

博士論文

ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL の  
心機能維持における役割の解析

徳山 剛士

# 目次

---

1	緒言	・・・1
	1. ミトコンドリアの機能維持	
	2. ミトコンドリアダイナミクスによる機能制御	
	3. MITOL (別名 : March5) について	
	4. 虚血性心疾患	
	5. 心疾患とミトコンドリアの関連	
	6. これまでの結果	
2	結果	・・・16
	1. MITOL は Drp1 を基質として分解している	
	2. 急性的な MITOL 欠損によるミトコンドリアの断片化	
	3. MITOL は虚血環境条件下においてダウンレギュレーションされる	
	4. MITOL は心筋虚血条件下においてもダウンレギュレーションされる	
	5. 慢性的な MITOL 欠損は細胞老化を起こす	
	6. 心筋特異的 MITOL 欠損マウスは心機能低下を引き起こす	
	7. 心臓における MITOL の欠損は心臓老化を亢進させる	
	8. 心臓における MITOL の欠損は早期からミトコンドリアを断片化させる	
	9. ミトコンドリア断片化因子 Drp1 による影響で MITOL 欠損マウスは心不全をきたす	
	10. 心筋特異的 MITOL 欠損マウス心筋細胞中のミトコンドリアは機能異常を起している	
	11. 過剰なミトコンドリア断片化によるクリステ崩壊によって呼吸鎖複合体に異常生じ活性酸素種の漏出が増大する	

3	考察	・・・ 50
	1. 本論文における主張	
	2. MITOL を用いた心筋虚血における心筋毒性治療の可能性	
	3. MITOL の生理学的な存在意義	
	4. 今回の研究成果の学術的・臨床的意義	
	5. Drp1 によるミトコンドリア断片化の毒性に対する新たな知見	
4	総括	・・・ 56
5	参考文献	・・・ 57
6	実験試薬・操作	・・・ 64
7	謝辞	・・・ 90

# 緒言

## 1 ミトコンドリアの機能

ミトコンドリアは細胞内エネルギーを生産する細胞内小器官のひとつである。構造的な特徴として外膜 (Outer Membrane)、内膜 (Inner Membrane) からなる2層の膜構造を持っており、これら膜間スペースのクリステ (Cristae) および、マトリックス (Matrix) とよばれる内腔を持つ (図 1)。ミトコンドリアの主な生理的役割は電子伝達系の反応を介した、酸化リン酸化によるエネルギー (ATP) 生産である。ミトコンドリアの電子伝達系は呼吸鎖複合体によって維持されている。この呼吸鎖複合体は I ~ IV の4種類があり、全てミトコンドリア内膜に存在している。I → III → IV の順に NADH の酸化によって得られた電子が伝達され、呼吸鎖複合体がプロトンを外膜と内膜の膜間腔領域へ能動輸送する。このとき輸送されたプロトンによって、膜の内外に電気生理的ポテンシャルが生じ、膜電位ができる。これら呼吸鎖複合体によって作られたプロトン濃度勾配は、ATP 合成酵素に利用され、最終的に ATP が合成される。近年、これら呼吸鎖複合体はそれぞれがさらに超複合体 (supercomplex) を構成し、この結果それぞれの複合体が近接することで効率よくプロトンを汲み出していることが明らかとなっている。

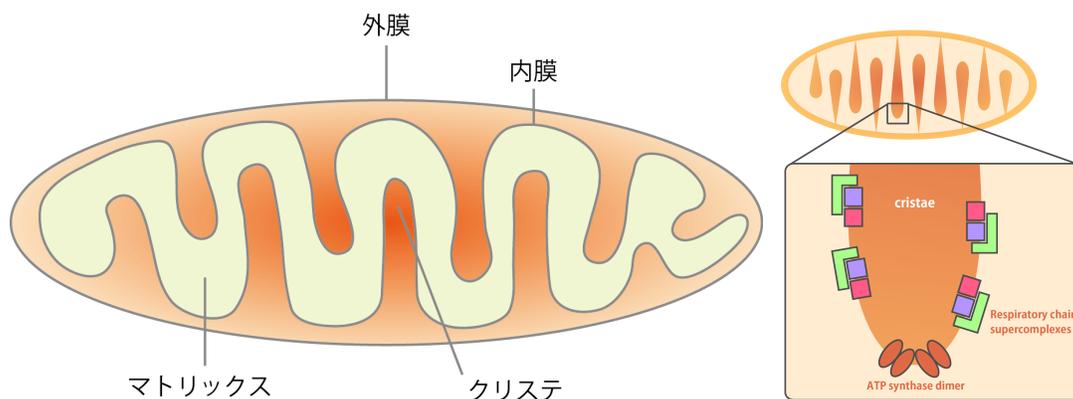


図 1) ミトコンドリア構造と超複合体の形成

電子伝達系を担う呼吸鎖複合体はミトコンドリア内膜に存在し、クリステの構造に沿ってきれいに配置されている。呼吸鎖複合体は内膜上で supercomplex を形成し、効率よく電子伝達系を動かしている。

### ミトコンドリアは細胞内毒素である ROS を産出する

我々ヒトは一日に必要なカロリーの大半をミトコンドリアの酸素呼吸から得ている。このことから分かるように、ミトコンドリアでは大量の酸素を常に消費しているが、この全代謝酸素の2%は活性酸素種である ROS として産生されてしまう。この ROS は通常の酸素分子よりも活性化された酸素分子であり、その酸化力の強さからタンパク質や DNA へ酸化損傷を与える。ROS の産生量は酸素濃度が急激に上昇した場合や、呼吸鎖が障害された際に著しく上がる。つまりミトコンドリアの機能が傷害された場合に産生量が増加することが広く知られている。活性酸素種である ROS は、主な発生源としてミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖複合体から産生される。このうち複合体 I ~IV は心筋虚血ストレスによる傷害を受けることが明らかになっており

(Casademont and Miro, 2002; Chen et al., 2008)、この障害の結果、ROS 産生が亢進し mtDNA などにダメージが蓄積する (Hausladen and Fridovich, 1994)。このように心臓ではストレスがかかる際に ROS の leak が起き、様々な障害を引き起こす。このことから心臓とミトコンドリア、ROS の関連性の高さが伺える。さらにこの点に加えて、先天的に呼吸鎖に傷害をきたす場合、心臓の奇形および個体の致死が生じることからも (Ingraham et al., 2009)、ROS と心臓の密接な繋がりが伺える。今回の要点である心臓病と ROS の関連報告については、心臓における ROS は高血圧・心筋症・心肥大・心不全・虚血再灌流障害などの発症に関与するという研究報告がある

(Dhalla et al., 2000)。これらのことから、「心臓-ミトコンドリア-ROS」という軸があることが分かる。そしてこの ROSこそが心筋細胞における細胞死の1つの要因であることが in vitro の実験で明らかになっている (Aikawa et al., 1997; von Harsdorf et al., 1999)。

### ミトコンドリアは他のオルガネラとコミュニケーションを取る

ミトコンドリアは単独で細胞内を動き回るのではなく、他のオルガネラとネットワークを形成しながらその機能を調節している。ミトコンドリア融合因子である Mfn2 (Santel et al., 2001) を通して、ミトコンドリアと小胞体は物理的に近接し MAM と呼ばれる接着点をつくる (de Brito et al., 2008)。この MAM の意義として、小胞体

- ミトコンドリアのカルシウムイオンの受け渡しが提言されている (Rizzuto et al., 2006; Rizzuto et al., 1993; Ishii et al., 2006)。この 2 つのオルガネラが近接することでカルシウムイオンがミトコンドリア内へ移送され、ATP 産生能力の調節が行っているとされる (Csordas et al., 2006; Dorn GW 2<sup>nd</sup> et al 2010; Dorn GW 2<sup>nd</sup> et al 2013) (図 2)。また、ミトコンドリア分裂の際に小胞体がミトコンドリアを締め上げるという報告もあり、物質輸送だけでなく形態制御にもオルガネラネットワークが関わっていることが示唆されている (Friedman et al., 2011)。

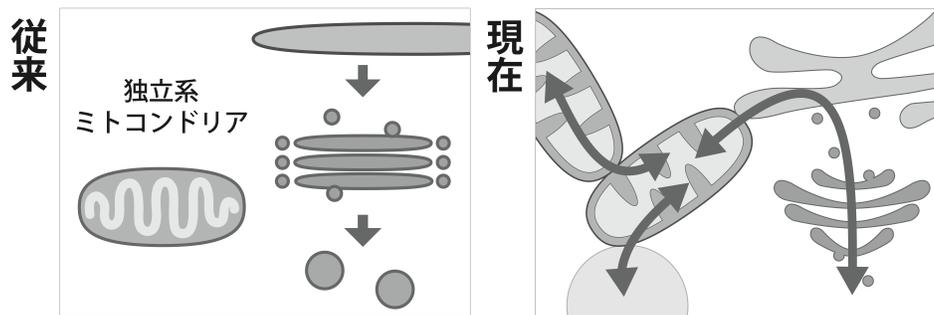


図 2) ミトコンドリアネットワーク

従来の概念ではオルガネラは各々が独立して機能しているとされていた。近年の研究成果より、オルガネラは付近の他のオルガネラと接着・協調することで自身の活性を調節していることが明らかになりつつある。

## 2 ミトコンドリアダイナミクスによる機能制御

1914 年、Lewis and Lewis らは「ミトコンドリアは可変的であり、どの形態のミトコンドリアも、他のミトコンドリアと融合して糸状になったり、分裂してボール状になる」というミトコンドリアダイナミクスの概念を提唱した (Archer SL. 2013)。現在ではミトコンドリアを染色する蛍光色素を用いて生細胞を観察すると、網のように張り巡らされたミトコンドリアネットワークと、融合と分裂を頻繁に繰り返しているミトコンドリアの様子が容易に観察できる。ミトコンドリアの分裂は、細胞質に存在する Drp1(dynamamin-related protein 1)と呼ばれるタンパク質が、ミトコンドリア外膜上に存在する Drp1 のレセプターを介して、ミトコンドリアに移行することによって生じる。移行した Drp1 はミトコンドリアの外膜上で多量体を形成し、リング様構造を構築してミトコンドリアを締めつけるように分裂させる。一方、ミトコンドリアの

融合には、外膜上に存在する **mitofusins** 同士が手をつなぐことにより外膜の融合が起こり、次いで内膜に存在する **OPA1(optic atrophy 1)**による内膜の融合によってミトコンドリアの融合が完遂する。重要なことは、ミトコンドリアダイナミクスの制御がミトコンドリアの機能調節に直結しているということである。異常なミトコンドリアは、正常なミトコンドリアと融合しながら、中身の一部を交換することで修復に関与していると考えられている。一方、ミトコンドリアの分裂は不良ミトコンドリアの排除機構であるマイトファジーを誘導することで、ミトコンドリアの質的管理に関与している。また、ミトコンドリアの分裂は、クリステ構造の改変に伴う呼吸鎖複合体の形成と活性を制御することによりミトコンドリアのエネルギー代謝の調節に関与している可能性が示唆されている。実際に心筋細胞においては、ミトコンドリアの分裂によりエネルギー産生基質が脂肪酸からグルコースへスイッチすることが報告されている。したがって、ミトコンドリアダイナミクスの破綻はミトコンドリア機能の低下を引き起こして、様々な疾患の病態や発症の原因になっている可能性が考えられる。

下に示す因子によってミトコンドリアは形態変化していることが明らかになっている (図 3)。

分裂: Drp1 (Smirnova et al., 1998) / Mff (Otera et al., 2010) / hFis1 (Yoon et al., 2003)

融合: Mfn1/ Mfn2 (Santel et al., 2001)

