

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11525

研究課題名(和文)ミトコンドリア多様性の理解と臓器老化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Identification of age-related mitochondrial protein in specific organs

研究代表者

藤田 泰典(FUJITA, Yasunori)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30515888

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):加齢に伴うミトコンドリアの変化は、臓器や細胞種により異なるものと考えられる。臓器老化の分子機序を解明するには、臓器特異的なミトコンドリアタンパク質の変化を捉えることが重要である。そこで本研究では、加齢に伴い臓器特異的に発現変化を示すミトコンドリアタンパク質の同定を試みた。細胞老化に伴い発現変化を示すミトコンドリアタンパク質を選別し、若齢および老齢マウスの各種臓器における発現を検証した。その結果、ミトコンドリアタンパク質Xが腎臓特異的に発現変化を示し、老化マーカーであるp21と負の相関を示すことが明らかとなった。ミトコンドリアタンパク質Xは腎臓の老化と関連する可能性が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ミトコンドリアタンパク質Xが加齢に伴い腎臓特異的に発現低下を示すことが明らかとなった。また、呼吸鎖障害による活性酸素種の増加が細胞老化の早期プロセスに関与しない可能性を見出した。これは、細胞老化とミトコンドリア機能異常の関係の再考を促す重要な知見であり、今後のさらなる検証が望まれる。また、ミトコンドリアタンパク質Xについては、加齢に伴うミトコンドリアの変質が臓器により異なることを示唆するものである。今後、ミトコンドリアタンパク質Xの機能・役割、老化との因果関係を明らかにすることで、臓器老化のメカニズムの一端を解明できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文): Mitochondrial dysfunction has been considered to be one of the hallmarks of aging. However, organ-specific alteration of mitochondria during the aging process remains to be elucidated. In this study, we tried to identify mitochondrial proteins whose expressions were organ-specifically altered during the aging process. First, based on omics data in human fetal lung-derived fibroblasts, we selected several mitochondrial proteins whose expressions were increased or decreased in senescent cells compared with proliferating cells. Second, we investigated gene expression levels of those proteins in young and aged mice, founding that mitochondrial protein X was decreased only in the kidney from aged mice compared with that from young mice. In addition, the expression levels of mitochondrial protein X were negatively correlated to those of p21, implying that mitochondrial protein X may be involved in cellular senescence observed in aged kidney.

研究分野：分子生物学

キーワード：老化 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化が進む先進諸国では、健康寿命の延伸が喫緊の課題であり、老化や老化関連疾患のメカニズムの解明が望まれている。臓器老化を伴う個体老化には、ゲノム不安定性、テロメア短縮、エピジェネティック変化、タンパク質ホメオスタシス異常、細胞老化、幹細胞枯渇など様々な因子が関与するものと考えられている。ミトコンドリアはエネルギー産生を担うオルガネラであり、アポトーシス制御、カルシウムイオン貯蔵など多彩な役割を担っている。高齢者や老齢動物の臓器では、ミトコンドリア機能異常が観察され、個体老化とミトコンドリアの関連性が報告されている。具体的には、脳や肝臓、心臓などの臓器でミトコンドリア DNA 変異の蓄積、呼吸鎖複合体活性の低下などが示されている。最近では、ミトコンドリアの分裂・融合と老化に関する報告も散見される。しかしながら、加齢に伴うミトコンドリア機能異常の詳細な分子機序や臓器老化、個体老化との関連性は十分に解明されていない。そのため、老化とミトコンドリアに関する、より一層の研究が求められているとともに、新たな観点からのアプローチも期待されている。ミトコンドリアは臓器毎に形態や量、機能に違いがあり、多様性を有している。しかしながら、加齢に伴うミトコンドリア機能異常の臓器特異性については十分に解析されていない。一方、細胞老化は細胞が不可逆的に細胞分裂を停止した状態であり、p21 や p16 などの老化マーカーが検出される。老齢個体の臓器中では、これら老化マーカーを発現する細胞が蓄積し、これらを除くことで、加齢性変化や老化関連疾患の発症が抑制される。従って、細胞老化で生じる現象が臓器老化にも関与することが推察される。ミトコンドリア機能異常が細胞老化に関与することが提唱されているが、その因果関係に関する統一した理解は得られていない。また、細胞老化により生ずるミトコンドリア変容が老齢個体で観察されるかは不明である。

