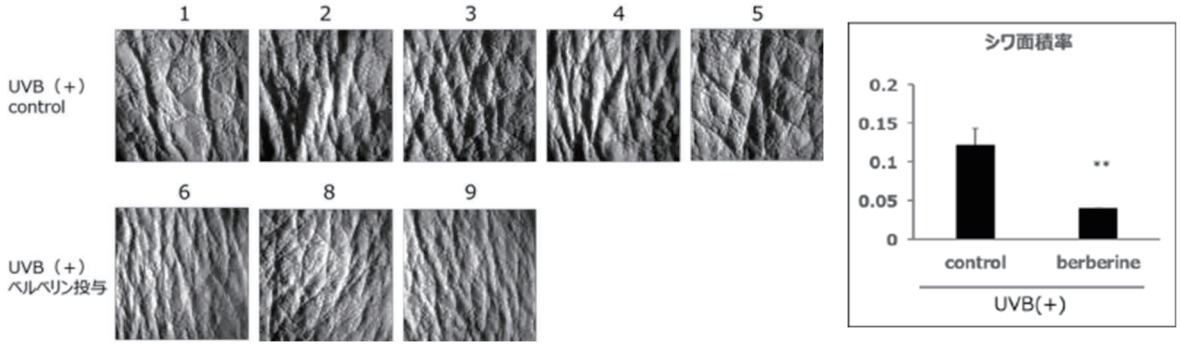
46　ミトコンドリア賦活剤の開発	柳　茂

【目的】MITOL はミトコンドリア外膜に局在する膜型 E3 ユビキチンリガーゼであり、ミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たしている。皮膚組織特異的 *MITOL* 欠損マウスを作製したところ、生後 6 ヶ月頃から肉眼的に白髪・脱毛・皮膚炎症が観察され、病理組織解析においても皮脂腺の増加・表皮の肥厚・細胞死の増加など顕著な老化所見が観察された。また、正常のマウス皮膚組織においても MITOL の発現が老化と共に有意に減少することより、MITOL の発現低下は活性酸素の産生を誘導し老化を引き起こしていることが示された。そこで、本研究では MITOL 発現を上昇させる薬剤を探索することにより、ミトコンドリアを標的にした新たな創薬を目指す。

【方法】1. 表皮角化細胞に対する *MITOL* 遺伝子発現上昇作用素材の評価 : ヒト表皮角化細胞を、被験物質を含有する培地に交換し 24 時間培養した。リアルタイム PCR システムにより、GAPDH、MITOL のそれぞれの mRNA の発現量を測定し、MITOL の発現量を GAPDH 発現量により補正した。測定した mRNA 発現量を Control 群と比較し、被験物質による *MITOL* 遺伝子の発現の影響を評価した。2. マウスへのベルベリン投与による MITOL 発現促進作用の評価 : ベルベリン塩酸塩を、純水を用いて 0.2%（w/v）に溶解し、9 日間または 8 週間自由摂水させた。ベルベリン非投与群には純水を自由摂水させた。8 週間の自由摂水後、マウス耳を採取した。心臓・脳・骨格筋サンプルの採取は 9 日間の自由摂水後、臓器を摘出した。それぞれの臓器における MITOL 発現量をウェスタンブロット法にて解析した。3. 紫外線照射ヘアレスマウスへのベルベリン投与による影響評価 : 紫外線照射は、UVB（1 週目 : 70 mJ、2 週目 : 80 mJ、3 週目 : 90 mJ、4 週目以降 : 100 mJ）、3 回／週の照射を行った。8 週の照射完了後に皮膚組織をカミソリで 5 mm 幅に切り分け、パラフィンで包埋した。レプリカ解析は、UVB 照射時に週一回及び 8 週間の UVB 照射後、反射用レプリカ作製キットを用いてレプリカを採取した。レプリカ画像の取得及び解析には反射用レプリカ解析システムを用いた。

