

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15073

研究課題名(和文)ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の細胞、生体、病態における作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of physiological and pathophysiological functions of mitochondria supercomplex

研究代表者

池田 和博 (IKEDA, Kazuhiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30343461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの呼吸活性はあらゆる細胞、組織において重要な役割を担っており、その機能障害は様々な病態に関連していると考えられている。我々はミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成を促進するCOX7RPを初めて報告したが、このようなミトコンドリア呼吸鎖超複合体の制御に関わる因子はほとんど解明されていない。本研究では、COX7RPをはじめとするミトコンドリア呼吸機能に関わる因子の発現解析、siRNAなどを用いた機能解析を行い、細胞周囲環境における制御機構を解析した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial respiration plays an important role in cells and its dysfunction is assumed to be involved in various diseases. We reported that COX7RP promotes the assembly of mitochondrial supercomplexes; however, the regulation and function of supercomplexes remains to be elucidated. In this study, expressional and functional analyses of COX7RP and other mitochondria-related factors were investigated in terms of cellular environment.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア 呼吸鎖 超複合体

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアで行われる細胞呼吸は細胞が活動するために必要なエネルギー(ATP)を供給する重要な役割を担っている。ミトコンドリア呼吸鎖は複合体 I、II、III、IV からなり、電子伝達によって形成されたプロトン勾配を利用してATP合成酵素(複合体 V)がATPを産生する。これまでは、それぞれの呼吸鎖複合体はミトコンドリア内膜に散在して存在し、複合体間を電子伝達体が自由拡散する作用モデルが考えられていた。しかし、最近のミトコンドリア解析技術の進歩により、呼吸鎖複合体のうちプロトン輸送能をもつ複合体 I、III、IV が超複合体を形成していることが明らかにされた。さらに、この超複合体の形成過程は、複合体 I、III、IV の構成サブユニットが複雑な工程で会合するものであることが判明した。超複合体は、電子授受を効率的に行うことができ、エネルギー産生の増強を行うと考えられている。しかしながら、超複合体の形成過程の詳細なメカニズムならびに細胞特異性や細胞周囲環境などによる影響に関してはほとんど明らかになっておらず、ミトコンドリアが関与する様々な細胞機能、生理機能、疾患などとの関係の解明は未開拓の研究領域である。申請者は、新規エストロゲン受容体標的遺伝子について探索を行い、細胞周期制御に関わる Efp に加えて、ミトコンドリア呼吸鎖のチトクローム c オキシダーゼ(COX)7a と構造が類似した COX7RP 遺伝子を同定した()。COX7RP はミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体形成を促進する因子であることを世界に先駆けて発見し、ATP 産生量を増加させることを見出した()。COX7RP 遺伝子改変マウスの解析から、COX7RP は骨格筋の運動に必要なエネルギー産生に関わること、ならびに褐色脂肪組織での熱産生に重要な役割を担っていることを解明した。このような研究背景の下、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体は様々な細胞機能、生体における生理作用、疾患などに関与すること、ならびに、超複合体の制御因子が COX7RP の他にも存在することが想定され、未解明の部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

ミトコンドリアの呼吸活性はあらゆる細胞、組織において重要な役割を担っており、その機能障害はミトコンドリア病を含む、循環器障害、生活習慣病、脳機能障害、がん、老化など様々な病態に関連していると考えられている。我々は、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成を促進する COX7RP を初めて報告したが、このようなミトコンドリア呼吸鎖超複合体の制御に関わる因子はほとんど解明されていない。本研究は、COX7RP をはじめとするミトコンドリア呼吸機能に関わる因子の発現解析、siRNA などを用いた機能解

析を行い、呼吸鎖超複合体の制御機構を解明し、培養細胞系と COX7RP 遺伝子改変マウスを用いた生体モデルを活用して検証し、超複合体と細胞機能ならびに疾患との関連を解き明かすことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、我々が解明したミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成に関わる因子である COX7RP に着目した。COX7RP はエストロゲン標的遺伝子の1つとして同定されたが、最近、ミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体形成を促進する因子であり、細胞における呼吸活性の亢進とエネルギー(ATP)産生の増大に関わることを明らかにした()。COX7RP 遺伝子改変マウスの解析から、COX7RP は骨格筋の運動に必要なエネルギー産生に関わること、ならびに褐色脂肪組織での熱産生に重要な役割を担っていることを解明しており、本研究の解析に活用した。また、ミトコンドリア関連遺伝子をはじめとして、各種組織、培養細胞株ならびにホルモン欠乏、低酸素などの細胞周囲環境における変化を解析した。

4. 研究成果

複数の培養細胞株からミトコンドリア分画を調整した。また、これらの細胞に対して、低酸素などの処理を行って同様にミトコンドリア分画を調整した。これらのミトコンドリアを可溶化剤で処理した後、Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE)による2次元電気泳動を行い、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成などを解析した。COX7RP 遺伝子改変マウスの骨格筋、脳などの各組織よりミトコンドリア分画を調整し、同様にBN-PAGEを用いて解析し、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成を解析した。COX7RP と結合する因子の解析として、免疫沈降法を用いて電子伝達系のサブユニットとの結合を検討した。