## 2. 研究の目的

加齢に伴うミトコンドリアの変化は、臓器や細胞種により異なるものと考えられる。臓器老化の分子機序を解明するには、臓器特異的なミトコンドリアタンパク質の変化を捉えることが重要である。そこで本研究では、加齢に伴い臓器特異的に発現変化を示すミトコンドリアタンパク質を同定することを目的とした。本研究の成果は、臓器老化メカニズムの解明に資することが期待される。

## 3. 研究の方法

- (1) 細胞培養：ヒト胎児肺由来線維芽細胞 TIG-1 を複製老化に達するまで長期間継代培養した。培地は E-MEM(10% FBS 含)を使用し、37 °C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。細胞が盛んに増殖する期間を「増殖期」、細胞の分裂速度が低下する期間を「移行期」、細胞分裂停止後の期間を「複製老化期」とした。
- (2) ライブセルイメージング：複製老化の各フェーズの細胞を、ミトコンドリア蛍光標識プローブまたは活性酸素種検出用蛍光プローブで染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を取得した。ミトコンドリアの内部構造観察の際は、超解像レーザー顕微鏡を用いた。染色条件はメーカー推奨プロトコールに従って実施した。画像解析ツール Fiji を用いて、各蛍光シグナルの数値化を行った。
- (3) 遺伝子発現解析：細胞またはマウス臓器から RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。リアルタイム PCR により目的遺伝子の発現量を定量した。内在性コントロールとして、細胞では ACTB 遺伝子を、マウス臓器では Rplp1 遺伝子を使用した。
- (4) タンパク質発現解析：RIPA バッファーを用いて細胞からタンパク質を抽出した。Laemmli サンプルバッファーでタンパク質サンプルを調整した後、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い、タンパク質を分離した。その後、ウェスタンブロットングを行い、目的タンパク質の発現量を比較した。プロテオーム解析については、タンパク質の還元アルキル化、トリプシン消化、脱塩処理を行った後、LC-MS/MS 分析を実施した。解析ソフトを用いて、ペプチドの同定、タンパク質の相対量比較を行った。
- (5) ミトコンドリア機能解析：複製老化の各フェーズの細胞を回収し、高分解能呼吸測定装置を用いて、酸素消費速度を測定した。細胞を浸透させた後、基質、ADP、呼吸鎖阻害剤を順次添加し、その間の酸素消費速度を計測し、酸化リン酸化能、電子伝達能を算出した。
- (6) 動物実験：若齢(8ヶ月齢)と老齢(29ヶ月齢)の C57BL/6 雄性マウスを安楽死させた後、腎臓、心臓、大腸、膵臓等を摘出した。本動物実験は、所属機関の実験動物委員会の審査を受け、機関長により承認された後、日本学会の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」ならびに所属機関の「動物実験実施規定」に則り、適正に動物実験を実施した。

## 4. 研究成果

- (1) 細胞老化に伴うミトコンドリア変容の解析  
TIG-1 細胞をミトコンドリア蛍光標識プローブで染色し、複製老化過程のミトコンドリアの形態を観察した。その結果、移行期からミトコンドリアの伸長が始まり、複製老化期ではより伸長

したミトコンドリアと共に、異常な形態を示すミトコンドリアが存在することが分かった。そこで、ミトコンドリアの分裂因子の発現変化を調べた結果、移行期から dynamin-related protein 1 (DRP1)の減少が認められた。一方、fission, mitochondrial 1 (FIS1)については増加傾向を示した。また、これまで複製老化との関係が報告されていなかった ganglioside induced differentiation associated protein 1 (GDAP1)の発現が、複製老化の進行と共に顕著に発現低下を示した。このことから、GDAP1 が複製老化におけるミトコンドリアの伸長化に関与している可能性が考えられた。次に、超解像顕微鏡を用いてミトコンドリア内部構造のライブイメージングを行った。ミトコンドリア DNA 変異による呼吸鎖機能障害を有する細胞では、ミトコンドリア内部に異常な膜構造が観察される。しかしながら、複製老化後の細胞においてはそのような典型的な異常膜構造は観察されなかった。