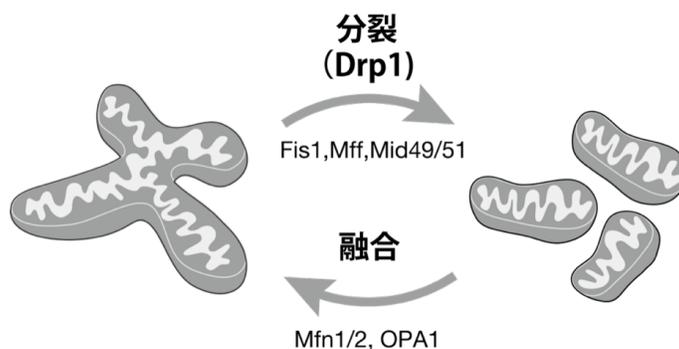


図 3) ミトコンドリアダイナミクスを制御する因子

ミトコンドリアの形態は、融合と分裂のバランスにより制御されている。これらを制御する分子として、外膜の融合は Mfn1/2、内膜の融合には OPA1 が関わっている。一方の分裂は、Drp1 によって制御されており、この Drp1 のミトコンドリアへの移行に必要なアダプター分子として Mff などが見つかっている。

### 3 MITOL (別名 : March5) について

MITOL は当研究室で同定されたミトコンドリアユビキチンリガーゼである。MITOL はミトコンドリア外膜に局在しており、RING finger ドメインを N 末端に有する E3 ユビキチンリガーゼである。TM (transmembrane) ドメインを 4 つ持ち、4 回膜貫通型として局在している (図 4)。

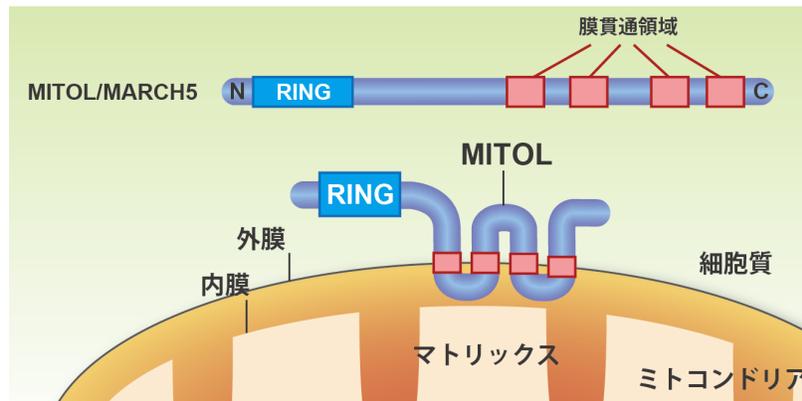


図 4) MITOL の構造

MITOL は N 末端に RING ドメインを持ち、4 つの膜貫通領域を持っている。MITOL はミトコンドリアの外膜に 4 回膜貫通型として存在する。従って、MITOL はミトコンドリア上のタンパク質を基質としてユビキチン化する。

MITOL の機能として、現在までに以下の内容が報告されている。

- 1、ミトコンドリア分裂因子である hFis1、Drp1 をユビキチン化し、分解を促進することでミトコンドリアの形態制御を行っている (Yonashiro et al., 2006) (図 5)。
- 2、筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子である SOD1 (superoxide dismutase) の変異型タンパクである mSOD1 はミトコンドリアに異常蓄積する。このミトコンドリアへの mSOD1 の蓄積が病態発症に関わっているとされる (Deng et al., 2006)。同様にポリグルタミン病においても異常伸長した polyQ がミトコンドリアに蓄積することが、神経毒性のメカニズムとして注目されている。MITOL

はこれら mSOD1 / polyQ に特異的に結合・ユビキチン化し、分解を促進することで毒性を回避し細胞の質的管理を行っている。(Yonashiro et al., 2009; Sugiura et al., 2011)。

- 3、MITOL が一酸化窒素(NO)によって修飾された微小管関連タンパク質である MAP1B-light chain 1(LC1)を選択的にユビキチン化する。分解を促進することで細胞内における毒性を回避することを報告している(Yonashiro et al., 2012)。
- 4、ミトコンドリアと小胞体をつなぐ Mfn2 を MITOL がユビキチン化し活性化させることで MAM 形成を促進し、オルガネラネットワークを構築していることが明らかとなっている (Sugiura et al., 2013)。

以上のように当研究室は細胞内において MITOL がミトコンドリアの形態制御や質的管理、細胞内の毒性回避、オルガネラネットワークにおいて重要な役割を担うことを明らかにした。しかしながら、その生体レベルにおける役割については未知な部分が多く、MITOL の in vivo における生理的機能を明らかにすることが課題となっている。

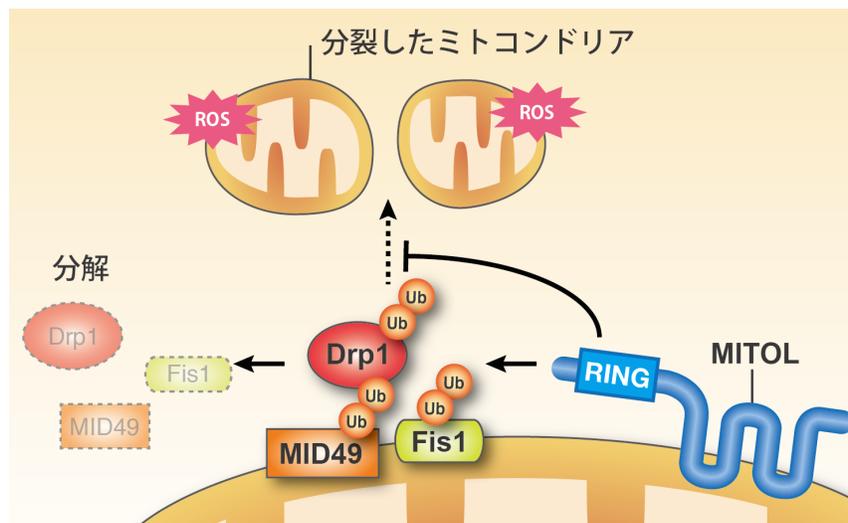


図 5) MITOL は過剰なミトコンドリアの分裂を抑制する

MITOL はミトコンドリア上に移動した Drp1 を基質とし、ユビキチン化する。ユビキチン化された Drp1 はプロテアソーム依存的な分解を受け、その結果ミトコンドリアは過剰な分裂から逃れられる。この他、Drp1 のレセプターである MID49 や Fis1 も MITOL は同様にユビキチン化、分解をしている。よって、MITOL は過剰なミトコンドリアの断片化を抑えている。

## 4 虚血性心疾患

心臓は血液を全身へ循環させるポンプであるが、心臓自身への血流は冠動脈という血管によって維持されている(図6)。虚血性心疾患とは、この冠動脈が狭まる(狭心症)・閉塞する(心筋梗塞)ことで心臓への血流が滞り、心臓の機能が低下する疾患である。厚生労働省発表の「人口動態統計の概況」によると、平成27年の死因別死亡総数のうち心疾患によって亡くなった方は全体のおよそ15.2%を占めており、がんに次ぐ第2位となっている。この心疾患の全体のうち心筋梗塞を原因とした虚血性心疾患はおよそ19%、その他を原因とする虚血性心疾患が18%であり、心筋梗塞を原因とする虚血性心疾患は日本における死因の上位に位置している。また、虚血性心疾患は加齢とともに発症リスクが増加する傾向にあり、若年層よりも中高齢の病气と捉えられる。近年、食生活の欧米化などが影響した結果、若年層の発症率が増加しており、発症リスクが最も高い年齢は40歳～50歳の壮年者と変化してきている。また、心不全は発症後5年生存率が約50%と非常に低く、予後が極めて悪い(Levy et al., 2002)。予後が悪く、今後も罹患率が増加するであろうと予想される虚血性心疾患は、いち早く効果的な治療法を発見することが急務である。

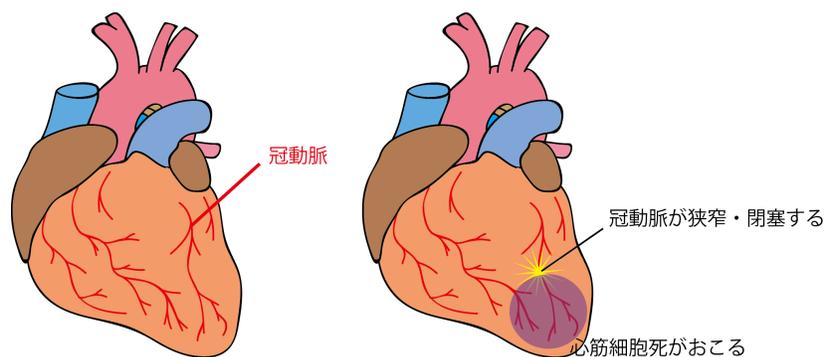


図6) 心臓と冠動脈の関係

心臓への血流は冠動脈によって保たれている。冠動脈が狭窄・閉塞した場合、血流が届かず心筋細胞死がおこる。

## 5 心疾患とミトコンドリアの関連

心臓は絶えず収縮を繰り返しており、その原動力となっている ATP はミトコンドリアによって生産されている。他の筋肉と比べ常に収縮・弛緩を繰り返す心臓は多くのエネルギーを必要とするため、心臓を形作る心筋細胞には大量のミトコンドリアが存在する。心筋細胞に対するミトコンドリアの量は約 30~40%とされており、他の細胞の約 10~20 と比べて極端にミトコンドリアの含有率が高い(Mela-Riker et al., 1985)。このことからミトコンドリアの機能が直接的に心機能へ影響を及ぼすことが想像できる。(図 7) に示す電子顕微鏡写真のように、心筋細胞内のミトコンドリアは筋線維の間に一列に綺麗に並んで配置している。また、構造的に筋小胞体等とネットワークを形成しているなど、心機能を支える上でミトコンドリアが重要な役割を担っていることが分かっている (Hoppela et al., 2009)。前述したように心臓にはミトコンドリアが多く含まれており、ミトコンドリアの機能不全が直接心臓の機能へ影響することが予測される。ミトコンドリアは融合と分裂のバランスをもって自身の形態を維持している。そしてこのバランスが崩壊し機能不全ミトコンドリアが増加すると、心疾患を引き起こすことが報告されている (Li et al., 2010; Wang et al., 2011)。この結果と相関し、心疾患発症心臓を観察すると異常な形態を持ったミトコンドリアが観察されることも分かっている (Schaper et al., 1991; Hom and Sheu, 2009)。これらより、ミトコンドリア形態と心不全との間には密接な関連があると考えられる。

心不全は虚血性心疾患・高血圧・弁膜症などの明白な原因がある一方で、加齢とともに発症リスクが上昇する加齢関連疾患の一つとも考えられ、心臓老化が心不全の発症や増悪の一つの基盤にもなっている。心臓老化は、虚血性心疾患や心筋症、高血圧症などの種々のストレスが慢性的に心筋に負荷されることによって促進すると考えられているがその実態はよくわかっていない。病理学的所見としては線維化の亢進とリポフスチンやアミロイドの沈着が認められている。一方、心臓老化とミトコンドリアの機能との関連が報告されている。ミトコンドリア DNA の修復能を低下させた遺伝子改変マウスは、早期老化の徴候がみられ心筋症を発症することが示されている。また、老齢マウスの心筋において異常なミトコンドリアが蓄積していることや、酸化ストレスやミトコンドリアの機能異常が心不全の発症に関与していることが報告されて

おり、ミトコンドリアの機能異常が心臓老化や心不全の病態に関与していることが推測されている。

心筋梗塞発症急性期以外で、虚血性心疾患などでみられる憎性心機能低下には、心臓にエネルギーを供給する心筋のミトコンドリア機能異常と、その結果として起こる心筋細胞死が大きく寄与する (Rosca MG et al., 2013、Dai, D. F. et al., 2011)。しかしながら、ミトコンドリアの形態異常が「なぜ・どのようにして」心疾患を引き起こすかは多くが明らかにされておらず、根本的な治療法開発のために新規の関連因子の同定が期待されている。