【結果】1. 表皮角化細胞に対する *MITOL* 遺伝子発現上昇作用素材の評価 : 表皮角化細胞の *MITOL* 遺伝子発現上昇素材として、コメヌカ発酵エキス、オウバク抽出液、オウレン抽出液、センブリ抽出液、ハマメリス抽出液、ボタンピ抽出液、モモ抽出液などの 12 種が見出された。2. マウスへのベルベリン投与による MITOL 発現促進作用の評価 : 各種組織のウェスタンブロット及びバンドを定量化した。マウスにベルベリン塩酸塩を投与することにより、ベルベリン非投与群（control）と比較して MITOL のタンパク発現量が有意に上昇することが確認された。3. 紫外線照射ヘアレスマウスへのベルベリン投与による影響評価 : 紫外線照射 8 週間後の外観写真、レプリカ写真、レプリカ解析結果を示す（下図）。レプリカ解析により、control 群と比較してベルベリン投与群においてシワの形成が有意に抑制されていることが確認された。以上のことから、ミトコンドリア賦活剤としてベルベリンは有望であると思われる。一方、ベルベリンには抗炎症作用があることも知られているので、本当に MITOL の発現増加を介して作用したかどうかは不明である。今後、*MITOL* 欠損マウスにベルベリンを投与して今回の効果が消失するかどうか判定することが必要である。

レプリカ写真とシワ面積率の比較



46. ミトコンドリア賦活剤の開発

柳　茂

学習院大学 理学部 生命科学科 分子生化学

Key words：ミトコンドリア，老化，MITOL，アンチエイジング創薬

緒　言

ミトコンドリアから発生する活性酸素はさまざまな臓器・組織の老化を促進することが知られているが、ミトコンドリアによる活性酸素の発生を制御する分子メカニズムは未だよくわかっていない。私たちはミトコンドリアの外膜に局在する酵素の一つである E3 ユビキチンリガーゼを世界に先駆けて発見し、MITOL と命名した。MITOL はミトコンドリアの分裂因子である Drp1 や融合因子である Mfn2 を基質にしてミトコンドリアの形態の維持と制御に関与していることを世界で初めて報告した［1］。その後、MITOL はミトコンドリア膜上において変性タンパク質の分解を誘導して、ミトコンドリアの品質管理を行っていることを示した［2，3］。また、ミトコンドリアは MITOL を介して一酸化窒素による微小管の過剰な安定化を抑制する役割があることを見出した［4］。さらに、MITOL は小胞体とミトコンドリアの接着領域である MAM において Mfn2 を活性化して MAM の形成を誘導する役割があることや MAM において小胞体ストレスを制御していることなど報告した［5〜7］。このように MITOL はミトコンドリア外膜上での様々なシグナル伝達機構を担う重要な役割をしていることを次々に明らかにしてきた。さらに、MITOL が神経変性疾患や心不全などの老化関連疾患に密接に関連していることが示された［8〜10］。そこで、老化所見が観察されやすい皮膚組織においてケラチノサイト特異的に *MITOL* 欠損マウスを作製した。その結果、生後 6 ヶ月頃から肉眼的に白髪・脱毛・皮膚炎症が観察され、病理組織解析においても皮脂腺の増加・表皮の肥厚・細胞死の増加など顕著な老化所見が観察された。正常のマウス皮膚組織においても MITOL の発現が老化と共に有意に減少することより、MITOL の発現低下は活性酸素の産生を誘導し老化を引き起こしている可能性が強く示唆された。本研究は、MITOL 発現を上昇させる薬剤を探索することにより、ミトコンドリアを標的にした新たな創薬を目指したものである。

方法及び結果

1. 表皮角化細胞に対する *MITOL* 遺伝子発現上昇作用素材の評価

ヒト表皮角化細胞を被験物質含有培地に交換し 24 時間培養した。リアルタイム PCR システムにより、GAPDH、MITOL それぞれの mRNA の発現量を測定し、MITOL の発現量を GAPDH 発現量により補正した。測定した mRNA 発現量を Control 群と比較し、被験物質による *MITOL* 遺伝子発現上昇作用を評価した。

