

令和元年5月16日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15979

研究課題名(和文) mitoNEETによるクリスタ構造維持をターゲットとした新規心不全治療応用

研究課題名(英文) Novel therapeutics for heart failure targeting maintenance of cristae structure via mitoNEET

研究代表者

降旗 高明 (Furihata, Takaaki)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：60782505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroでmitoNEETタンパクの過剰発現系における免疫沈降後の検体を用いて、ミトコンドリア内膜にあるmitofilinをmitoNEETと相互作用を有するタンパクとして同定した。in vivoにおいてもmitoNEETとmitofilinが内因性に相互作用を有することを確認した。心筋特異的mitoNEET欠損マウスの心筋におけるミトコンドリアの電子顕微鏡像では、クリスタ構造は崩壊し形態学的な異常を呈していた。高感度ミトコンドリア呼吸測定装置による呼吸能の評価で、mitoNEET欠損マウスでのミトコンドリア機能障害は明らかであった。形態異常に機能異常が続発することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、ミトコンドリア外膜に局在するmitoNEETタンパクが、ミトコンドリア内膜にあるmitofilinと相互作用を有することがあきらかとなった。同時にミトコンドリアが形態異常と機能障害を有していることもあきらかになり、mitoNEETタンパクがミトコンドリアの働きに重要な役割を果たしていることが示唆された。この成果を発展させることで、新たな心不全の分子機序による治療方法の確立にとどまらず、幅広い疾患の予防、治療の開発にむすびつくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The endogenous mitoNEET interacted with mitofilin, a core component of MICOS complex, as a collaborator of mitoNEET in mitochondrial morphology. Mitochondria in the heart from cardiac-specific deletion of mitoNEET mice clearly showed collapsed mitochondrial cristae structure. We also observed decreased mitochondrial OXPHOS and cardiac dysfunction evaluated by echocardiography, suggesting that a loss of interaction between mitoNEET and mitofilin caused mitochondrial dysfunction via collapsed cristae structure and resulted in cardiac dysfunction.

研究分野：心不全

キーワード：ミトコンドリア 心筋

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアのクリスタは必要に応じてその形態を変化させることが知られており、構造変化と一致して、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超複合体の形成や分解が起こる。特に超複合体の分解は活性酸素種 (ROS) 産生増加や呼吸能低下をひき起こす (Cell 155, 160-171, 2013)。すなわち、ミトコンドリアの形態と機能の間には強い関連があることが示唆される。

クリスタの膜構造を裏打ちすることが知られている MICOS 複合体はミトコンドリア内膜の境界膜とクリスタをつなぐクリスタ接合部に存在する。最近、内膜の MICOS 複合体と外膜タンパクとの直接的な相互作用が注目されている (Trends Biochem Sci. 41, 261-273, 2016) が、その詳細な機序や MICOS 複合体の制御機構はあきらかにされていない。

ミトコンドリア外膜に局在する mitoNEET は代表的な糖尿病治療薬であるピオグリタゾンの標的タンパクとして同定されたが、生体内で反応の中心となる鉄硫黄中心を有するため、細胞質のレドックス状態をミトコンドリア内へ伝えるセンサーの役割をもつことが想定される。

心筋リモデリング、心不全の形成・進展におけるミトコンドリア機能障害、酸化ストレスの役割をあきらかにする研究に取り組む中で、特異的 mitoNEET 欠損マウスを用いて、mitoNEET タンパクが細胞質やミトコンドリア内膜タンパクと協同してミトコンドリアへの鉄流入を調節し、ミトコンドリア鉄の恒常性維持において重要な役割を果たしていることをあきらかにした。

その過程で、ミトコンドリア鉄動態では説明できない、mitoNEET 欠損マウスにおけるクリスタ構造の崩壊を観察した<形態異常>。また、単離ミトコンドリアの電子伝達系機能は有意に低下していた<機能異常>。さらに、圧負荷心不全モデルマウスの心臓では mitoNEET 発現が低下していた。