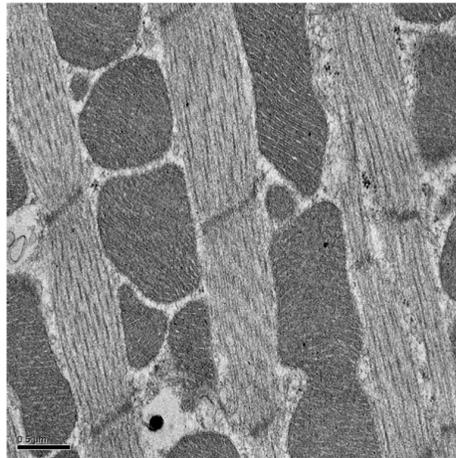


図 7) 心筋細胞内のミトコンドリア形態

電子顕微鏡を用いて心筋細胞のミトコンドリアを観察すると、ミトコンドリアの高電子密度のため黒い画像として表現される。筋原線維に沿ってミトコンドリアが埋め尽くされている様子がわかる。

## 6 これまでの結果

心不全の発症には、心臓にエネルギーを供給する心筋のミトコンドリア機能異常と、それに関連して起こる心筋細胞死が大きく寄与している (Rosca MG et al. 2013; Dai, D. F. et al. 2011)。また、ミトコンドリアはダイナミックに構造を変化(融合・分裂)させて ATP 合成などの活性を調節している (Archer SL. 2013)。近年、このミトコンドリアダイナミクスが細胞死の本質的な過程に関与すること、そしてこれが心疾患発症に重要であることが明らかとなり、臨床や創薬分野で特に大きな注目を集めてい

る。実際に心不全患者の心筋ではミトコンドリアの形態的異常が観察され、細胞死に伴った線維化が見られる(図 8)。しかしながら、心不全の病態を決定するこれらの分子機構は未だ不明な点が多く、根本的な治療法の開発のためにはより多くの関連因子の同定が不可欠である。

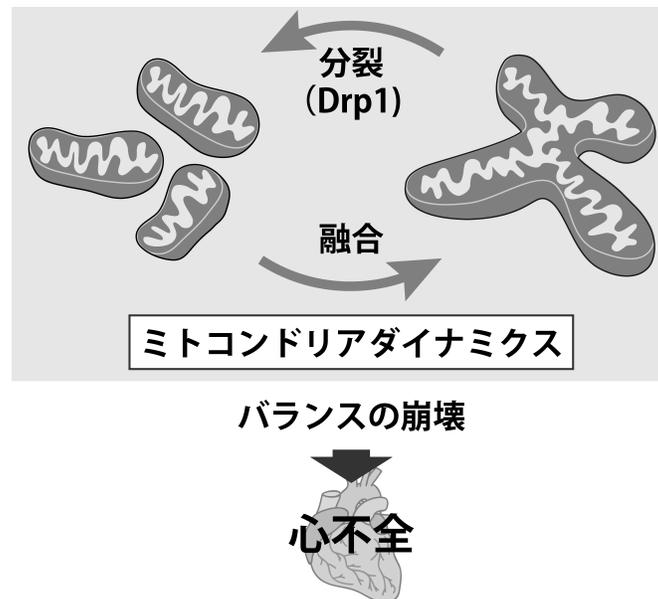


図 8) ミトコンドリアダイナミクスと心不全

ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返して自身の形態をダイナミクスに変化させている。この形態変化に異常が出た場合、ミトコンドリアの機能は低下し、心臓においては ATP の枯渇や ROS の産生を通して心機能低下が引き起こされる。

上記のように、世界的にミトコンドリアダイナミクスの関与する様々な生命現象・病態が議論されている。しかし、それら個別の機序についての分子理解は、哺乳動物では極めて不十分である。にもかかわらず、生理的意義の議論が拡大することで多くの矛盾点が浮き彫りとなり、大きな問題となっている。

そこで我々は、ミトコンドリア膜型ユビキチン結合酵素「MITOL(Mitochondrial ubiquitin ligase) / MARCH5」の分子基盤と、その動態およびシグナル発信における機

能を組織・個体レベルで解明し、心不全病態に関する従来のミトコンドリアダイナミクス理解を飛躍的に革新するための研究を進める目的で研究を進めた。

本研究は、2006年に当研究室で発見されたミトコンドリア制御因子MITOLの心機能へ与える影響を解析し、心筋虚血の発症・悪化の根本的原因を見つけることを目的とする。具体的に、MITOLは基質をユビキチン化し分解・活性化を行うことでミトコンドリアの機能を保っている（Yonashiro R et al. 2006）。このことからミトコンドリア上に存在する因子をMITOLが基質としていると想定し、この因子とMITOLの相互作用が心機能維持に与える影響と役割を解明する。

我々は現在までに、以下の結果を得ている。

- 1、心筋特異的MITOL欠損マウスはタモキシフェンによるノックアウト誘導後6ヶ月経過した時点で顕著な心機能低下を示す。
- 2、心筋特異的MITOL欠損マウスはタモキシフェンによるノックアウト誘導後6ヶ月経過した時点で顕著な細胞死と、これに伴う心筋細胞の線維化が亢進している。
- 3、心機能低下を示していないノックアウト誘導後3ヶ月のマウスに大動脈結紮により心臓に圧負荷を加えると、MITOL欠損マウスは同様に心機能低下が起こる。
- 4、MITOL欠損マウス心筋細胞はダメージが蓄積しており、収縮率の低下とミトコンドリアの形態異常が観察される。

以上の結果のようにMITOLを心臓において欠損させると、細胞死を伴う心不全を発症することが分かっている。よって、MITOLは心機能を維持する上で重要な役割を担っていることが示唆される。しかしながら、

- ・どのようなメカニズムによって心機能低下が引き起こされているのか
- ・MITOLの病態生理的意義は何なのか

などの問題点については言及できておらず、さらなる研究を進める必要がある。

## これまでの結果の概略

### I、心筋特異的 MITOL 欠損マウスの作製の確認

PCR 法による遺伝子型の確認

MerCreMer の心臓特異的な発現確認（ウェスタンブロット法）

タモキシフェン投与形態の条件検討

ウェスタンブロット法による MITOL の欠損確認

### II、心筋特異的 MITOL 欠損マウス の心機能評価

心エコーによる心機能評価

心臓肥大の確認（心重量の測定）

心不全マーカーの確認

線維化と細胞死の確認（組織学的解析）

アポトーシスの活性化（ウェスタンブロット法）

### III、大動脈結紮負荷における心筋特異的 MITOL 欠損マウスの表現型

心エコー解析

経時的な心機能評価

組織学的解析（マッソントリクローム）

初代心筋細胞の収縮力の測定

初代心筋細胞の細胞内カルシウム濃度の測定

### IV、オートファジー活性の評価

蛍光免疫染色によるミトコンドリア形態の観察

免疫染色によるオートファゴソームマーカー LC3 の確認

## 結果

---

### MITOL は Drp1 を基質として分解している

現在までの研究報告より MITOL はミトコンドリア分裂因子 Drp1 を分解することでミトコンドリアの機能を維持していることが示唆されている。しかし、これらの結果は過剰発現系における検証に留まっており、ユビキチン化サイトや結合ドメインなどの同定には至っておらず、実際に MITOL が Drp1 を生理的基質としてユビキチン化しているかどうかは明らかでない。そこでまず始めに MITOL が実際に Drp1 を基質としているのかどうかについて詳細な検証を行うことにした。

まず、MITOL と Drp1 が内在的に結合しているのかどうかを、抗 Drp1 抗体を用いて免疫沈降を行い検証した。その結果、内在の Drp1 と MITOL が結合していることが分かった (Fig.1-A)。既存の報告どおり、過剰発現による結合も確認できた (Fig.1-B)。さらに、GST プルダウンアッセイの結果から MITOL の N 末端と Drp1 の B ドメイン以外で結合していることが分かった (Fig.1-C)。次に、MITOL がユビキチンリガーであることから、結合した Drp1 をユビキチン化していると考え、過剰発現による Drp1 のユビキチン化を確認した。その結果、MITOL の過剰発現により Drp1 のユビキチン化を示す黒いラダーが増加しており、MITOL が Drp1 をユビキチン化していることが分かった (Fig.1-D)。また、MITOL 欠損 MEF に Drp1 を過剰発現した際にはユビキチン化が増加せず、このとき MITOL の発現を一過性に増加させるとユビキチン化が亢進したことから、MITOL が Drp1 を基質としてユビキチン化していることが明らかになった (Fig.1-E)。次に UbPred (predictor of protein ubiquitination sites) によるユビキチン化サイトの予測と mutagenesis による方法を用いて MITOL による Drp1 のユビキチン化サイトを同定した所、MITOL は Drp1 の K256 を少なくともユビキチン化していることが分かった (Fig.1-F)。この K256 を変異させ、ユビキチン化されない変異体 K256R を作成し、この変異体が MITOL による分解を受けなくなるかどうかを検証した。その結果、K256R Drp1 は分解を受けずにミトコンドリア上で過剰に蓄積することが分かった (Fig.1-G)。

## 急性的な MITOL 欠損によるミトコンドリアの断片化

タモキシフェン誘導型の MITOL ノックアウト MEF 細胞を樹立し、MITOL と Drp1 の関係を検証した。タモキシフェンによる MITOL ノックアウト誘導後 4 日目において急激な Drp1 の顕著な蓄積が起これ、この時ミトコンドリアは過剰に断片化されていた (Fig.2-A,B)。逆に、MITOL を MEF 細胞において過剰発現させると、ミトコンドリア画分の Drp1 が分解された (Fig.2-C)。この結果より、MITOL は Drp1 をユビキチン化し分解を促進させていることが明らかになった。ミトコンドリアの断片化は活性酸素種である ROS 産生を亢進させることが分かっているため、MITOL 欠損 MEF における ROS 量を測定したところ、MITOL 欠損においてミトコンドリア由来 ROS が顕著に増加しており、この ROS は Drp1 の抑制剤である Mdivi-1 によって一部抑えられた (Fig.2-D)。よって、急性的な MITOL 欠損による Drp1 蓄積からのミトコンドリア断片化は ROS の増加をもたらし、細胞毒性を発揮していることが明らかとなった。MITOL は過剰な Drp1 蓄積による ROS 産生を抑える分子であることが分かった。

## MITOL は虚血環境条件下においてダウンレギュレーションされる

MITOL と Drp1 の関係が生理的にどのような意味を持つのかを検証するため、ミトコンドリアを断片化させる代表的な刺激である虚血環境に着目し、検証を行った。まず虚血環境条件下における MITOL の挙動を観察したところ、驚くべきことに虚血環境に暴露すると時間依存的に MITOL がダウンレギュレーションされることが分かった (Fig.3-A)。さらに基質である Drp1 量も虚血環境依存的に蓄積することが明らかになった (Fig.3-B)。このとき実際にミトコンドリアが断片化されているかを、免疫染色を用いて確認したところ、虚血環境条件下において顕著なミトコンドリアの断片化が観察された (Fig.3-C)。よって、生理的な虚血環境条件下において MITOL はダウンレギュレーションされ、基質である Drp1 の蓄積とこれに伴うミトコンドリアの断片化が起こることが分かった。

虚血環境条件下における MITOL のダウンレギュレーションはユビキチンプロテアソーム抑制剤である MG132 によって回避できることから、なんらかのユビキチン化による分解を受けていると考えている。