表皮角化細胞の *MITOL* 遺伝子発現上昇素材として、コメヌカ発酵エキス、オウバク抽出液、オウレン抽出液、センブリ抽出液、ハマメリス抽出液、ボタンピ抽出液、モモ抽出液、ユーカリ抽出液、β-エストラジオール、5-アミノレブリン酸、β-ニコチンアミドモノヌクレオチド及びリボフラビンの 12 種が見出された（図 1）。

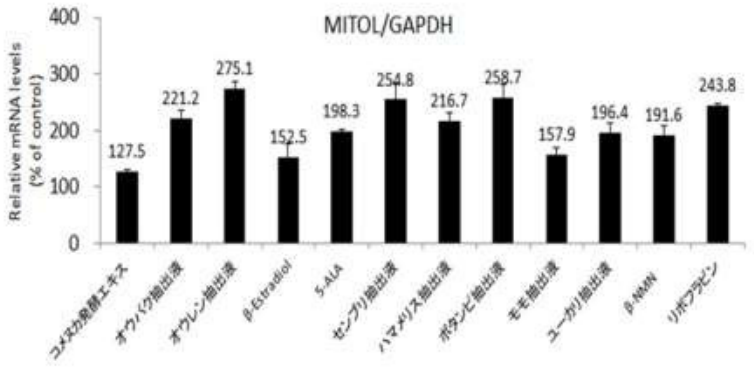


図 1. *MITOL* 遺伝子発現上昇作用素材の評価

ヒト表皮角化細胞を表記の被験物質を含有した培地に交換し 24 時間培養した。リアルタイム PCR システムにより、GAPDH、MITOL それぞれの mRNA の発現量を測定し、MITOL の発現量を GAPDH 発現量により補正し、測定した mRNA 発現量を Control 群と比較した。

2. マウスへのベルベリン投与による MITOL 発現促進作用の評価

C57BL/6J（SLC、雄性、8 週齢）を購入し、食餌は標準固形飼料 CE-2（オリエンタル酵母工業）を自由摂食させ、純水を自由摂水させた。紫外線照射実験においては、Hos:HR-1（SLC、雄性、8 週齢）を用いた。TP-102（東洋理工株式会社）マウスケージにて飼育し、床敷にはクリーンチップ CL-4161（SLC）を使用した。飼育環境は、室温を 25±2℃とし、明期を 7～19 時とした。ベルベリン塩酸塩を、純水を用いて 0.2%（w/v）に溶解し、9 日間または 8 週間自由摂水させた。尚、ベルベリン非投与群には純水を自由摂水させた。8 週間の自由摂水後、マウス耳を採取し、Dispase Ⅱ（Thermo Fisher Scientific）により表皮を分取した後、SDS Sample Buffer を加え超音波処理（BRANSON SONIFIR 150）を行った。95℃、5 分間のヒートショックを行い、12,000 rpm、4℃で 10 分間遠心した上清をタンパク質溶液として得た。心臓・脳・骨格筋サンプルの採取は 9 日間の自由摂水後、マウスをイソフルラン吸引麻酔下で開胸し、臓器を摘出した。臓器の重さを電子天秤により測定し、1 mg/30 μ L になるように SDS Sample Buffer を加え超音波処理（BRANSON SONIFIR 150）を行った。95℃、5 分間のヒートショックを行い、12,000 rpm、4℃で 10 分間遠心した上清をタンパク質溶液として得た。

各種組織のウェスタンブロット及びバンドを定量化した結果を示す（図 2）。3 例（脳）又は 6 例（心臓、骨格筋、表皮）の平均値±標準偏差を示した。マウスにベルベリン塩酸塩を投与することにより、ベルベリン非投与群（control）と比較して MITOL のタンパク発現量が有意に上昇することが確認された。