以上より、心不全に伴う mitoNEET の機能不全が MICOS 複合体との相互作用を阻害し、クリスタ構造の崩壊<形態異常>、ミトコンドリア呼吸能低下<機能異常>による心筋リモデリング、心不全進展をもたらすという本研究の仮説を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

mitoNEET の欠損や機能不全により、MICOS 複合体との相互作用消失によるクリスタ構造の形態異常、電子伝達系の超複合体の分解を介して、膜電位低下やミトコンドリア呼吸能低下によるミトコンドリア機能障害をひき起こし、ひいては心筋リモデリング、心不全の形成・進展に関与するという仮説を検証する。さらには、その成果をもとに新しい心不全治療法を確立するものである。

## 3. 研究の方法

mitoNEET 機能不全のミトコンドリアにおける、ミトコンドリアの形態異常ならびに機能異常についてあきらかにする。特に、生化学的手法による mitoNEET (外膜) と相互作用のあるタンパク (内膜) の同定、心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスによるミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成と分解、また膜電位、酸化ストレスや呼吸能について、下記の方法を用いて評価する。

- (1) ミトコンドリア形態異常：電子顕微鏡、超解像顕微鏡
- (2) mitoNEET と相互作用を有するミトコンドリア内膜タンパクの同定：免疫沈降、質量分析
- (3) mitoNEET と内膜タンパクとの複合体の形成：ブルーネティブ電気泳動 (BN-PAGE)
- (4) ミトコンドリア呼吸鎖タンパク複合体の形成：BN-PAGE
- (5) ミトコンドリア呼吸鎖タンパク超複合体の形成：BN-PAGE
- (6) ミトコンドリア機能：ミトコンドリア呼吸能 (高感度ミトコンドリア呼吸測定装置)、ミトコンドリア膜電位 (JC-10 染色)、クエン酸合成酵素 (CS) 活性、ミトコンドリア複合体 (COX) 活性
- (7) 活性酸素種 (ROS) の酸化ストレス：ミトコンドリア分画における活性酸素種 (高感度ミトコンドリア呼吸測定装置付属 LED モジュール)
- (8) 心機能評価：心筋リモデリング評価、心不全重症度評価 (死亡率、心エコー、血行動態測定、心および肺重量測定)、心筋病理組織 (心筋細胞肥大、間質線維化、アポトーシス)

## 4. 研究成果

(1) HEK293 細胞において mitoNEET タンパクの過剰発現系を作成し、免疫沈降後の検体を用いて質量分析を行ったところ、mitoNEET と相互作用を有するタンパクの候補として、ミトコンドリア内膜に局在する MICOS 複合体を形成するタンパクの一つである mitofilin を *in vitro* のレベルで同定した。

(2) さらに、若齢の野生型マウスの心筋をホモジナイズした抽出液を用いて *in vivo* での免

疫沈降法を行ったところ、実際に mitofilin との内因性に相互作用を有することを確認した。

( 3 ) mitoNEET 欠損マウスにおいては、mitoNEET とミトコンドリア内膜タンパクである mitofilin の相互作用が理論的には消失することが予想される。心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスの心筋におけるミトコンドリアの電子顕微鏡像では、クリスタ構造は崩壊し形態学的な異常を呈していた。( 図 1 )

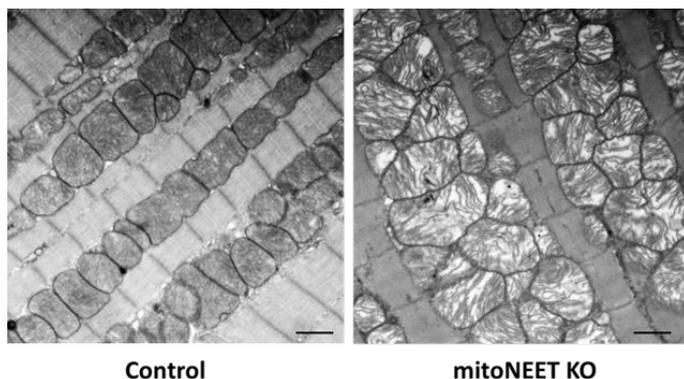


図 1 .心臓特異的 mitoNEET 欠損マウスと対照マウスにおける心筋ミトコンドリア電子顕微鏡像

( 4 )高感度ミトコンドリア呼吸測定装置を用いた呼吸能の評価では、mitoNEET 欠損マウスにおけるミトコンドリアの機能障害は明らかであった。

( 5 ) mitoNEET 欠損マウスにおいて、若齢の mitoNEET 欠損マウスでは機能異常なく形態異常のみを呈するが、高齢になると形態学的な異常と機能的な異常が同時に起こっていることより、形態異常が先行して機能異常が続発するものと示唆された。