## MITOL は心筋虚血条件下においてもダウンレギュレーションされる

細胞で見られた虚血環境条件下での MITOL と Drp1 の関係が、個体においても見られるのかどうかを確認するため、心筋虚血患者・心筋虚血 (MI) モデル動物を用いて検証した。まず始めに、ヒト心筋虚血患者の心臓中の MITOL 量をウェスタンブロットによって確認したところ、驚くべきことにコントロール群とくらべて劇的に MITOL が減少していることが分かった (Fig.4-A)。同様に、心筋虚血モデルマウス・心筋虚血モデルラットの心臓非梗塞領域でも同様な MITOL の劇的なダウンレギュレーションが確認された (Fig.4-B,C)。またこの時、基質である Drp1 はミトコンドリア画分に蓄積しており、左心室心尖部寄りの心筋組織の電子顕微鏡観察とフローサイトメトリーの結果からミトコンドリアの断片化も観察された (Fig.4-D,E,F)。よって、細胞で見られた病態生理的条件下における MITOL と Drp1 の関連が組織レベルにおいても起きていることが示唆された。

この結果より、心筋虚血による MITOL のダウンレギュレーションによって分裂因子 Drp1 の蓄積が起これ、ミトコンドリアの断片化が亢進した結果、ROS が増加して心筋毒性を発揮していると考えた。つまり、心筋虚血による心臓毒性が MITOL のダウンレギュレーションによる影響なのではと考え、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて MITOL を過剰発現させ、ダウンレギュレーションの程度を減弱させることで、心臓毒性が回避できるかを検証した (Fig.4-G)。心筋梗塞による虚血誘導後 2 日目にウイルスを投与し、14 日後に解剖を行った。その結果、AAV を投与した心臓では虚血による MITOL のダウンレギュレーションが抑えられており、同時に Drp1 の蓄積が一部抑制されていた (Fig.4-H,I)。心不全に伴う心臓肥大を確認したところ、AAV-MITOL を処置した MI ラットにおいて心臓重量の低下傾向が観察された (Fig.4-J)。この時の心筋細胞死に伴う線維化を観察したところ、MITOL を過剰発現させた心臓において心筋虚血による細胞死が抑えられていることが明らかとなった

(Fig.4-K)。よって、心筋虚血による心臓毒性の一部は、MITOL のダウンレギュレーションによる影響である事が分かり、MITOL の心筋虚血における創薬候補の可能性を示唆した。

ここまでの結果から、MITOL の急性的なノックアウト・ノックダウンは、ミトコンドリア分裂因子 Drp1 の蓄積を起し、その結果としてミトコンドリアが過剰に断片化され、ROS の蓄積と細胞死を起こすことが明らかとなった。

### 慢性的な MITOL 欠損は細胞老化を起こす

MITOL 欠損 MEF 細胞の作製の際、タモキシフェンによる急激な MITOL のノックアウトの後に、細胞死を起こさずに生存する細胞群があることに気がついた。このノックアウト後に安定化した stable line の解析を次に行った。この stable line のミトコンドリア形態を観察したところ、急性期と同じようにミトコンドリアの断片化が起きており、分裂因子の Drp1 の蓄積も観察された (Fig.5-A,B,C)。よって、stable line においても急性期と同様な変化が起きていることが明らかになった。ミトコンドリアから漏出される ROS は DNA やタンパク質を傷つけて老化を引き起こすことが言われている。そこで、この stable line において細胞老化が亢進しているかどうかを検証した。その結果、MITOL 欠損安定株において老化細胞を示す青いドットが顕著に観察され、細胞老化が亢進していることが明らかになった (Fig.5-D)。さらに、この細胞老化は Drp1 抑制剤である Mdivi-1 の処置によって回復しており、MITOL 欠損による Drp1 の蓄積が細胞老化を引き起こしている可能性が示唆された (Fig.5-D)。細胞老化の表現系の 1 つである細胞肥大を観察したところ、こちらでも MITOL 欠損細胞において老化を示す細胞の肥大化が観察された (Fig.5-E)。また、MITOL 欠損細胞において細胞肥大とミトコンドリアの形態の関連を観察した結果、面積の大きい老化細胞において特にミトコンドリアの断片化が亢進している結果が得られた (Fig.5-F)。この結果は、細胞老化とミトコンドリア断片化が密接に関与しあっていることを示唆している。よって、慢性的な MITOL 欠損では、急性期と同様に Drp1 による毒性が生じており、このストレスが慢性的に蓄積した結果、細胞老化を引き起こすことが予想された。

## 心筋特異的 MITOL 欠損マウスは心機能低下を引き起こす

慢性的に MITOL を欠損させた際に心機能低下が起こるかどうかを検証するため、心筋特異的 MITOL 欠損マウスを作製した。タモキシフェンによるノックアウト誘導後 6 ヶ月が経過するとこのマウスは心不全を自然発症した (Fig.6-A~D)。このマウスでは心不全の代表的な表現系である心臓の肥大化と、マーカー mRNA の発現増加が確認され、心機能低下が起きていることが分かった (Fig.6-E)。このときの心筋細胞への毒性を確認するため、心筋細胞死に伴う線維化を観察したところ、タモキシフェンによるノックアウト誘導後 6 ヶ月の心臓では顕著な線維化の亢進が観察された

(Fig.6-F,G)。しかしながら、この線維化はタモキシフェンによるノックアウト誘導後 1・3 ヶ月では観察されず、ストレスが蓄積した結果、ノックアウト後 6 ヶ月経過すると細胞死が亢進することが示唆された (Fig.6-F,G)。細胞死が起きているかを TUNEL 染色によって評価したところこちらでもノックアウト誘導後 6 ヶ月の心臓では顕著な細胞死が亢進していることが分かった (Fig.6-H)。

タモキシフェンによるノックアウト誘導後の生存曲線を作成したところ、投与から 2 週間以内に死亡する個体が 3 割ほどいることがわかった (Fig.6-A)。この段階での個体死は、急激な MITOL の欠損による Drp1 の毒性から、急性心不全や不整脈が起きたために起きていると考えている。

## 心臓における MITOL の欠損は心臓老化を亢進させる

次に、心臓においても MITOL 欠損によって老化が亢進しているかを検証した。その結果、ノックアウト後 6 ヶ月の心臓において老化細胞を示す SA- $\beta$ -gal による青色の染色部が顕著に増大していることがわかった (Fig.7-A)。したがって心臓において MITOL を欠損させると心臓老化が亢進することが分かった。心臓では老化が亢進するとリポフスチンと呼ばれる過酸化タンパク質の凝集と考えられている凝塊が観察される。同様に老化した心臓では心筋細胞の肥大も見られる。これら代表的な心臓老化の表現型を観察した結果、予想通り、ノックアウト後 6 ヶ月の心臓においてリポフスチンの沈着と心筋細胞の肥大が観察された (Fig.7-B)。このとき、心臓老化の表現型がノックアウト後 3 ヶ月の心臓においても観察されたことから、心筋細胞死よりも早

期に心臓老化が起きていることが分かった (Fig.7-B)。つまり、心臓において MITOL を欠損させると心臓老化が先に起こり、その後に心筋細胞死が生じて心機能低下になることが分かった。

ノックアウト後 3 ヶ月では心機能の低下は起きていないものの、細胞にストレスは蓄積しており、心臓老化が亢進していることが示唆された。そこで、ノックアウト後 3 ヶ月心臓は圧負荷に対して脆弱である可能性を考え、大動脈を結紮する TAC (transverse aortic constriction) という心ストレスをかけた際の心機能を評価した。その結果、心筋特異的 MITOL 欠損マウスでは、TAC によって顕著に心機能が低下した (Fig.7-C,D)。また、この時の心筋細胞の収縮率を測定した結果、TAC を処置した MITOL 欠損心筋細胞では、細胞自体の収縮率が低下しており、心筋細胞に酸化ストレスが蓄積していることが想像された (Fig.7-E)。

### 心臓における MITOL の欠損は早期からミトコンドリアを断片化させる

MITOL 欠損による心不全の原因を解明するため、MITOL 欠損心臓における心筋細胞中のミトコンドリア形態を観察した。通常、心筋細胞中のミトコンドリアは筋原線維に沿って埋め尽くされるように配置されている。電子顕微鏡観察の結果、MITOL 欠損マウス心臓のミトコンドリアはコントロール群と比較して面積が小さく、断片化していることが分かった (Fig.8-A,B)。心臓からミトコンドリアを単離し、フローサイトメトリーを用いてミトコンドリア形態を評価した場合も同様に、ミトコンドリアの断片化を示す結果が得られた (Fig.8-C)。ノックアウト後 1 ヶ月の心臓におけるミトコンドリア形態を観察したところ、この時点で既にミトコンドリアが断片化されていることが分かった (Fig.8-A)。これらの結果より、MITOL 欠損の心筋細胞中ミトコンドリアは、ノックアウト後早期から小さく断片化していることが分かった。次に、ミトコンドリアの断片化は唯一の GTPase である Drp1 によって制御されている。そこで、MITOL 欠損心臓中の Drp1 量を評価したところ、コントロール群と比べて顕著な Drp1 の蓄積を確認した (Fig.8-D)。よって、MITOL 欠損による心筋細胞中のこれらミトコンドリアの断片化は、Drp1 の蓄積によるミトコンドリア断片化の過剰な亢進によるものと推測された。

心筋特異的ノックアウトマウスの特徴をまとめると、ノックアウト後早期の1ヶ月よりミトコンドリアが断片化し、これに伴う ROS 放出などから心筋細胞にストレスが蓄積し始める。ノックアウト後3ヶ月になると心臓老化が顕著になりはじめ、ノックアウト後6ヶ月の心臓では実際に心筋細胞死と心機能低下が起こり最終的に個体死に繋がると考えている。

### **ミトコンドリア断片化因子 Drp1 による影響で心筋特異的 MITOL 欠損マウスは心不全をきたす**

心筋特異的 MITOL 欠損マウスにおいてミトコンドリアの断片化が確認されたことから、Drp1 によるミトコンドリア形態異常によって、心筋特異的 MITOL 欠損マウスは心不全を起していると考えた。そこで、これを証明するため Drp1 の特異的阻害剤である Mdivi-1 を投与し、心不全の表現型が回復するかどうかを確認した (Fig.9-A)。この時、心臓のミトコンドリア画分における Drp1 量は低下しており、Mdivi-1 が作用していることを確認した (Fig.9-B)。心不全がまだ発症していないノックアウト誘導後3ヶ月のマウスに心不全を起こさせるため、交感神経β刺激薬であるイソプロテレノールによる刺激を行った。浸透圧ポンプによるイソプロテレノール7日間投与によってコントロール群で心不全を誘導できていることを確認した (Fig.9-C)。この心不全が Mdivi-1 によって回復するかをイソプロテレノールと Mdivi-1 の同時投与によって比較した。その結果、コントロール群ではイソプロテレノールによる心臓の肥大に伴う重量の増加や、細胞死に伴う膠原線維の増加が確認された (Fig.9-C,D)。一方の Mdivi-1 投与群では代表的な心不全の所見である心臓重量や線維化の割合が顕著に低下していた (Fig.9-C,D)。また、心不全に伴って現れる心筋細胞の肥大化も回復した (Fig.9-E)。これらの結果から、MITOL 欠損による心機能低下が、Drp1 の機能阻害によって一部回復することを証明した。よって、MITOL 欠損による心不全は Drp1 による影響である可能性が示唆された。