3. 紫外線照射ヘアレスマウスへのベルベリン投与による影響評価

紫外線照射は、UV Bench Lamp、15 W、xx-15M、302 nm、115 V（UVP）を使用し、UVX Radiometer（Digital）を使用し線量を確認した。単匹飼育を行い、UVB（1 週：70 mJ、2 週目：80 mJ、3 週目：90 mJ、4 週目以降：100 mJ）、3 回／週の照射を行った。8 週の照射が完了後に表皮のサンプルを回収した。ベルベリン投与は方法および結果 2 と同様の方法で実施した。尚、紫外線照射群、非照射群ともに紫外線照射期間にベルベリンを投与した。レプリカ解析は、UVB 照射時に週一回および 8 週間の UVB 照射後、麻酔下にて反射用レプリカ作製キットを用いてレプリカを採取した。レプリカ画像の取得及び解析には反射用レプリカ解析システムを用いた。パラフィンブロック作製は、10%中性緩衝ホルマリン液にて 1 日固定後、流水で洗浄、70%エタノールに浸漬させた。皮膚組織はカミソリで 5 mm 幅に切り分け、自動固定包埋装置 Vip-5-Jr を用いてパラフィンに包埋させた。表皮厚さの画像解析は、キーエンス BZ-H3A/解析アプリケーションを使用した。表皮厚さの測定には BZ-H3M/計測モジュールを使用した。切片の任意 3 点の厚みの平均値を算出した。

紫外線照射 8 週間後の外観写真、レプリカ写真、レプリカ解析結果を示す（図 3）。外観、レプリカ写真より、control 群においてベルベリン投与群よりも深いシワの形成が進んでいることが確認された。実際にレプリカ解析によりシワの分布を解析したところ、ベルベリン投与群において経時的にシワ面積率の低下が認められた（図 3、4）。

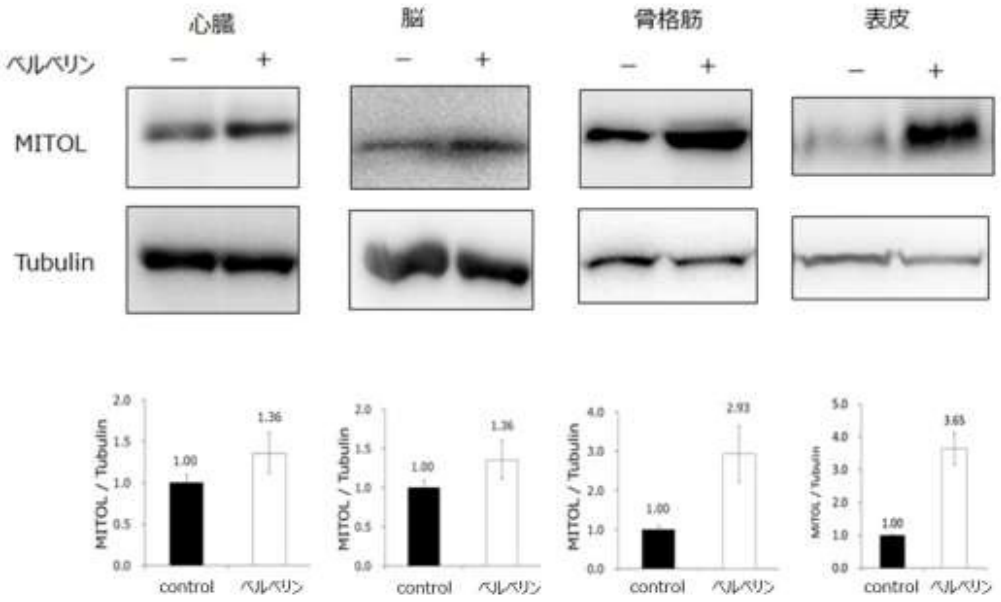


図 2. 各種組織における MITOL 発現量の評価

ベルベリン塩酸塩を、純水を用いて 0.2%（w/v）に溶解し、マウスに自由摂水させた。表皮サンプルは 8 週間の自由摂取後にサンプル化し、その他の心臓・脳・骨格筋サンプルの採取は 9 日間の自由摂水後に臓器を摘出した。各種組織の MITOL の発現をウェスタンブロットで解析し、各バンドを定量化した結果を下に示した。