( 6 )また、形態学的異常が機能的異常に結びつく機序については、高齢の mitoNEET 欠損マウスのミトコンドリアにおける解析において、電子伝達系を構成するミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成が低下している可能性を見出した。

( 7 )また、高齢の心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスの生理学的な評価において、左室収縮障害は明らかで、心不全を呈していることも示した。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

( 1 ) Nakajima T, Yokota T, Shingu Y, Yamada A, Iba Y, Ujihira K, Wakasa S, Ooka T, Takada S, Shirakawa R, Katayama T, Furihata T, Fukushima A, Matsuoka R, Nishihara H, Dela F, Nakanishi K, Matsui Y, Kinugawa S. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in epicardial adipose tissue is associated with decreased concentration of adiponectin and severity of coronary atherosclerosis. Scientific reports. 2019;9:3535. [ 査読有り ]

( 2 ) Matsumoto J, Takada S, Kinugawa S, Furihata T, Nambu H, Kakutani N, Tsuda M, Fukushima A, Yokota T, Tanaka S, Takahashi H, Watanabe M, Hatakeyama S, Matsumoto M, Nakayama KI, Otsuka Y, Sabe H, Tsutsui H, Anzai T. Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Limited Exercise Capacity in Mice With Heart Failure. Circulation. 2018;138(18):2064-2066. [ 査読有り ]

( 3 ) Tsuda M, Fukushima A, Matsumoto J, Takada S, Kakutani N, Nambu H, Yamanashi K, Furihata T, Yokota T, Okita K, Kinugawa S, Anzai T. Protein acetylation in skeletal muscle mitochondria is involved in impaired fatty acid oxidation and exercise intolerance in heart failure. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle. 2018;9:844-859. [ 査読有り ]

( 4 ) Kakutani N, Fukushima A, Yokota T, Katayama T, Nambu H, Shirakawa R, Maekawa S, Abe T, Takada S, Furihata T, Ono K, Okita K, Kinugawa S, Anzai T. Impact of High Respiratory Exchange Ratio During Submaximal Exercise on Adverse Clinical Outcome in Heart Failure. Circulation journal. 2018;82:2753-2760. [ 査読有り ]

( 5 ) Kadoguchi T, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Mizushima W, Fukushima A, Okita K, Kinugawa S. Deletion of NAD(P)H Oxidase 2 Prevents Angiotensin II-Induced Skeletal Muscle Atrophy. BioMed research international. 2018 3194917. [ 査読有り ]

〔学会発表〕(計3件)

(1) Takaaki Furihata, Shintaro Kinugawa, Shingo Takada, Satoshi Maekawa, Takashi Katayama, Ryosuke Shirakawa, Hideo Nambu, Yoshikuni Obata, Katsuma Yamanashi, Naoya Kakutani, Akimichi Saito, Arata Fukushima, Takashi Yokota and Toshihisa Anzai  
The Outer Mitochondrial Membrane Protein, mitoNEET, Sustains Structure of Mitochondrial Cristae

第91回米国心臓協会学術集会 (Chicago, USA, 2018)

(2) Takaaki Furihata, Shingo Takada, Satoshi Maekawa, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Takayuki Nakajima, Takashi Katayama, Ryosuke Shirakawa, Hideo Nambu, Naoya Kakutani, Akimichi Saito, Arata Fukushima, Takashi Yokota, and Shintaro Kinugawa  
The Outer Mitochondrial Membrane Protein, mitoNEET, Sustains Mitochondrial Cristae Structure

第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム (東京, 2018)

(3) Takaaki Furihata, Shingo Takada, Wataru Mizushima, Satoshi Maekawa, Arata Fukushima, Masaya Tsuda, Junichi Matsumoto, Naoya Kakutani, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa  
mitoNEET Regulates Mitochondrial Iron Homeostasis Interacting with Transferrin Receptor  
第90回米国心臓協会学術集会 (Anaheim, USA, 2017)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。