## 心筋特異的 MITOL 欠損マウス心筋細胞中のミトコンドリアは機能異常を起している

MITOL 欠損心臓で観察されたようなミトコンドリアの断片化は、ミトコンドリアの機能を悪化させることが知られている。ミトコンドリアの主な機能は ATP 合成であり、ATP 合成の際には内膜において大量の酸素が消費される。そこでまず、MITOL 欠損心臓中の ATP 量を測定した所、予想通り MITOL 欠損において ATP 量の低下が確認された (Fig.10-A)。次に、MITOL 欠損心臓中のミトコンドリアの機能が低下しているかを確認するため、酸素消費速度を測定した。その結果、MITOL 欠損心臓由来の単離ミトコンドリアの酸素消費は、コントロール群とくらべて顕著に低下していることが明らかとなった (Fig.10-B,C)。また、COX/SDH による活性染色を行った結果、MITOL 欠損において呼吸活性の低下を示唆する青色の染色部位が増加していた (Fig.10-D)。次に、呼吸鎖複合体が存在しているクリステの構造を電子顕微鏡観察によって評価した。その結果、心筋特異的 MITOL 欠損心筋細胞のミトコンドリアクリステが顕著に崩壊していることが分かった (Fig.10-E)。このクリステの崩壊はノックアウト後 1 ヶ月からすでに観察されており、MITOL 欠損の早期から起こるミトコンドリアの過断片化によって誘導されている可能性を示唆した (Fig.10-E)。また、クリステの構造崩壊が起こると、内膜の融合分子である OPA1 が切断を受けることが分かっている。クリステ崩壊の指標として OPA1 の切断効率を確認したところ、ノックアウト後 1 ヶ月より OPA1 の切断型の増加が見られた (Fig.10-F)。よって、心筋特異的 MITOL 欠損心臓では、早期からミトコンドリアの断片化と、クリステの構造崩壊が起きていることが明らかになった。

このような酸素の効率的な消費や ATP の合成が阻害された場合、ミトコンドリアでは ROS と呼ばれる毒素が放出される。解析の結果、MITOL 欠損心臓における ROS の量はコントロール群と比べて顕著に増加しており、その結果として生じる過酸化タンパク質の蓄積も観察された (Fig.10-G,H)。とくに、ミトコンドリア上のタンパク質がほかと比べて顕著に酸化されている結果が得られたことより、MITOL 欠損によるミトコンドリアへのダメージがかなり蓄積している様子が想像できる。

## 過剰なミトコンドリア断片化によるクリステ崩壊によって呼吸鎖複合体に異常生じ活性酸素種の漏出が増大する

ミトコンドリアの形態が呼吸鎖の機能を調節しているという既存の研究報告から、今回の MITOL 欠損マウスにおいても、クリステの崩壊によって内膜に存在する呼吸鎖複合体の異常が生じ、ROS の増大や ATP 合成の低下が起きていると考えた。そこでまず始めに、MITOL 欠損心臓中ミトコンドリアの内膜に存在する呼吸鎖複合体量とそれぞれの活性を評価した。しかしながら、呼吸鎖複合体の各々の量と活性は MITOL 欠損とコントロール群とで差がなかった (Fig.11-A,B,C)。近年、呼吸鎖複合体の活性はそれぞれの呼吸鎖複合体がさらに複合体 (supercomplex) をつくることで機能しているという概念がある。この supercomplex の形成に異常があるかどうかを BN-PAGE を用いて確認した結果、MITOL 欠損心臓ミトコンドリアにおいて supercomplex の形成が低下していた (Fig.11-D)。また同様に内膜に存在し、supercomplex と同じように超複合体を構成する ATP 合成酵素の複合体形成率を BN-PAGE を用いて解析した (Hahn et al, 2016)。その結果、MITOL 欠損において ATP 合成酵素の複合体形成も低下していた (Fig.11-E,F)。よって、MITOL 欠損心臓では内膜の構造崩壊と、呼吸鎖などの超複合体形成異常が起きていることが明らかとなった。これらの機能異常の結果、ROS の増大や ATP 合成の低下が起きていると考えている。

次に、このクリステの構造崩壊がミトコンドリアの過断片化によって引き起こされているかを確認するため、細胞を用いて検証を行った。欠損 MEF では心筋特異的 MITOL 欠損マウスと同様に supercomplex の形成と、ATP 合成酵素の複合体形成が低下していた。この複合体形成低下は Drp1 の特異的阻害剤である Mdivi-1 によって一部回復した (Fig.11-G,H)。よって、ミトコンドリアの過断片化による外膜・内膜の強制的な構造変化によって内膜の呼吸鎖群に異常が起きていると推測された (Fig.12)。MITOL 欠損におけるミトコンドリアの機能異常は、基質である Drp1 の異常活性化によって外膜・内膜の構造変化が生じ、その結果、呼吸鎖複合体・ATP 合成酵素の活性が低下して引き起こされている可能性が示唆された (Fig.13)。

