

令和元年6月13日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16170

研究課題名(和文) エストロゲン応答性ミトコンドリア超複合体形成因子による糖・脂質・骨制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of glucose, lipid and bone metabolism by an estrogen-inducible mitochondrial respiratory supercomplex assembly factor

研究代表者

柴 祥子 (Shiba, Sachiko)

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70633824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：女性ホルモンであるエストロゲンは様々な代謝系の調節に関与しているが、詳細な分子機構は明らかではない。本研究では、エストロゲン応答遺伝子として同定し、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成促進因子であることを解明したCOX7RPの代謝における影響について解析した。COX7RPノックアウトマウスは血糖値が低値を示し、糖新生の能力が低下した。また、COX7RPノックアウトマウスの肝臓から調整したミトコンドリアにおいて、呼吸鎖超複合体の低形成と、ATP合成の低下が認められた。以上より、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成を制御するCOX7RPは糖代謝に重要な役割を担ってい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

エストロゲンは様々な代謝系の調節に関与しており、そのメカニズムの解明は肥満、糖尿病、脂質代謝異常などの治療に役立つ可能性が想定される。本研究によって、エストロゲン作用とミトコンドリア機能との接点となるCOX7RPが糖代謝に重要な役割を担っていることを解明したことは、内分泌学をはじめとする医学、生物学に新しい研究分野を拓くものと考えられる。また、COX7RPの機能解明は、上記疾患等の病因解明と新たな予防・治療法への応用が期待され、社会的にも生活習慣病の改善や健康維持などに資すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Estrogen, a female hormone, is involved in the regulation of various metabolism; however, the molecular mechanism remains to be elucidated. COX7RP has been identified as an estrogen-responsive gene and recently reported as a stimulating factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly. In this study, physiological function of COX7RP was analyzed using gene-modified mouse model. COX7RP knockout mice (Cox7rpK0) showed low blood glucose levels and reduced gluconeogenesis. In addition, mitochondrial respiratory supercomplex formation and ATP synthesis were decreased in mitochondria prepared from the liver of Cox7rpK0. These results suggest that COX7RP plays an important role in glucose metabolism.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア エストロゲン応答遺伝子 遺伝子改変マウス 糖代謝 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンをはじめとする内分泌系は、生命活動や生体恒常性に重要である。近年、食の欧米化、身体活動量の低下によるエネルギー収支バランスの崩れに併せて、内分泌作用の破綻が重なり、肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧、動脈硬化の発症が増加していると考えられている。ステロイドホルモンの一つであるエストロゲンは転写因子として機能するエストロゲン受容体 (estrogen receptor ; ER) に結合して活性化することにより、応答遺伝子の発現制御を介して生理的および病態生理的な作用を發揮することが知られている。従って、エストロゲン作用の全貌解明のためには、ER の下流で働くエストロゲン標的遺伝子の機能解明が必要であるが、肥満、糖尿病、脂質代謝異常など関連の深い糖代謝、脂質代謝におけるエストロゲン応答遺伝子の役割に関しては不明な部分が多く残されている。

当研究室ではエストロゲンの作用メカニズムの解明を目指し、以前より独自にエストロゲン応答遺伝子の同定と機能解析を行ってきた (Muramatsu *et al.*, 2000)。そのなかの1つに、ミトコンドリア内膜に局在するシトクローム *c* オキシダーゼ (COX; 複合体 IV) の COX7A サブユニットと高い相同性を有することから cytochrome *c* oxidase subunit 7a-related polypeptide (COX7RP) と名付けたエストロゲン応答遺伝子が存在していた。COX7RP はそのアミノ酸配列の特徴から、電子伝達系の呼吸鎖複合体との関連性が想定されたが、その機能については不明であったところ、最近、ミトコンドリア呼吸鎖複合体をさらに大きな構造体である超複合体へと形成させる促進因子であることが当研究室ならびに他の研究室より報告され、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の制御によるエネルギー代謝について新たな視点を提示し注目されている (Ikeda *et al.*, 2013; Lapuente-Brun *et al.*, 2013)。

ミトコンドリア内膜における呼吸鎖複合体(複合体 I~V)の存在様式と作用モデルに関しては、これまでは、それぞれの複合体が内膜上で個別に拡散するように存在する流動モデルが考えられており、電子は複合体間を偶発的に行き来して電子伝達を行い、ATP 合成に必要なプロトンの濃度勾配の形成に寄与していると想定されていた。これに対して、近年の膜タンパク質の立体構造解析技術の向上により、I/III/IV 複合体同士が結合して大きな超複合体を形成していることが提唱され、レスピラソームモデルと呼ばれている (Schon *et al.*, 2009)。さらに、これらの中間的なモデルとして、単体で存在する複合体と複数の複合体が結合して超複合体 (I/III/IV, I/III, III/IV) を形成するものが共存し、環境にตอบสนองして超複合体の結合、解体が行われる可塑的なモデルが考えられていたが、超複合体の形成に携わる直接的な因子は明らかになっていなかったことから謎のままであった。このような状況において、当教室では COX7RP が超複合体形成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役割を担っていることを報告した (Ikeda *et al.*, 2013)。さらに、遺伝子改変マウスの解析から、COX7RP は生体では骨格筋の持続運動と褐色脂肪組織における熱産生に重要な役割を担っていることを解明した (図 1)。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の制御因子 COX7RP が種々の代謝調節に関与すると想定され、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成を介した代謝調節機構を解明することで生活習慣病などの予防・病因を解明できる糸口になると考えられた。