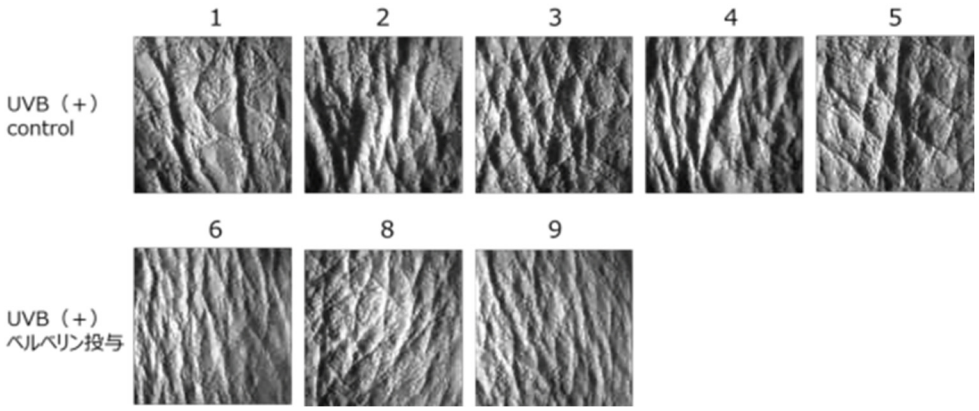


図 3. レプリカ写真（紫外線照射 8 週間後）

マウスを単匹飼育し、未刺激（コントロール）および UVB（1 週目：70 mJ、2 週目：80 mJ、3 週目：90 mJ、4 週目以降：100 mJ）、3 回／週の照射を行い、8 週後に表皮組織をサンプル化した。ベルベリン投与は図 2 と同様の方法で実施した。反射用レプリカ解析システムを用いて表皮のレプリカ画像を取得した。

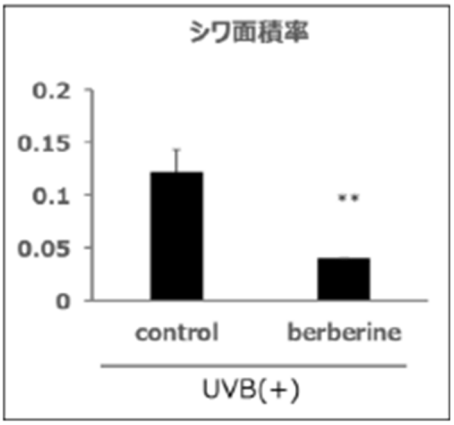


図 4. シワ面積率の比較（紫外線照射 8 週間後）
反射用レプリカ解析システムを用いてレプリカ画像の定量解析を行った。レプリカ解析によりコントロール群においてベルベリン投与群においてシワ面積率の低下が認められた（**p＜0.01、t-test）。

考　察

皮膚の MITOL 発現低下により、皮膚老化が誘導されることから、MITOL 発現を増加する素材を見出せれば、アンチエイジングに有用であると考えた。これまでに MITOL 発現を増加する素材は見出されていない。本研究では、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞を用いて、*MITOL* 遺伝子発現を指標とし、素材評価を実施した。表皮角化細胞では 12 種の素材、真皮線維芽細胞では 15 種の素材に *MITOL* 遺伝子発現を増加する作用を見出した。その中でもオウレン、オウバク、ボタンピの抽出液をマウスに投与することで、表皮組織だけでなく他の組織の MITOL の発現を増加することを確認した。オウレン、オウバクが含有する主成分がベルベリンであったことから、ベルベリンをマウスへ投与すると、表皮、心臓、脳、骨格筋中の MITOL 発現増加が認められた。さらに、ベルベリンを紫外線照射したヘアレスマウスへ投与すると、紫外線照射によるシワ形成が有意に抑制されたことから、ミトコンドリア賦活剤としてベルベリンは有望であると思われる。一方、ベルベリンには抗炎症作用があることも知られているので、本当に MITOL の発現増加を介して作用したかどうかは不明である。今後、*MITOL* 欠損マウスにベルベリンを投与して今回の効果が消失するかどうか判定することが必要である。