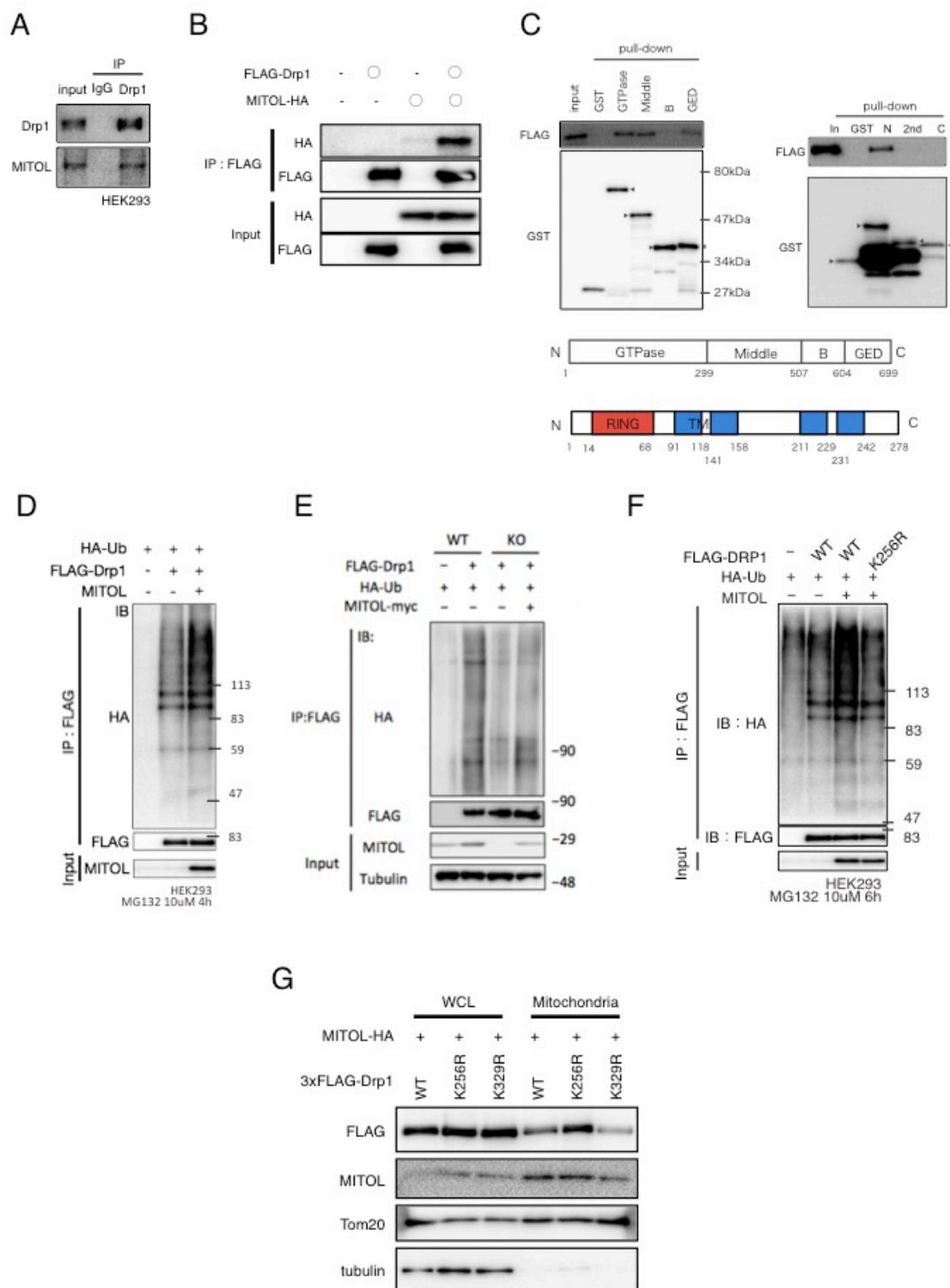


Figure.1 Drp1 は MITOL の基質であり、MITOL は Drp1 の K256 をユビキチン化して分解を促進している

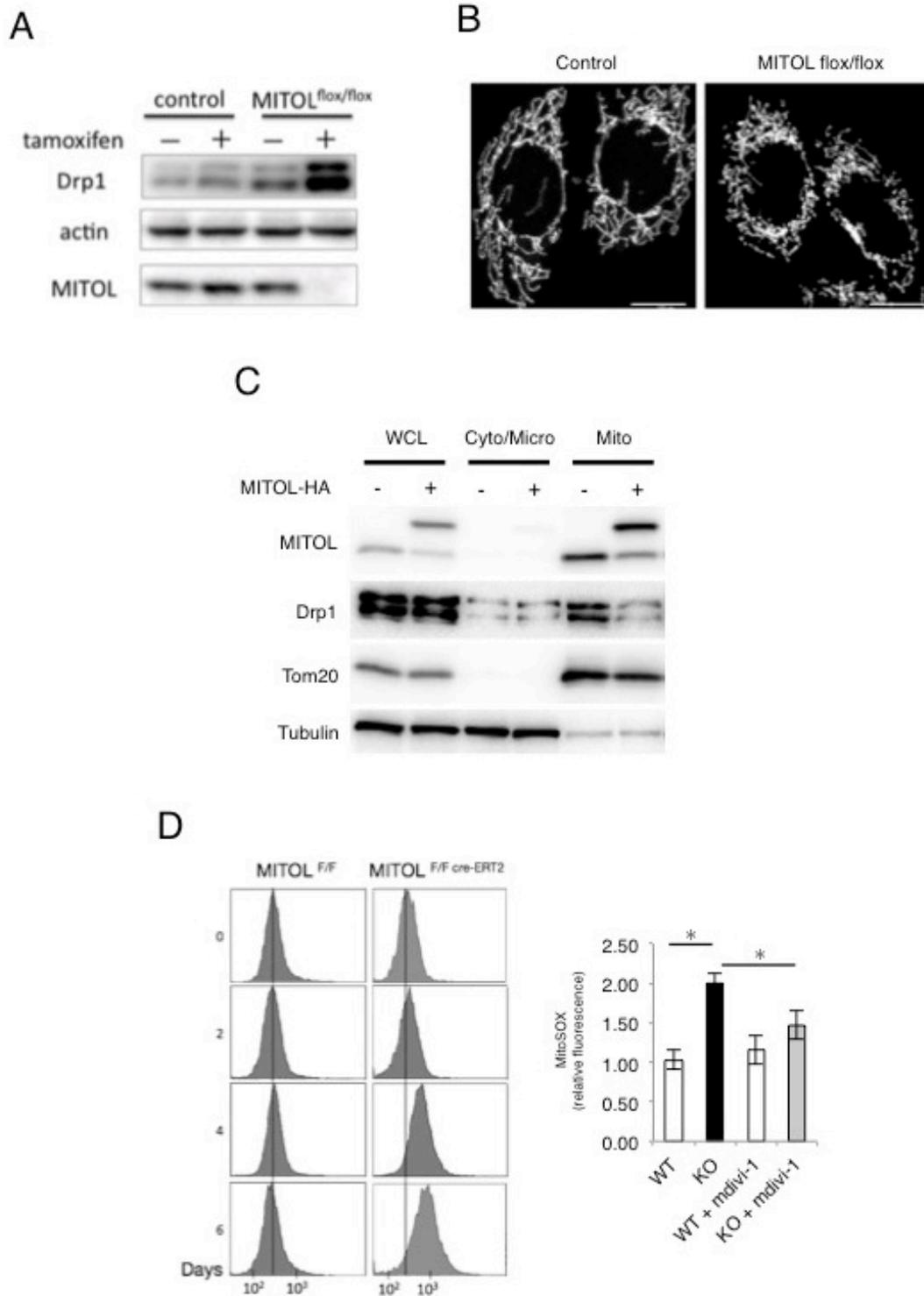


Figure.2 急性的に MITOL を欠損させると Drp1 の蓄積とミトコンドリアの断片化が起こる

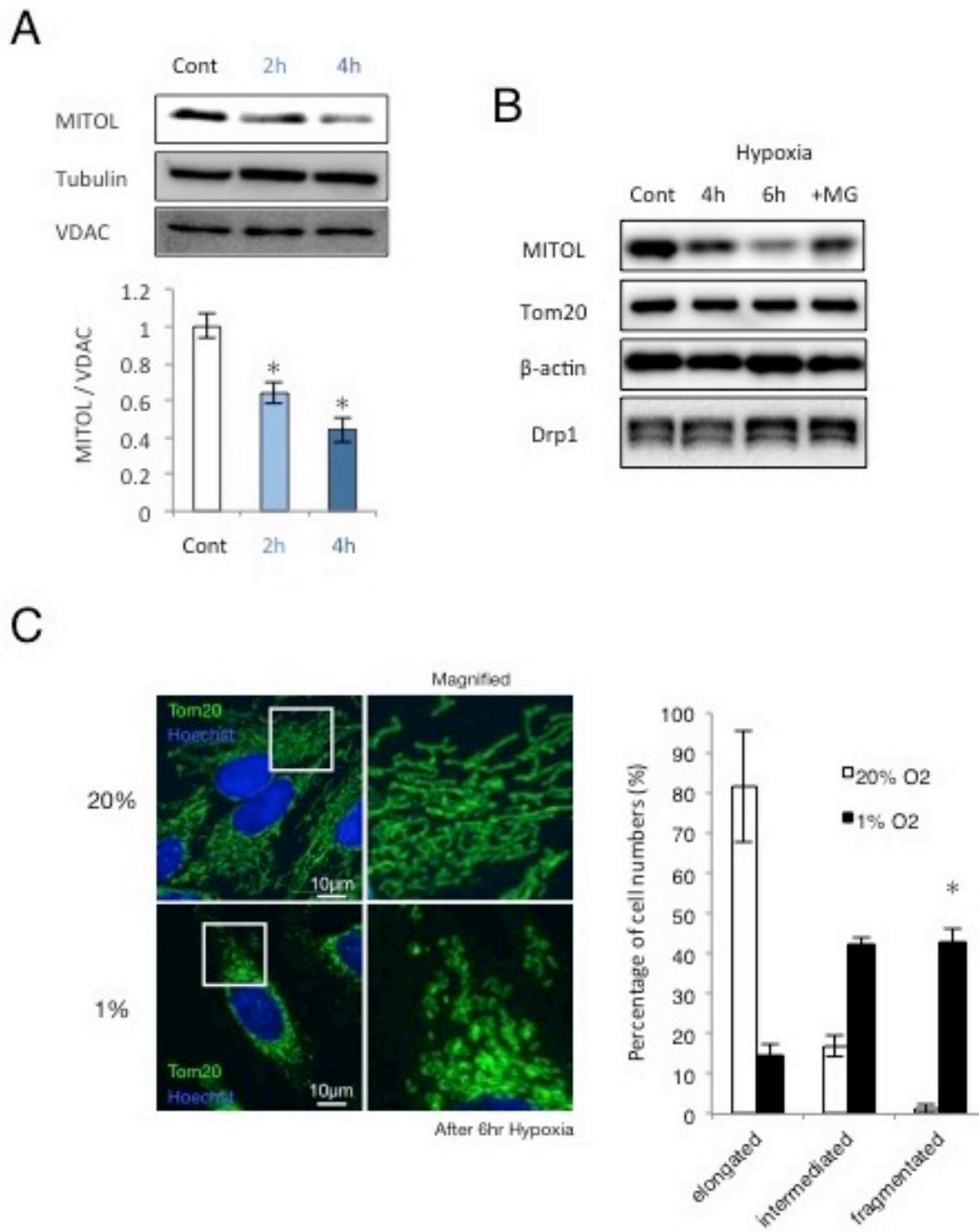


Figure.3 低酸素において MITOL はダウンレギュレーションされる

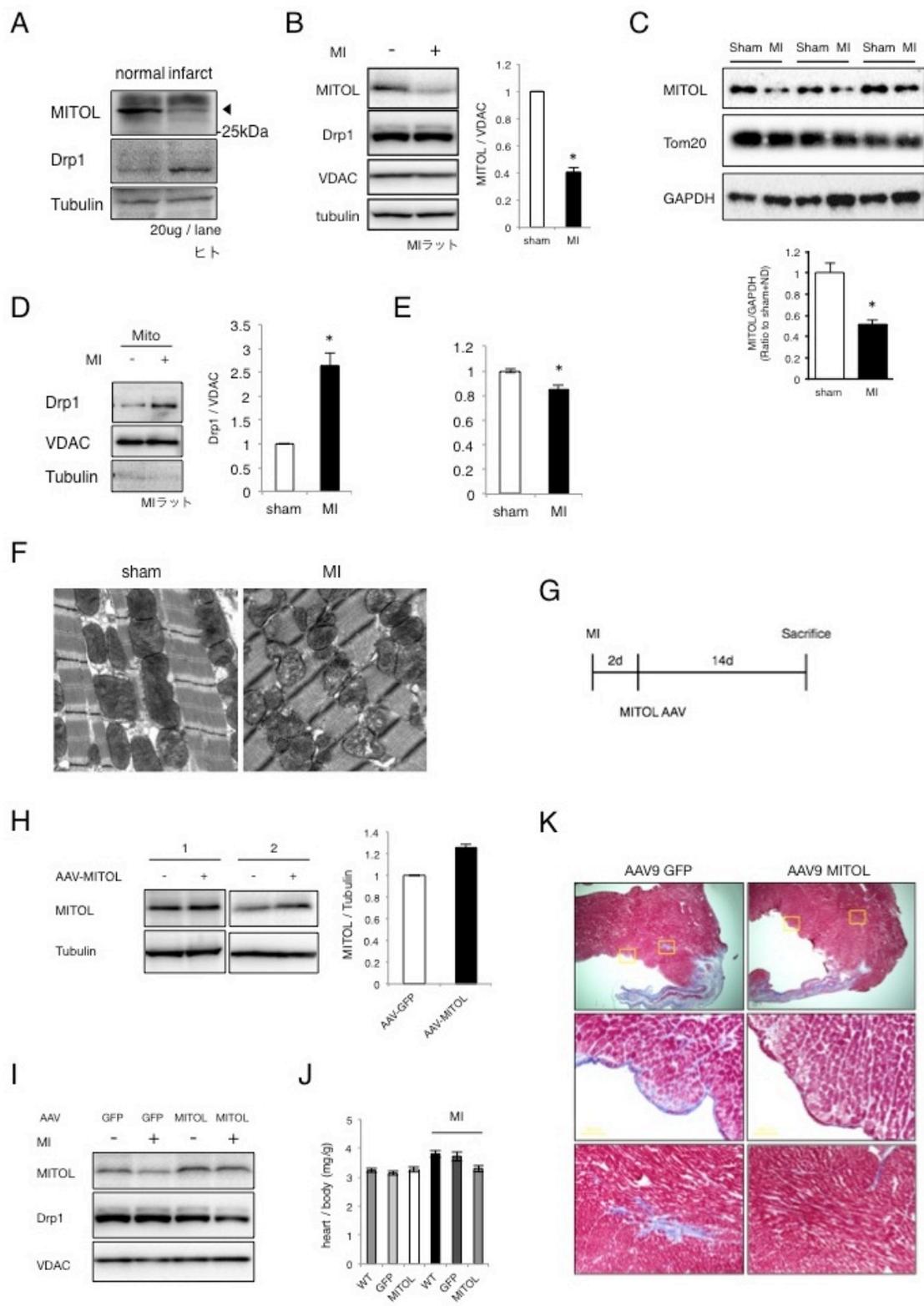