ミトコンドリアは活性酸素種の発生源であり、ミトコンドリア機能異常に伴う活性酸素種が細胞老化を促進するものと考えられている。そこで、活性酸素種を検出する蛍光プローブを用いて、複製老化過程の活性酸素種の解析を行った。先行研究でよく使用されている蛍光プローブを用いて解析したところ、複製老化後の細胞ではリポフスチンによる自家蛍光シグナルと活性酸素種由来の蛍光シグナルの区別が困難であることが分かった。そこで、蛍光シグナルが強く、自家蛍光の影響を受けにくい蛍光プローブを探索し、3種類の活性酸素種検出用プローブを選抜した。これらの蛍光プローブを用いて解析を行った結果、移行期の細胞では活性酸素種の増加は認められず、複製老化後に活性酸素種が増加することが明らかとなった。このことから、複製老化の早期プロセスに活性酸素種の増加が関与していない可能性が示唆された。

次に、酸素消費速度測定と膜電位イメージングにより、ミトコンドリアの呼吸鎖機能を評価した。その結果、酸化的リン酸化能および電子伝達能は移行期に一過的に亢進し、複製老化後に低下することが分かった。それと一致するように、ミトコンドリア膜電位も複製老化後に低下していた。また、細胞内の ATP 濃度も移行期に一過的に増加した後、複製老化後に減少した。複製老化期の細胞では、細胞内のエネルギーセンサーである AMP-activated protein kinase (AMPK)のリン酸化レベルが増加していた。このように、複製老化移行期の細胞ではミトコンドリアの呼吸鎖障害は認められないことから、呼吸鎖障害による活性酸素種の増加が複製老化の早期プロセスに関与していないものと考えられた。

ミトコンドリアの酸化的リン酸化障害が生じると、統合ストレス応答経路が活性化し、転写因子 ATF4 を介して適応因子の遺伝子発現が誘導される。複製老化期の細胞では呼吸鎖機能の低下が観察されるが、ATF4 タンパク質ならびにその標的遺伝子の発現がむしろ低下していた。このことから、複製老化で観察されるミトコンドリア異常は、統合ストレス応答が活性化される典型的なミトコンドリア異常とは異なるものと考えられた。また、ATF4 経路の抑制が複製老化の早期プロセスに関与している可能性も考えられた。

## (2) 細胞老化に伴い発現変化を示すミトコンドリアタンパク質の同定

複製老化過程のミトコンドリアの形態・機能変化を明らかにした TIG-1 細胞を用いて、細胞老化により発現変化を示すミトコンドリアタンパク質の探索を実施した。増殖期と複製老化期の TIG-1 細胞からミトコンドリアを単離し、プロテオーム解析を実施した。2 倍以上増減したタンパク質を選抜した結果、49 種類のタンパク質が増加し、42 種類のタンパク質が減少していた。公共データベース The Human Protein Atlas を参照し、これらタンパク質の臓器特異性を確認した。「Tissue enriched」, 「Tissue enhanced」, 「Low tissue specificity」とアノテーションされた増加タンパク質は、それぞれ 1 種類、18 種類、30 種類であった。減少タンパク質は、「Tissue enhanced」, 「Low tissue specificity」がそれぞれ 8 種類と 33 種類であった。「Tissue enriched」または「Tissue enhanced」に分類された増加タンパク質の内、臓器特異性の高いタンパク質を 8 種類選抜した。