<引用文献>

- Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun.* 270 (1), 1-10, 2000. Review.
- Schon EA, Dencher NA. Heavy breathing: energy conversion by mitochondrial respiratory supercomplexes. *Cell Metab.* 9(1), 1-3, 2009.
- 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.
- Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quirós PM, Calvo E, Rodríguez-Hernández MA, Navas P, Cruz R, Carracedo Á, López-Otín C, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Fernández-Vizarra E, Enríquez JA. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science.* 340(6140):1567-70, 2013.

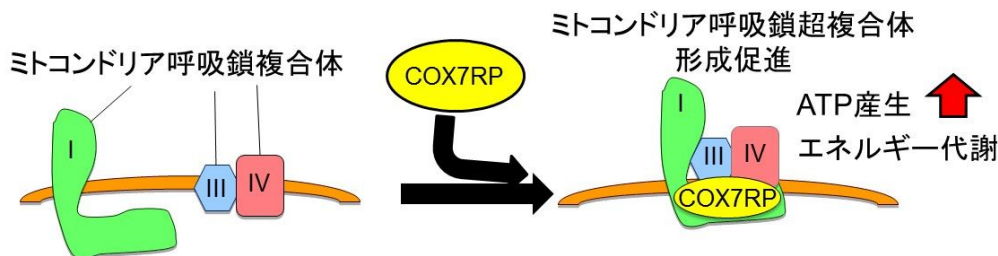


図1 COX7RPはミトコンドリア呼吸鎖複合体IIIとIVをIに結合させることによって超複合体を形成させる

2. 研究の目的

糖尿病や肥満、脂質異常症など生活習慣病を罹患し、心疾患や脳血管疾患に発展する現状は臨床問題であり、また、エストロゲン量の低下は骨粗鬆症やメタボリック症候群とも関連していることから、エストロゲンシグナルの理解が治療に役立つ可能性が想定される。特に、エストロゲンと生活習慣病、ミトコンドリア機能と代謝との関連性が注目されているが、それらメカニズムの解析は立ち遅れている。エストロゲン応答遺伝子として同定した COX7RP がミトコンドリア呼吸鎖超複合体の制御因子であることを世界で初めて解明し、エストロゲンと代謝系とを結ぶ鍵分子として着目したが、各種代謝に対する役割は未解明である。そこで本研究では、独自に作製した COX7RP 遺伝子改変マウスを用いて糖代謝、脂質代謝等における表現型を明らかにし、COX7RP の代謝における役割を生体レベルで明らかにすることを目的とした。さらに、COX7RP 遺伝子改変マウスの組織を用いて、2次元電気泳動法によりミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成状態を調べることで、組織におけるエネルギー代謝とミトコンドリア呼吸鎖超複合体の関連について明らかにすることを目的とした。これらの解析により、COX7RP によるエストロゲン作用とミトコンドリア機能に関連した分子メカニズムを明らかにし、疾患の病因解明や新たな予防、治療法の開発に向けその有用性を示すことを目指した。

3. 研究の方法

エストロゲン応答遺伝子 COX7RP の糖代謝における役割を明らかにするため、独自に作製した COX7RP ノックアウトマウス(*Cox7rp*KO)とコントロールの野生型マウス(WT)を用いて、体重測定、各種臓器の重量、耐糖能を調べるための経口糖負荷試験 (Oral glucose tolerance test ; OGTT)、インスリン負荷試験 (Insulin tolerance test ; ITT)、糖新生を調べるためのピルビン酸負荷試験 (Pyruvate tolerance test ; PTT)、空腹時や糖負荷時の血漿インスリン濃度の測定を行った。さらに、これらマウスの肝臓からミトコンドリア分画を採取・調製し、ATP 含有量ならびに ATP 合成速度を調べた。ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の定量については、タンパク質の高次構造や複合体構造を保持したまま分離できる Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) を 1 次元目に行った後の 2 次元目に SDS-PAGE を行う 2 次元電気泳動法とミトコンドリア呼吸鎖複合体のサブユニットに対する抗体を用いて検出するウエスタンブロット解析にて検討した。

