep;111(4):338-47. PMID: 27450980 DOI: 10.1093/cvr/cvw182

8) Ding C, Wu Z, Huang L, Wang Y, Xue J, Chen S, Deng Z, Wang L, Song Z, Chen S. Mitofilin and CHCHD6 physically interact with Sam50 to sustain cristae structure. Sci Rep. 2015 Nov 4;5:16064. PMID: 26530328 DOI: 10.1038/srep16064