次に、遺伝子発現プロファイルから細胞老化に伴い発現変化を示すミトコンドリアタンパク質の同定を試みた。公共データベースに登録されている RNA-seq 解析データ (GSE130727) から、WI-38 細胞と IMR-90 細胞の複製老化に関するデータを抽出し、共通して発現変化を示す遺伝子を選抜した。その結果、発現増加を示す遺伝子が 355 種類、発現低下を示す遺伝子が 361 種類得られた。次に、これらの中からミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子を選抜した結果、発現増加を示す遺伝子 8 種類、発現低下を示す遺伝子が 10 種類得られた。TIG-1 細胞において再現性を確認したところ、3 種類の遺伝子については複製老化で発現が低下することが確認された。さらに、この内の 2 種類についてはタンパク質レベルの変化も確認することができた。

## (3) 加齢に伴い発現変化を示すミトコンドリアタンパク質の同定と臓器特異性の検証

細胞老化で発現変化を示すミトコンドリアタンパク質が加齢により発現変化を示すかどうか検証した。若齢(8ヶ月齢)と老齢(29ヶ月齢)マウスから腎臓、心臓、大腸、膵臓等を摘出し、(2)で同定したミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現を調べた。その結果、若齢マウスと比較して老齢マウスの腎臓においてミトコンドリアタンパク質 X の遺伝子発現が低下していた。公共データベース The Human Protein Atlas によると、ミトコンドリアタンパク質 X は腎臓以外の臓器でも発現していた。しかしながら、このタンパク質 X の発現変化は、調べた臓器の中で腎臓でのみ観察され、臓器特異性があるものと考えられた。

加齢に伴い p21 陽性の老化細胞が蓄積することが知られている。ミトコンドリアタンパク質 X と老化細胞との関連性を調べるために、若齢と老齢マウスの各種臓器における p21 の遺伝子発現を調べ、ミトコンドリアタンパク質 X との相関関係を調べた。既報の通り、老齢マウスの腎臓において p21 の遺伝子発現が増加していた。そして興味深いことに、p21 の遺伝子発現レベルとミトコンドリアタンパク質 X の遺伝子発現レベルは強い負の相関関係 ( $r = -0.966$ ) を示すことが明らかとなった。したがって、ミトコンドリアタンパク質 X の発現低下は、臓器中の p21 発現上昇を伴う細胞の老化と関係する可能性があり、臓器老化とも関連する可能性が考えられる。今後、ミトコンドリアタンパク質 X の機能、細胞老化との因果関係を明らかにすることで、臓器老化のメカニズムの一端を解明できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasunori Fujita, Masumi Iketani, Masafumi Ito, Ikuroh Ohsawa	4. 巻 165
2. 論文標題 Temporal changes in mitochondrial function and reactive oxygen species generation during the development of replicative senescence in human fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 111866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exger.2022.111866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田泰典、池谷真澄、伊藤雅史、大澤郁朗
2. 発表標題 Mitochondrial dysfunction is not a key initiator of replicative senescence
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田泰典、池谷真澄、伊藤雅史、大澤郁朗
2. 発表標題 ミトコンドリア機能障害は複製老化初期プロセスの主要な因子ではない
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田泰典、池谷真澄、伊藤雅史、大澤郁朗
2. 発表標題 複製老化の進行にミトコンドリア機能障害は関与しない
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会年会参加
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田泰典、池谷真澄、伊藤雅史、大澤郁朗
2. 発表標題 Mitochondrial dysfunction is not involved in the initiation of replicative senescence
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasunori Fujita, Masumi Iketani, Masasumi Ito, Ikuroh Ohsawa
2. 発表標題 Doxycycline extends replicative lifespan in human fibroblast TIG-1
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田泰典、池谷真澄、伊藤雅史、大澤郁朗
2. 発表標題 ヒト胎児線維芽細胞の分裂寿命に対するミトコンドリア呼吸鎖阻害の効果
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田泰典、池谷真澄、伊藤雅史、大澤郁朗
2. 発表標題 ミトコンドリア翻訳阻害によるヒト胎児線維芽細胞の分裂寿命延伸
3. 学会等名 第21回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------