

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20660

研究課題名(和文)心不全治療を目指した新規ユビキノン制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Novel Ubiquinone Regulatory Mechanisms for the Treatment of Heart Failure

研究代表者

廣瀬 健太郎 (Hirose, Kentaro)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：70958355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキノン(UQ)は、ミトコンドリアにおける電子の運搬担体としてATP産生に必須であり、経口摂取することで心不全に対する抵抗性が示唆される。しかし、制御機構は未だ不明瞭である。我々は、UQとの直接的な結合が示唆されるCoq10aタンパク質に着目し、初めてCoq10aノックアウト(KO)マウスを作製し、心肥大の表現型を確認した。また興味深いことに、KO心臓ではUQ量が増大していた。この原因を追求した結果、Coq10aはUQのシャペロンとして、UQがミトコンドリアから細胞質に拡散することを防ぐ機能を持つことを見出した。これらの結果は、機能未知のCoq10aの機能を初めて示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多機能分子であるユビキノン(UQ)は、電子伝達系におけるATP産生や酸化ストレスからの細胞保護としての機能がある。心不全の心臓組織において、UQ存在量が大きく低下する為、経口投与が心不全への予防・治療効果を示すことが知られる。ただし、細胞内におけるUQの制御機構はあまり分かっていない。本研究では、心臓におけるUQ量の制御に関わるUQシャペロンの存在を初めて見出した。この成果は、UQを介した心不全治療法を提示できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ubiquinone(UQ) is a redox-active molecule, essential for mitochondrial respiration. UQ administration is expected to improve heart failure, but the intercellular regulation of UQ has not been well understood. In this study, we focused on Coenzyme Q10a (Coq10a) gene, which is predicted to possess a UQ-binding site. Toward an understanding of Coq10a function, we generated the first Coq10a knockout and heart-specific knockout mice. These mutants consistently developed cardiac growth postnatally. We measured UQ levels in cardiac tissues, detecting profound UQ elevation in the KO hearts. Interestingly, the elevation of UQ amounts seems to ectopically activate PPAR signaling through the potential binding to PPAR protein, leading to cardiac overgrowth. Taken together, our study provided the first evidence that the loss of a UQ chaperone leads to the overgrowth of postnatal hearts through dysregulation of UQ levels.

研究分野：発生生物学

キーワード：心不全 ユビキノン コエンザイムQ マウス

1. 研究開始当初の背景

心不全は、予後不良の病態であり、根本的な予防・治療法の開発が求められる。そこで、心不全の病態悪化の原因となるミトコンドリア代謝異常や酸化ストレスが、治療ターゲットとして注目される。コエンザイム Q と呼ばれる脂溶性分子のユビキノン(以下 UQ)は、心不全への予防・治療効果が示唆される(Rabanal-Ruiz et al., *Antioxidants*. 2021)。UQ は、心不全の心臓組織では、存在量が大きく低下する。そこで過去に、臨床試験にて心不全患者へと経口投与することで心機能が回復することが報告されている(Mortensen et al., *JACC Heart Fail*. 2014)。現在、日本では心不全の予防薬として第三類医薬品として市販されるが、高い治療効果は示さない。UQ は多機能分子であり、その作用機構は部分的にしか理解されていないが、電子伝達系における電子輸送担体としてエネルギー代謝の活性化、抗酸化物質による酸化ストレスからの細胞保護作用、タンパク質活性の補酵素などの機能を示すことが示唆される。ただし、細胞内における UQ の制御機構はほとんど理解されていない。では、未知の細胞内 UQ 制御機構を理解することができれば、心不全に対する治療効果を改善できる新たな技術開発を実現できる可能性がある。

我々はこれまでの研究から、心臓における甲状腺ホルモン経路の下流遺伝子の一つに、Coenzyme Q10A (Coq10a)遺伝子が存在することを見出した。酵母での研究から、COQ10A タンパク質は START と呼ばれる UQ との結合ドメインを有しており、UQ シャペロンとして機能する可能性が示唆されていた。しかし、哺乳類での COQ10A の機能は一切解析されていない。そこで我々は Coq10a mRNA が心臓や骨格筋に高発現すること、また心筋細胞においてミトコンドリアに局在することを明らかにした。更に Coq10a 遺伝子の機能を理解するため、Coq10a ノックアウト(KO)マウスを作製し、心臓での表現型を解析したところ、マイルドな肥大化を呈した。更に興味深いことに、Coq10a KO 心臓では、UQ 存在量が優位に増加していた。しかしながら、Coq10a の機能や表現型の原因は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未だ明らかになっていない哺乳類心臓における Coq10a の機能を解明することである。具体的な成果目標は次の 2 点である。Coq10a が欠損することで生じる心肥大の原因を探ること。そして、UQ 量増加に起因する Coq10a による未知の UQ 制御機構を解き明かすことである。

3. 研究の方法

Coq10a KO マウス：以前作製した点遺伝子変異による KO マウスに加え、タンパク質コード領域を全て欠損させた KO マウスを CRISPR-Cas9 システムにより作製した。更に、コンディショナルに Coq10a 遺伝子をノックアウトできるように、Coq10a floxed マウスも作製した。このマウスに心臓特異的に Cre を発現する Myh6-Cre と掛け合わせることで、生後以降の心臓で Coq10a が欠損するマウスを作製した。

