HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	mitoNEET蛋白はミトコンドリアの鉄恒常性を調節している［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	降旗, 高明
Description	配架番号：2231
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12127号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61935
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takaaki_Furihata_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　降旗　高明

学 位 論 文 題 名

mitoNEET 蛋白はミトコンドリアの鉄恒常性を調節している
（mitoNEET regulates mitochondrial iron homeostasis）

【背景と目的】心臓はミトコンドリアが豊富に存在する臓器であり，ミトコンドリア機能の調節は心機能を維持するのに重要である．ミトコンドリアは活性酸素種（reactive oxygen species ; ROS）の最も主要な産生源の一つであり，一度ミトコンドリアが何らかの理由で障害されると，ROS 産生増加自体がさらなるミトコンドリアの機能障害，ROS 産生，細胞障害といった悪循環を引き起こすが，ミトコンドリア障害が起こるきっかけとなる要因や理由は明らかになっていない．鉄は細胞のエネルギー代謝にとって欠かすことのできない微量元素であり，個体の恒常性維持に必要であり，哺乳動物における体内での鉄濃度は厳密に調節されている．細胞質やミトコンドリアにおいて重要な役割を果たしている鉄硫黄クラスターやヘムは，ミトコンドリア内で生成されることが知られており，ミトコンドリアにおける鉄の代謝を明らかにすることは極めて重要である．

mitoNEET はミトコンドリア外膜に局在し，全身に発現し，特に心臓に多く発現することが示された．mitoNEET は鉄硫黄クラスターを含むためレドックスの活性中心として働きうると示され，我々は mitoNEET が鉄代謝を制御している蛋白の可能性があると考えた．今回，心臓におけるミトコンドリアの鉄代謝調整の仕組みに焦点をあて，「mitoNEET がミトコンドリアの鉄恒常性を介して，心筋の機能維持に重要な役割を果たしている」という仮説を立て，この仮説を証明するために，心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスを作製し，実験を行った．

【材料と方法】雄性 C57BL/6J マウスを 4 群とし，それぞれ 3 ヵ月，6 ヵ月，9 ヵ月，12 ヵ月飼育した．次に雄性 C57BL/6J マウスを control 群，新規に作成した雄性 C57BL/6J マウス背景の心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスを mNT KO 群として，3 ヵ月飼育した．また，雄性 C57BL/6J マウスに，シクロスポリン A（CsA）投与群を行った．麻酔後に心エコー検査による心機能評価，屠殺後に各組織重量測定を行った．採取した心筋を用いて，蛋白発現，遺伝子解析，病理組織学的検討，電子顕微鏡による微細構造評価を行った．新鮮な心筋から単離したミトコンドリアを用いて，呼吸能ならびにミトコンドリアの ROS 産生を評価した．また単離ミトコンドリアを用いて，ミトコンドリアの鉄とヘムの定量を行った．蛋白間の相互作用を評価するため，ブルーネイティヴゲル電気泳動法，質量分析，さらに免疫沈降を用いて mitoNEET と結合する蛋白の同定と複合体形成の評価を行った．

【結果】 3 ヵ月，6 ヵ月，9 ヵ月，12 ヵ月飼育した 4 群のマウス心臓を評価したところ，心筋蛋白量ならびにミトコンドリア量で補正した mitoNEET の発現は，3 ヵ月齢と比較して 12 ヵ月齢において有意に減少していた．また、単離ミトコンドリアにおけるミトコンドリア鉄の量を評価し

たところ， 12 ヵ月齢において有意に増加していた．

新規で作成した心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスにおいて，mitoNEET 蛋白をコードする CISD1 遺伝子発現は有意に減少し，また蛋白は心筋において特異的に欠損し，免疫染色では mitoNEET は心筋細胞内に広く発現していることを確認した．ミトコンドリアの鉄量は，Control 群と比較して心筋特異的 mitoNEET 欠損マウス（mNT KO）群で有意に増加していた．ミトコンドリア鉄，細胞質レベルの鉄代謝に関連する蛋白発現については，両群間で有意差はなかった．単離ミトコンドリアの評価において，Complex I に関連する基質を加えた後の ADP に依存した state3 呼吸能ならびに脱共役剤存在下での電子伝達系における最大の呼吸能とも，両群間で有意差はなかった．しかしミトコンドリアの ROS 産生は，state3（0.062 ± 0.003 vs. 0.045 ± 0.003 nmol/min/mg mitochondrial protein），ならびに脱共役剤存在下（0.068 ± 0.004 vs. 0.049 ± 0.004 nmol/min/mg mitochondrial protein），いずれも mNT KO 群で有意に増加していた．電子顕微鏡像では，mNT KO 群の一部で，ミトコンドリアの膨潤とクリスタ構造の崩壊を認めた．

ブルーネイティヴゲル電気泳動法による蛋白複合体の評価を行ったところ，Control 群で 50～150kDa の複合体が帯状に存在していた．mitoNEET の過剰発現系の細胞に免疫沈降を行い，相互作用のある蛋白に対して質量分析の結果より，ミトコンドリアや鉄代謝に関連のある transferrin receptor(TfR)と adenine nucleotide translocator（ANT）を見出した．さらに，マウス心臓による免疫沈降を行ったところ，TfR と ANT は内在性に mitoNEET と相互作用を有していた．ANT が構成要素のミトコンドリア膜透過性遷移孔（mPTP）を CsA 投与によって抑制したところ，CsA 投与群でミトコンドリア鉄が有意に減少していた．

12 ヵ月齢のマウスで評価を行ったところ，Complex I に関連する基質を加えた後の ADP に依存した state3 呼吸能は両群間で有意差はなかったが，脱共役剤存在下での電子伝達系における最大の呼吸能（1960 ± 73 vs. 2458 ± 57 pmol/s/mg mitochondrial protein）と予備能を示す reverse capacity（512 ± 83 vs. 1057 ± 48 pmol/s/mg mitochondrial protein）が mNT KO 群で有意に減少していた．また心機能は，左室拡張末期・収縮末期径とも mNT KO 群で拡大しており，それに伴い左室内径短縮径は減少し，左室機能が有意に低下していた．

【考察】本研究において，ミトコンドリア外膜に存在する mitoNEET という蛋白に注目した．最初に，加齢によってミトコンドリア鉄が増加し，それに mitoNEET の増加が伴っていることを示した．次に，新規に心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスを作成し，心筋において mitoNEET の欠損はミトコンドリア鉄の増加をもたらすことを直接的に示した．さらに既存のミトコンドリアの鉄を調整する機構に関係する蛋白発現に全く変化がなかったため，mitoNEET を介した新たなミトコンドリアの鉄恒常性を調節する仕組みがあることが示唆された．ブルーネイティヴゲル電気泳動法，質量分析，免疫沈降を用いて，mitoNEET 蛋白が TfR と ANT と直接的に相互作用をしていることを示した．TfR によって運ばれた鉄が，mitoNEET と ANT の相互作用の結果として，鉄がミトコンドリアへと運ばれているのかもしれない．mitoNEET の欠損は，mitoNEET を介した TfR から ANT への鉄の流れを妨げているのかもしれない．

【結論】 本研究において，mitoNEET は TfR，ANT と複合体形成し，ミトコンドリア鉄の制御に関わっていた．心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスの心臓において，ミトコンドリア鉄が増加し，それと一致してミトコンドリア由来の ROS 増加，さらにはミトコンドリア機能障害が起こっていることを証明した．したがって，mitoNEET は加齢を含む様々な病態における心筋障害において，ミトコンドリア鉄および ROS 産生を制御することで，重要な役割を果たしていると考えられた．