Figure.4 心筋虚血において MITOL はダウンレギュレーションされる

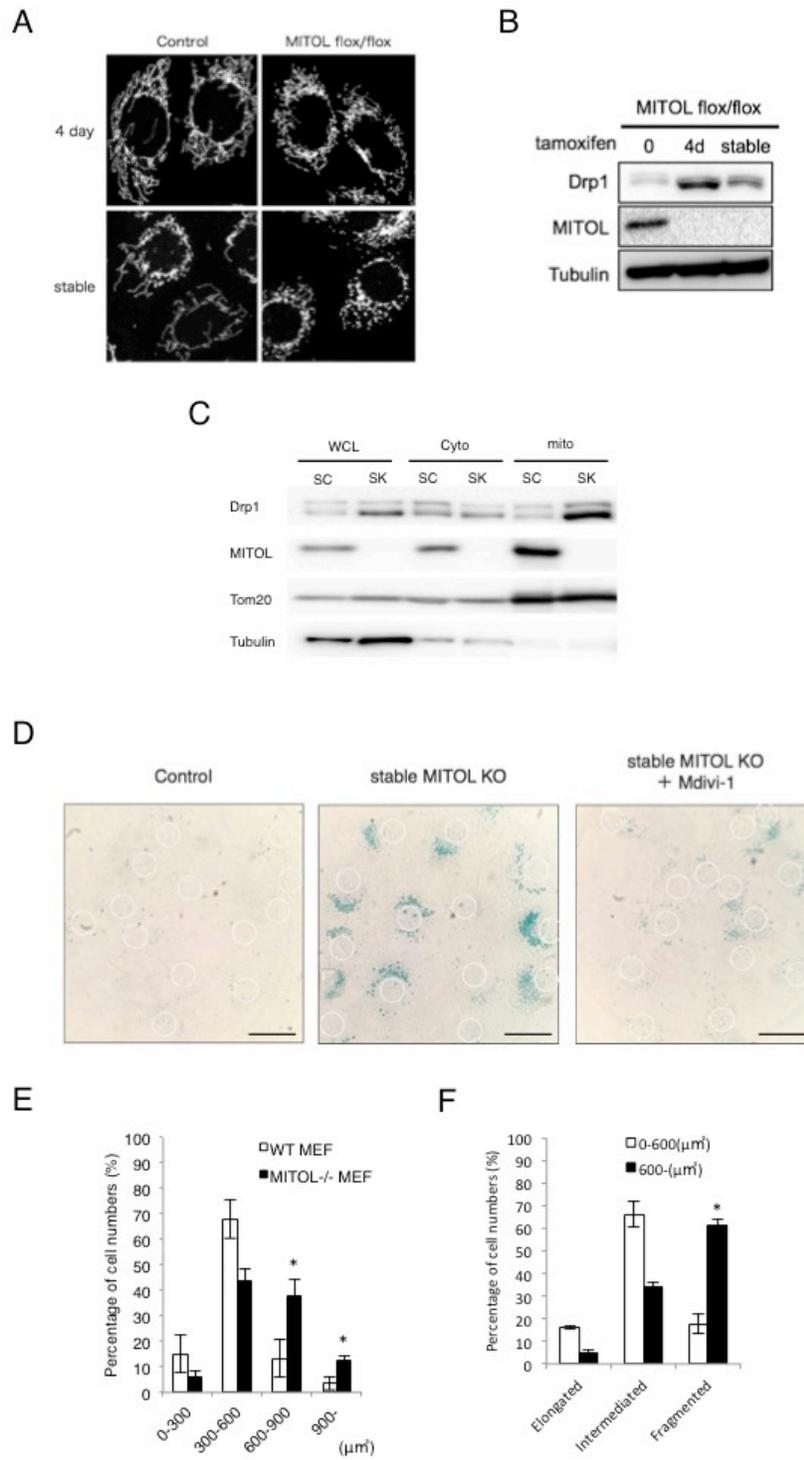


Figure.5 慢性的な MITOL 欠損は細胞老化を引き起こす

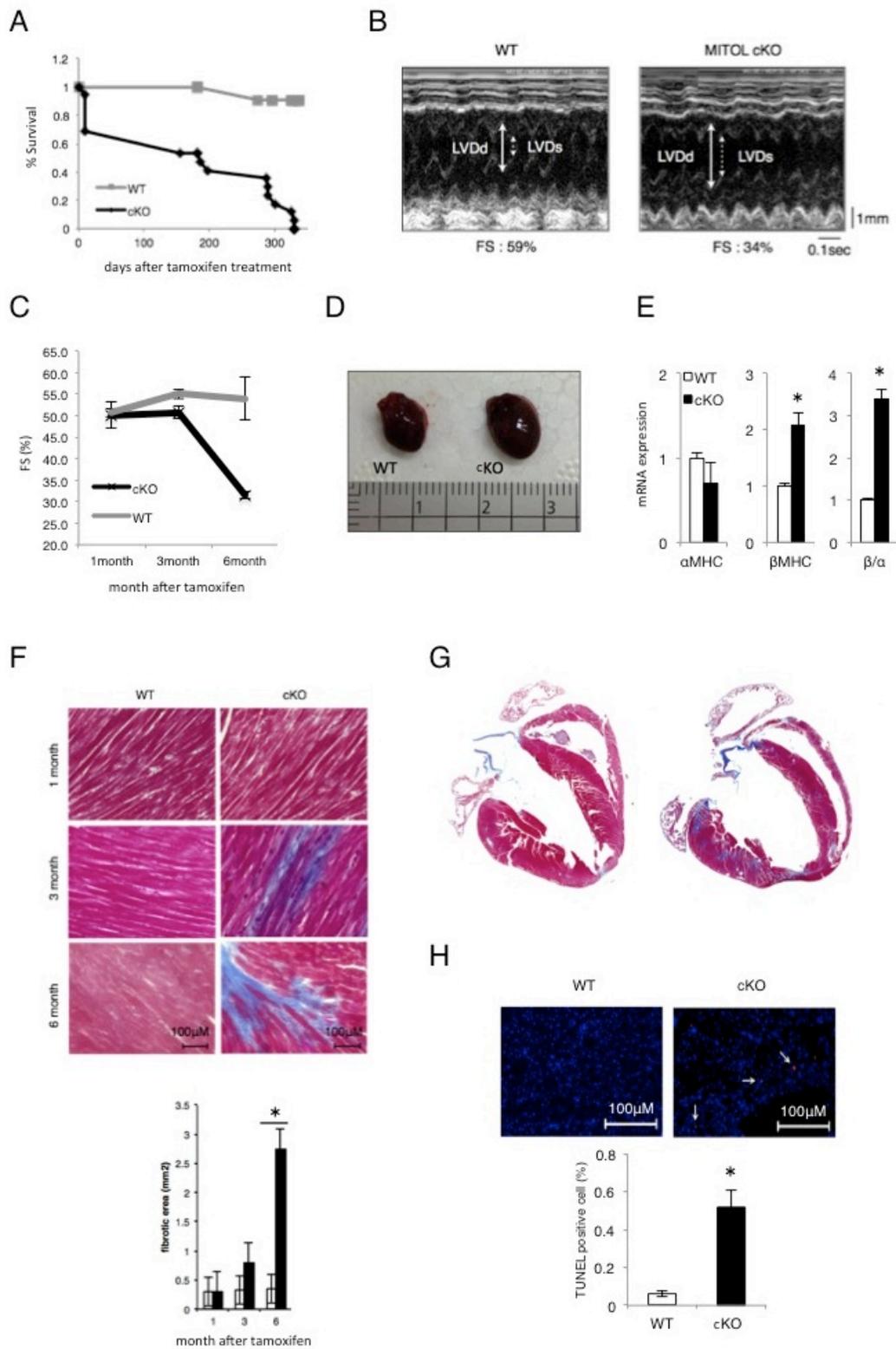


Figure.6 心筋特異的 MITOL 欠損マウスにおける心機能低下

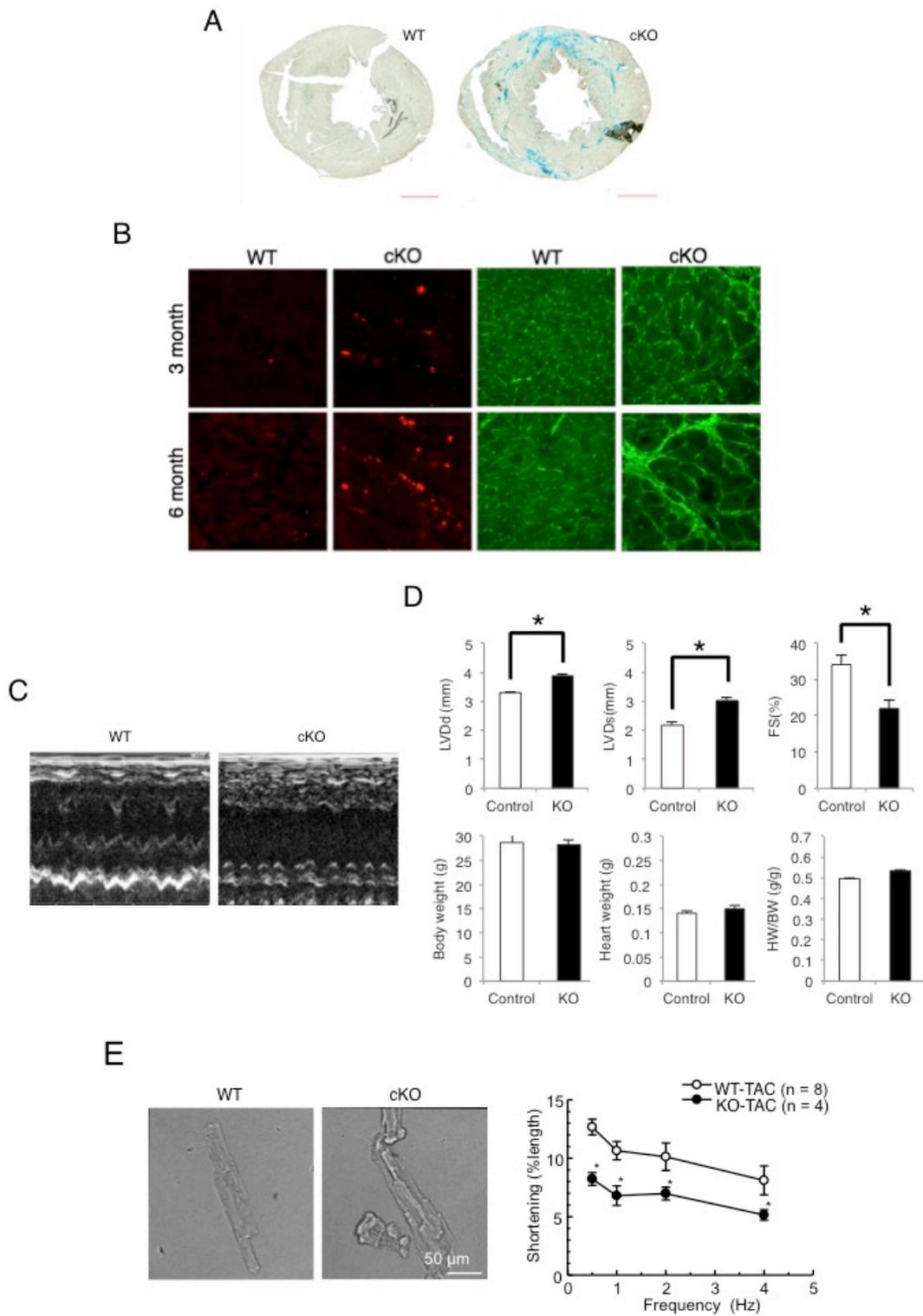


Figure.7 心筋特異的 MITOL 欠損マウスでは心臓老化が亢進している

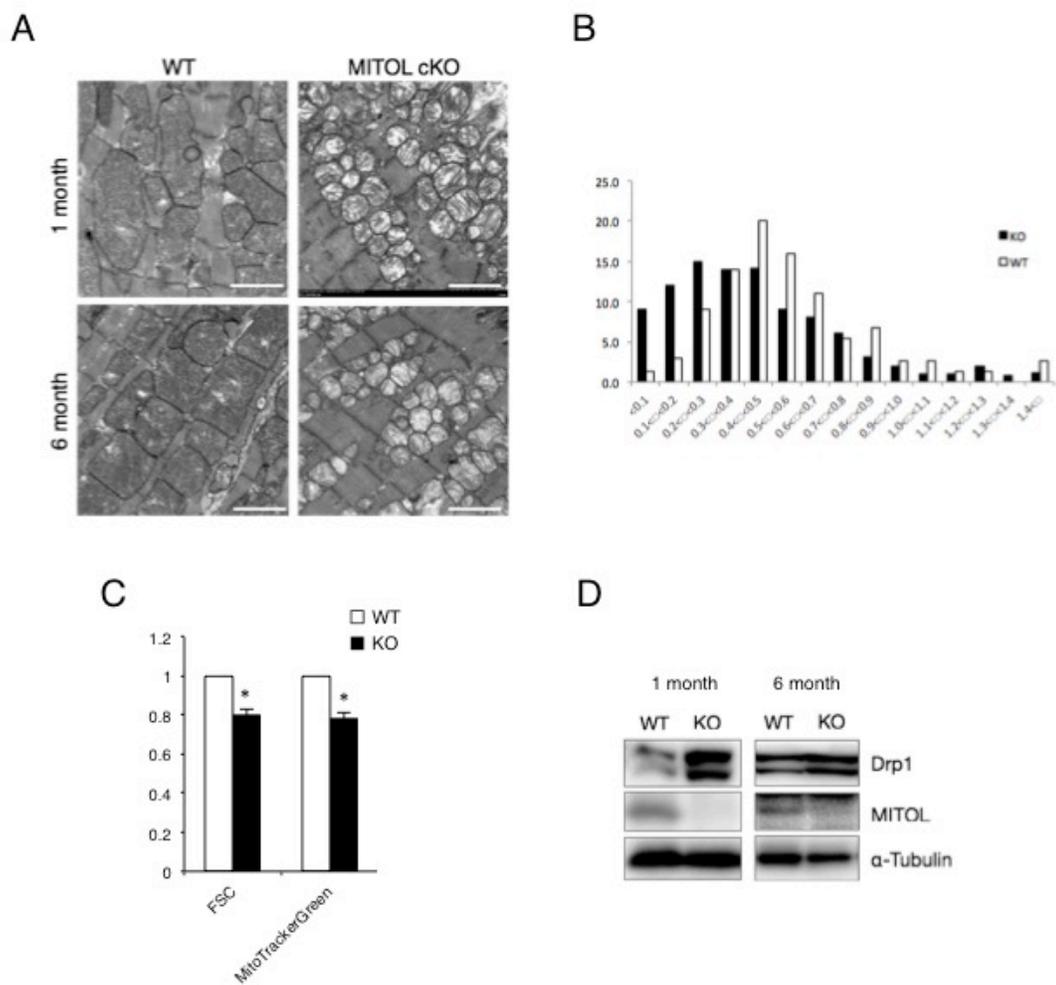