UQ 量の測定：高速液体クロマトグラフィー(HPLC)解析による UQ9・UQ10 の酸化型・還元型を測定可能な手法を確立した。

H9C2 細胞：ラット筋細胞株である H9C2 細胞における過剰発現・ノックダウンは、レンチウイルス感染により実施した。

4. 研究成果

○ 表現型解析

まず新たに作製した KO マウスの心臓における表現型を解析した結果、すべての変異体マウスで一致して、マイルドな心肥大が確認できた。この心肥大は、細胞増殖の増加および心筋細胞サイズ自体の拡大によって生じることも見出した。

○ UQ 制御機構の解析

では、心臓における UQ 量増加の原因は何か？酵母では COQ10A が UQ シャペロンとして推測される。そこで実際にマウス COQ10A が UQ との結合を示すことを、免疫沈降法によって検証した。Coq10a KO 心臓組織をネガティブコントロールとして、野生型心臓抽出物を、COQ10A 抗体と反応させ、ビーズによる回収を行い、HPLC によって UQ 量の測定を実施した。その結果、Coq10a KO 心臓抽出物とは対照的に、野生型心臓抽出物のみで、UQ の検出ができた。つまり、COQ10A に UQ が結合することを示している。

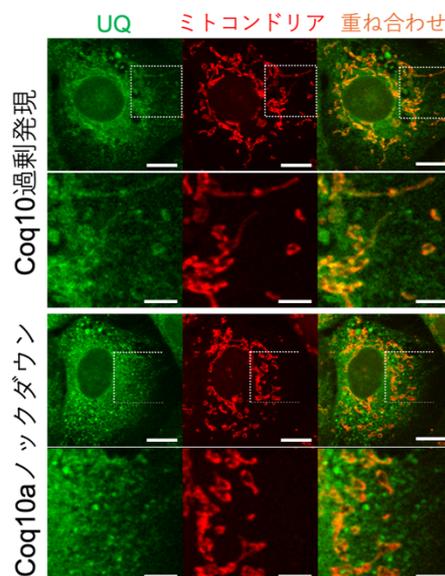


図1. 細胞内UQの可視化

次に、COQ10A がミトコンドリアに局在することを考慮して、COQ10A がミトコンドリア内の UQ 局在に寄与する可能性を推測した。そこで、KO 心臓から各細胞分画を抽出し、UQ 量の測定を実施した。その結果、興味深いことに、ミトコンドリアを含まない不溶性の細胞膜分画に限定して UQ 量が増加することを見出した。

この結果を別の方法で検証するため、培養細胞株 H9C2 細胞を利用して Coq10a のノックダウン細胞株と Coq10a 過剰発現細胞株を作製した。これらの細胞株を基に、人工 UQ による細胞内 UQ 分布の可視化技術を新たに確立した。その結果、Coq10a 過剰発現細胞株と比較して、ノックダウン細胞株では UQ がミトコンドリア外に分布することを見出した (図 1)。

これらの結果は、COQ10A は UQ シャペロンとして UQ をミトコンドリア内にアンカーする役割があり、欠損することで、ミトコンドリア外へと放出することを示唆している。

○ 心肥大の原因究明

Coq10a 欠損心臓組織における心肥大の原因を探索するため、RNA-seq 懐石による網羅的な遺伝子発現解析を実施した。その結果、異所的な PPAR 経路の活性化が確認された。PPAR の活性化が心肥大を誘導する先行研究が存在する。そこで、Coq10a KO 心臓における心肥大の原因が、PPAR に起因するか検証するため、PPAR 阻害剤を生後直後から生後 14 日にかけて投与し、心臓における表現型を確認したところ、PPAR 阻害剤が KO マウスの心肥大を鈍化させることを見出した。

では、如何にして PPAR 経路の活性化が生じたか？我々の PPAR タンパク質と UQ のドッキングシュミレーションの結果から、両者の直接的な結合が示唆された。更に Gal4-UAS システムにより実際の結合を検証した結果、PPAR と UQ が直接的に結合する可能性を見出した。つまり、UQ は PPAR タンパク質のリガンドとして機能する新たな仮説を示している。従って、ミトコンドリア外で異所的に局在した UQ が、PPAR 経路を活性化した可能性がある。更に、過去の文献から、PPAR 経路の活性化は、UQ 量増加に寄与することが示されている。つまり、Coq10a 欠損心臓は、異所的な PPAR 経路の活性化が、UQ 量の増加を引き起こしたと推測できる (図 2)。

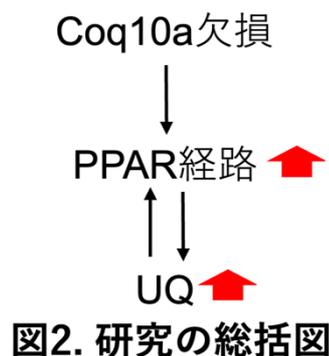


図2. 研究の総括図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬 健太郎
2. 発表標題 内温性獲得に伴う心臓のトレードオフ機構
3. 学会等名 生理研心血管研究会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究協力者	村井 正俊 (Murai Masatoshi) (80543925)	京都大学・農学研究科・准教授	

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
---------	---------