共同研究者・謝辞

本研究遂行にあたり、多大な貢献いただいた自治医科大学の徳山剛士博士に感謝する。

文　献

1） Yonashiro R, Ishido S, Kyo S, Fukuda T, Goto E, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Sada K, Hotta H, Yamamura H, Inatome R, Yanagi S. A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. EMBO J. 2006 Aug 9;25(15):3618-26. Epub 2006 Jul 27. PMID: 168743 doi: 10.1038/sj.emboj.7601249.01

2） Yonashiro R, Sugiura A, Miyachi M, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Ogata Y, Suzuki T, Dohmae N, Yanagi S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. Mol Biol Cell. 2009 Nov;20(21):4524-30. Epub 2009 Sep 9. PMID: 19741096 doi: 10.1091/mbc.e09-02-0112.

3) Sugiura A, Yonashiro R, Fukuda T, Matsushita N, Nagashima S, Inatome R, Yanagi S. A mitochondrial ubiquitin ligase MITOL controls cell toxicity of polyglutamine-expanded protein. Mitochondrion. 2011 Jan;11(1):139-46. Epub 2010 Sep 17. PMID: 20851218 doi: 10.1016/j.mito.2010.09.001.
4) Yonashiro R, Kimijima Y, Shimura T, Kawaguchi K, Fukuda T, Inatome R, Yanagi S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL blocks S-nitrosylated MAP1B-light chain 1-mediated mitochondrial dysfunction and neuronal cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 14;109(7):2382-7. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22308378 doi: 10.1073/pnas.1114985109.
5) Sugiura A, Nagashima S, Tokuyama T, Amo T, Matsuki Y, Ishido S, Kudo Y, McBride HM, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Yanagi S. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. Mol Cell. 2013 Jul 11;51(1):20-34. Epub 2013 May 30. PMID: 23727017 doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.023.
6) Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Uda A, Tokuyama T, Ito N, Fukuda T, Matsushita N, Ishido S, Iwawaki T, Uehara T, Inatome R, Yanagi S. MITOL prevents ER stress-induced apoptosis by IRE1α ubiquitylation at ER-mitochondria contact sites. EMBO J. 2019 Aug 1;38(15):e100999. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31368599 doi: 10.15252/embj.2018100999.
7) Nagashima S, Takeda K, Ohno N, Ishido S, Aoki M, Saitoh Y, Takada T, Tokuyama T, Sugiura A, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Yanagi S. MITOL deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress. Life Sci Alliance. 2019 Aug 15;2(4):e201900308. Print 2019 Aug. PMID: 31416892 doi: 10.26508/lsa.201900308.
8) Takeda K, Uda A, Mitsubori M, Nagashima S, Iwasaki H, Ito N, Shiiba I, Ishido S, Matsuoka M, Inatome R, Yanagi S. Mitochondrial ubiquitin ligase alleviates Alzheimer's disease pathology via blocking the toxic amyloid-β oligomer generation. Commun Biol. 2021 Feb 12;4(1):192 PMID: 33580194 . doi: 10.1038/s42003-021-01720-2.
9) Shiiba I, Takeda K, Nagashima S, Ito N, Tokuyama T, Yamashita SI, Kanki T, Komatsu T, Urano Y, Fujikawa Y, Inatome R, Yanagi S. MITOL promotes cell survival by degrading Parkin during mitophagy. EMBO Rep. 2021 Mar 3;22(3):e49097. Epub 2021 Feb 10. PMID: 33565245 doi: 10.15252/embr.201949097.
10) Tokuyama T, Uosaki H, Sugiura A, Nishitai G, Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Ito N, Amo T, Mohri S, Nishimura A, Nishida M, Konno A, Hirai H, Ishido S, Yoshizawa T, Shindo T, Takada S, Kinugawa S, Inatome R, Yanagi S. Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drp1 regulation. iScience. 2022 Jun 11;25(7):104582. eCollection 2022 Jul 15. PMID: 35789860 doi: 10.1016/j.isci.2022.104582.