4. 研究成果

*Cox7rp*KO マウスにおいて糖代謝における表現型を解明するため、若齢・成中期において経口糖負荷試験 (OGTT)、インスリン負荷試験 (ITT) を行った。OGTT、ITT どちらの試験においても *Cox7rp*KO マウスの血糖値は WT マウスと比較して低値を示した。そこで、若齢・成中期における糖新生を調べるため、ピルビン酸負荷試験 (PTT) を行ったところ、*Cox7rp*KO マウスは WT マウスに比べて血糖値が低値であったことから、*Cox7rp*KO マウスは糖新生の能力が低下していることが明らかとなった。そこで、糖新生に重要な役割を担っている臓器の 1 つである肝臓のミトコンドリア分画を採取・調製し、ATP 含有量ならびに ATP 産生速度を測定したところ、WT マウスと比べて *Cox7rp*KO マウスでは低下していることが明らかとなった。さらに、*Cox7rp*KO マウスの肝臓のミトコンドリア分画を調整し、BN-PAGE による 2 次元電気泳動法による解析を行ったところ、*Cox7rp*KO マウスにおけるミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成が WT マウスと比較して低下していることを見出した。一方で、WT マウスおよび *Cox7rp*KO マウスの肝臓のミトコンドリア分画におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体 III と IV のそれぞれのサブユニットである Risp と Cox1 単独のタンパク質量には、両者間で変化は認められなかった。これらのことより、COX7RP は肝臓ミトコンドリアの超複合体形成の促進とエネルギー産生の亢進に関与し、糖代謝に重要な役割を担っていることを解明した (図 2)。以上のことから、COX7RP はミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成を介した機能的な制御により、生体レベルでの代謝に影響を及ぼしていることが示唆された。これらの成果は、Scientific Reports 誌に論文として発表した ()。

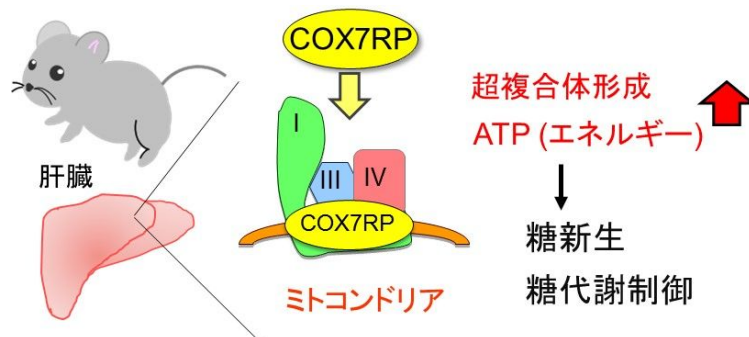


図2 COX7RPの糖代謝における作用モデル

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shiba S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Nakayama A, Tanaka T, Inoue S. Deficiency of COX7RP, a mitochondrial supercomplex assembly promoting factor, lowers blood glucose level in mice. Sci Rep. 7(1), 7606, 2017. 査読有, DOI:10.1038/s41598-017-08081-z.

〔学会発表〕(計 5 件)

Inoue S, Shiba S, Ikeda K, Horie-Inoue K: Establishment of patient-derived cells and xenografts of endometrial cancer using a long-term culture based on spheroid formation. The 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, Biology to Precision Medicine. February 8-12, 2019. Westin Maui Resort & Spa, Ka'anapali (Maui, Hawaii, USA)

柴 祥子、池田和博、鈴木 貴、堀江公仁子、新谷大輔、岡本康司、長谷川幸清、井上 聡 . 患者由来子宮内膜がん三次元スフェロイド培養とマウス移植モデルの確立およびそのホルモン・薬剤反応性の解析 . Generation and analysis for hormone and drug responsiveness of endometrial cancer models including patient-derived 3D cancer spheroids and patient-derived xenografts . 第 2 回がん三次元培養研究会 . 2018.11.27 . 国立がん研究センター研究所 (東京都・中央区)

柴 祥子、池田和博、鈴木 貴、新谷大輔、岡本康司、堀江公仁子、長谷川幸清、井上 聡 . 女性ホルモンに应答する患者由来子宮内膜がん培養・移植モデルの確立とそのメカニズムの解析 . 第 26 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 . 2018 年 11 月 17 日 . 幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市)

柴 祥子、池田和博、鈴木 貴、新谷大輔、岡本康司、堀江公仁子、長谷川幸清、井上 聡 . 患者由来子宮内膜がん三次元培養と Patient-Derived Xenograft (PDX) モデルの樹立 . 第 19 回ホルモンと癌研究会 . 2018 年 6 月 28-29 日 . 東北大学医学部 良陵会館 (宮城県・仙台市)

柴 祥子、池田和博、堀江公仁子、滑川剛史、新谷大輔、岡本康司、長谷川幸清、井上 聡 . 子宮内膜がんのスフェロイド培養と細胞増殖抑制法の検討 . 第 1 回がん三次元培養研究会 . 2017 年 12 月 11 日 . 国立がん研究センター研究所 (東京都・中央区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

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

http://www.saitama-med.ac.jp/genome/z_press%20release/RCGM_Award_2018.pdf

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。