



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 [全文の要約]
Author(s)	降旗, 高明
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2231 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/61936
Type	doctoral thesis
File Information	Takaaki_Furihata_summary.pdf



学位論文（要約）

**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)**

2016 年 3 月

北海道大学

降旗 高明

1. 緒言

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、ひとたび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について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。

2. 方法

全ての動物実験手技並びに飼育保管は、「北海道大学動物実験に関する規程」、「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に沿って実施した。

雄性 C57BL/6J マウスを 4 群とし、それぞれ 3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月飼育した。次に雄性 C57BL/6J マウスを対照群、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 ヶ月飼育した。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からの 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、ブルーネイティブゲル電気泳動法、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についての評価を行った。データは平均値±標準誤差で表記し、2 群間の平均値の差の検定には Student's unpaired t-tests を用いて行った。また多群間の平均値の差の検定は analysis of variance (ANOVA) を用いて行い、有意差が認められた場合に post hoc test として Tukey の多重比較法により検定した。P<0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

3. 結果

3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月飼育した 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 ヶ月齢と比較して 12 ヶ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 ヶ月齢において有意に増加していた。心臓以外の臓器として、腎臓における mitoNEET

蛋白の発現を評価したところ、心臓と同様に 3 ヶ月齢と比較して 12 ヶ月齢において有意に減少していた。

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、対照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。

12 ヶ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。

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、対照群で 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。

4. 考察

我々は、今回ミトコンドリア外膜に存在する mitoNEET 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 蛋白の減少が伴っていることを示した。さらに、mitoNEET と鉄の関係は、特定の心疾患だけに起こるだけでなく、生理的に普遍的な現象であると示唆される。次に、新規に心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスを作製した。心筋において、mitoNEET 蛋白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ことより、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る。

我々は、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 は、細胞膜で鉄-トランフェリン-TfR の複合体を形成し、エンドサイトーシスされ細胞質へと運ばれる。さらに、この複合体は細胞質からミトコンドリアへも運ばれる可能性が示唆される。ANT はミトコンドリア内膜

に存在し、mPTP を構成している．いくつかの物質についてはこの mPTP が細胞質とミトコンドリア間の物質移動の通り道になっていることが示され、mPTP が鉄のミトコンドリアへの流入にも関与している可能性が考えられる．実際、mPTP を構成するサイクロフィリン D の阻害剤によってミトコンドリアの鉄は減少することより、mPTP を通してミトコンドリアへの鉄流入が起きていると示唆された．mitoNEET 蛋白の欠損は、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．

対照マウスと比較して mNT KO マウスは組織学的には構造は保たれ、また心エコー上での評価でも全般的な心機能は保たれていた．一方、電子顕微鏡による微細構造の評価では、mNT KO マウスではミトコンドリアの構造は一部で障害されていた．これらの結果は、mitoNEET の欠損が一義的にミトコンドリア鉄の負荷ならびに ROS 産生の増加、そして二次的にミトコンドリアの機能障害を引き起こしていると考えられる．今回の研究では、ROS 産生の程度は同じにもかかわらず、3 ヶ月齢のマウスでは保たれていた予備能が、12 ヶ月齢のマウスでは低下していたが、これは長期間の ROS 暴露がもたらしたものと思われる．

5. 結論

結論として、mitoNEET は TfR、ANT と複合体を形成することで、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き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．