また、マウスにおいてホルモン欠乏と運動負荷におけるミトコンドリアの役割を解析するため、卵巣除去した後、溶媒のみを投与した OVX + V 群、卵巣除去した後、エストロゲンを投与した OVX + E 群、それらのコントロールマウス(偽手術 Sham + V 群)を作製した。術後2週間後よりトレッドミル走行実験による運動持続能の評価を行った。試験終了後に骨格筋などの各種組織をサンプリングした。その結果、OVX + V 群は Sham + V 群と比較して走行持続時間が有意に短縮し、OVX + E 群は走行持続時間の回復を認めた。遅筋の代表的なものであるヒラメ筋を用いて遺伝子発現解析を施行したところ、骨格筋で発現優位なミトコンドリアの脱共役タンパク質の1つである Uncoupling protein3 (UCP3)が、エストロゲン応答性に発現抑制されることが明らかになった。これらのことよ

り、エストロゲンは骨格筋における UCP3 の発現抑制を介してエネルギー代謝を効率化することで、マウス個体レベルの運動持続能を正に制御している可能性が考えられ、ミトコンドリア超複合体制御との関連が示唆された。

<引用文献>

Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 18, 442-449, 1998.

Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 417, 871-875, 2002.

Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446, 916-920, 2007.

Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun* 4, 2147, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Yamada Y, Takayama KI, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Takahashi S, Ikeda K, Kakutani S, Urano T, Fukuhara H, Homma Y, Inoue S. A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor. *Cancer Sci.* 108, 32-41, 2017. 査読有、DOI: 10.1111/cas.13105

Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shiba S, Nagasawa S, Takeda S, Inoue S. Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 480, 758-764, 2016. 査読有、DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.129

Fujimura T, Inoue S, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Ikeda K, Obinata D, Ashikari D, Takahashi S, Homma Y. Increased Expression of Tripartite Motif (TRIM) 47 Is a Negative Prognostic

Predictor in Human Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 14, 298-303, 2016. 査読有、DOI: 10.1016/j.clgl.2016.01.011

Obinata D, Takada S, Takayama K, Urano T, Ito A, Ashikari D, Fujiwara K, Yamada Y, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Takahashi S, Inoue S. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer.* 57, 39-49, 2016. 査読有、DOI: 10.1016/j.ejca.2016.01.002.

Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Okamoto K, Inoue S. MicroRNA Library-Based Functional Screening Identified Androgen-Sensitive miR-216a as a Player in Bicalutamide Resistance in Prostate Cancer. *J Clin Med.* 4, 1853-1865, 2015. 査読有、DOI: 10.3390/jcm4101853

Ikeda K, Horie-Inoue K, Ueno T, Suzuki T, Sato W, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Berezikov E, Mano H, Inoue S. miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting GOLT1A. *Sci Rep.* 5, 13170, 2015. 査読有、DOI: 10.1038/srep13170

Azuma K, Shiba S, Hasegawa T, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Amizuka N, Inoue S. Osteoblast-Specific -Glutamyl Carboxylase-Deficient Mice Display Enhanced Bone Formation With Aberrant Mineralization. *J Bone Miner Res.* 30, 1245-1254, 2015. 査読有、DOI: 10.1002/jbmr.2463

[学会発表](計 6 件)

池田和博、長井咲樹、堀江公仁子、長澤さや、竹田省、井上聡。エストロゲンは骨格筋におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現を調節し生体での運動持続能を向上させる。第24回日本ステロイドホルモン学会。2016年12月3日。ホルトホール大分(大分県・大分市)

柴祥子、池田和博、堀江公仁子、中山哲俊、田中知明、井上聡。ミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成促進因子である COX7RP は糖新生を調節する。第89日本生化学会大会。2016年9月25-27日。仙台国際センター

(宮城県・仙台市)

Ikeda K, Shiba K, Horie-Inoue K, Inoue S. Mitochondrial respiratory supercomplex assembly-promoting factor COX7RP regulates bone metabolism in mice. The Joint Scientific Annual meetings of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology. August 21-24, 2016. Gold Coast Convention and Exhibition Centre (Gold Coast, Australia)

池田和博、佐藤航、堀江公仁子、井上聡. エストロゲン応答遺伝子 Efp は子宮内膜がんの治療標的となる. 第23回日本ステロイドホルモン学会. 2016年1月15-16日. 倉敷市芸文館(岡山県・倉敷市)

池田和博、堀江公仁子、井上聡. Functional screening of signaling molecules associated with endocrine therapy resistance in hormone-dependent cancers. 第38回日本分子生物学会. 2015年12月1-4日. 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly facilitates breast tumor growth in hypoxia. EMBO Meeting, Nuclear receptors: From molecules to humans. September 9, 24-28, 2015. Palais des Congres (Ajaccio, Corsica, France)

[その他]

ホームページ等

http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02_GRST/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 和博 (IKEDA, Kazuhiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30343461

(2) 連携研究者

堀江 公仁子 (HORIE-INOUE, Kuniko)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：90261982

井上 聡 (INOUE, Satoshi)

埼玉医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：40251251