Figure.8 心筋特異的 MITOL 欠損マウスでは早期からミトコンドリアの断片化が生じる

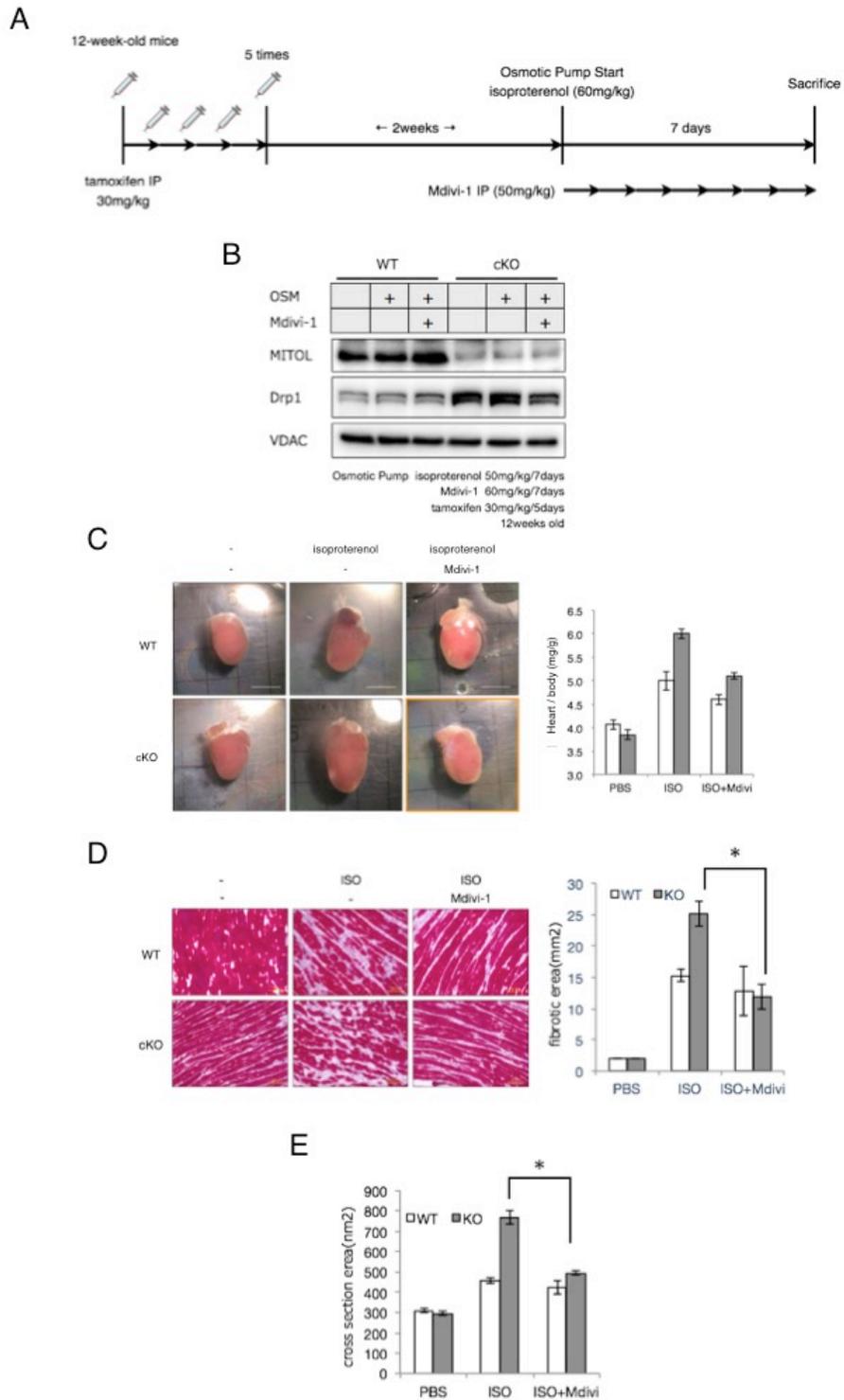


Figure.9 Drp1 の機能を抑制すると心筋特異的 MITOL 欠損マウスの心筋毒性が一部回避される

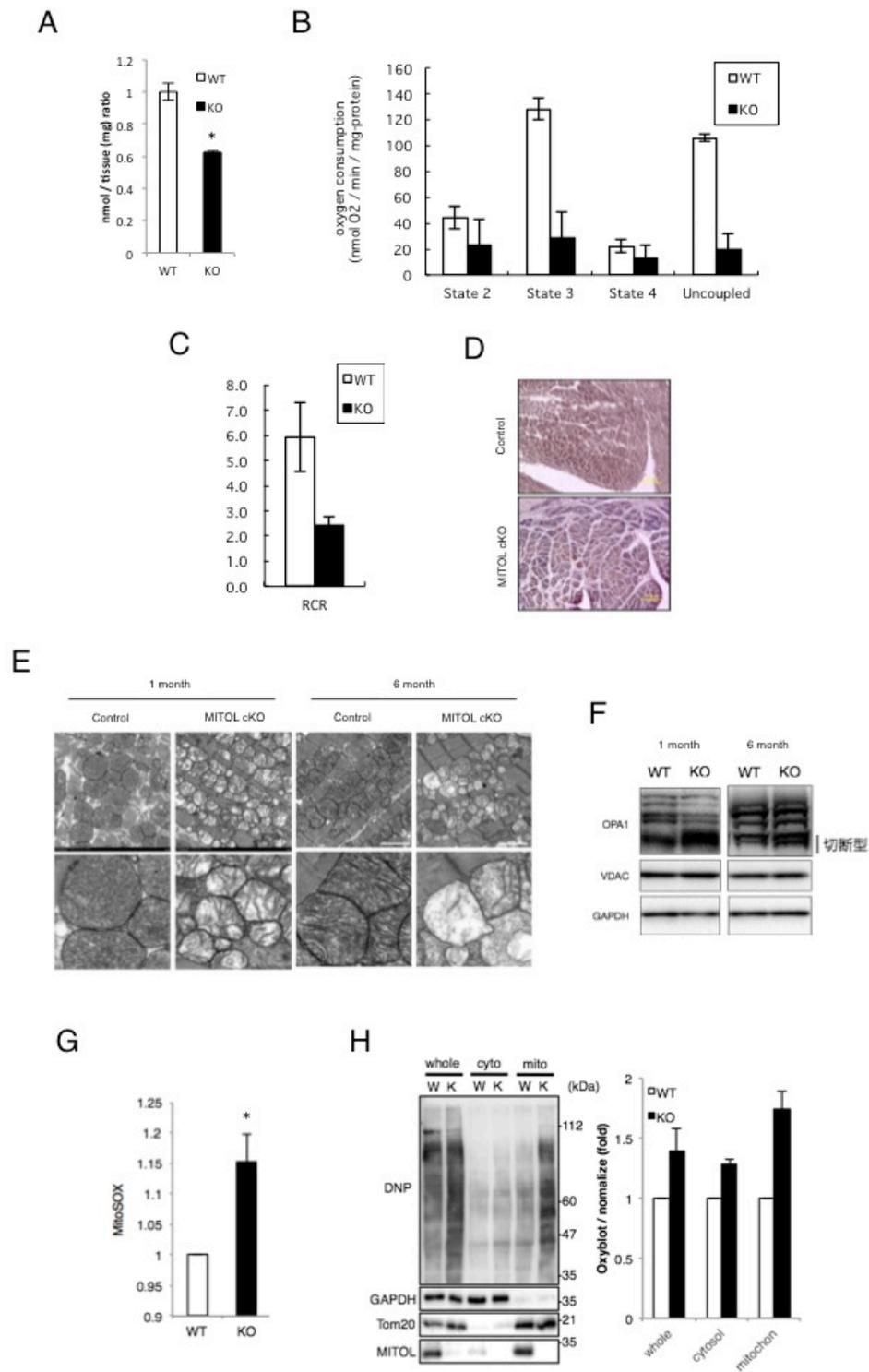


Figure.10 心筋特異的 MITOL 欠損マウス心筋細胞中のミトコンドリアは機能異常を起している

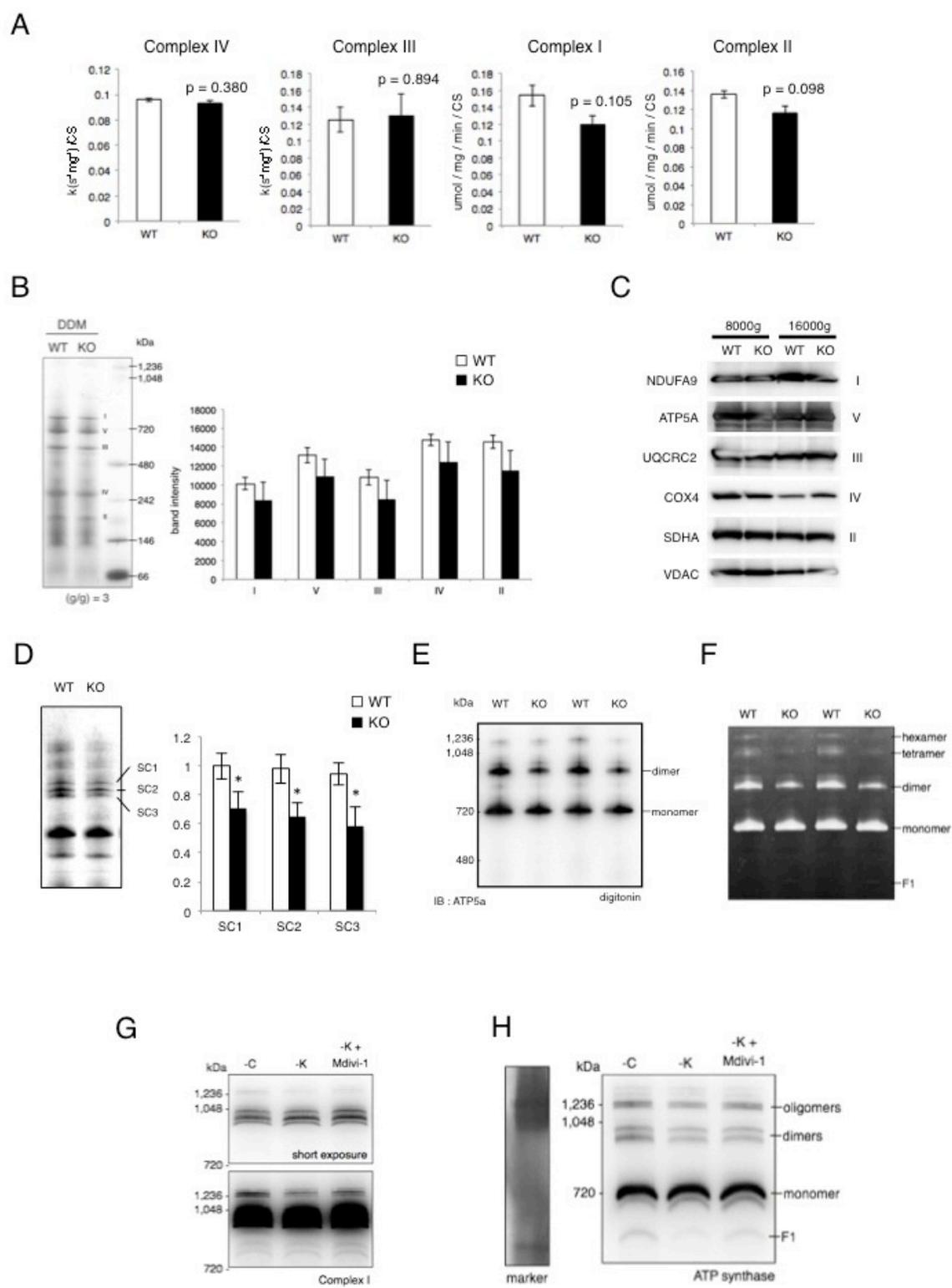


Figure.11 ミトコンドリアの過剰な断片化によるクリステ構造の崩壊

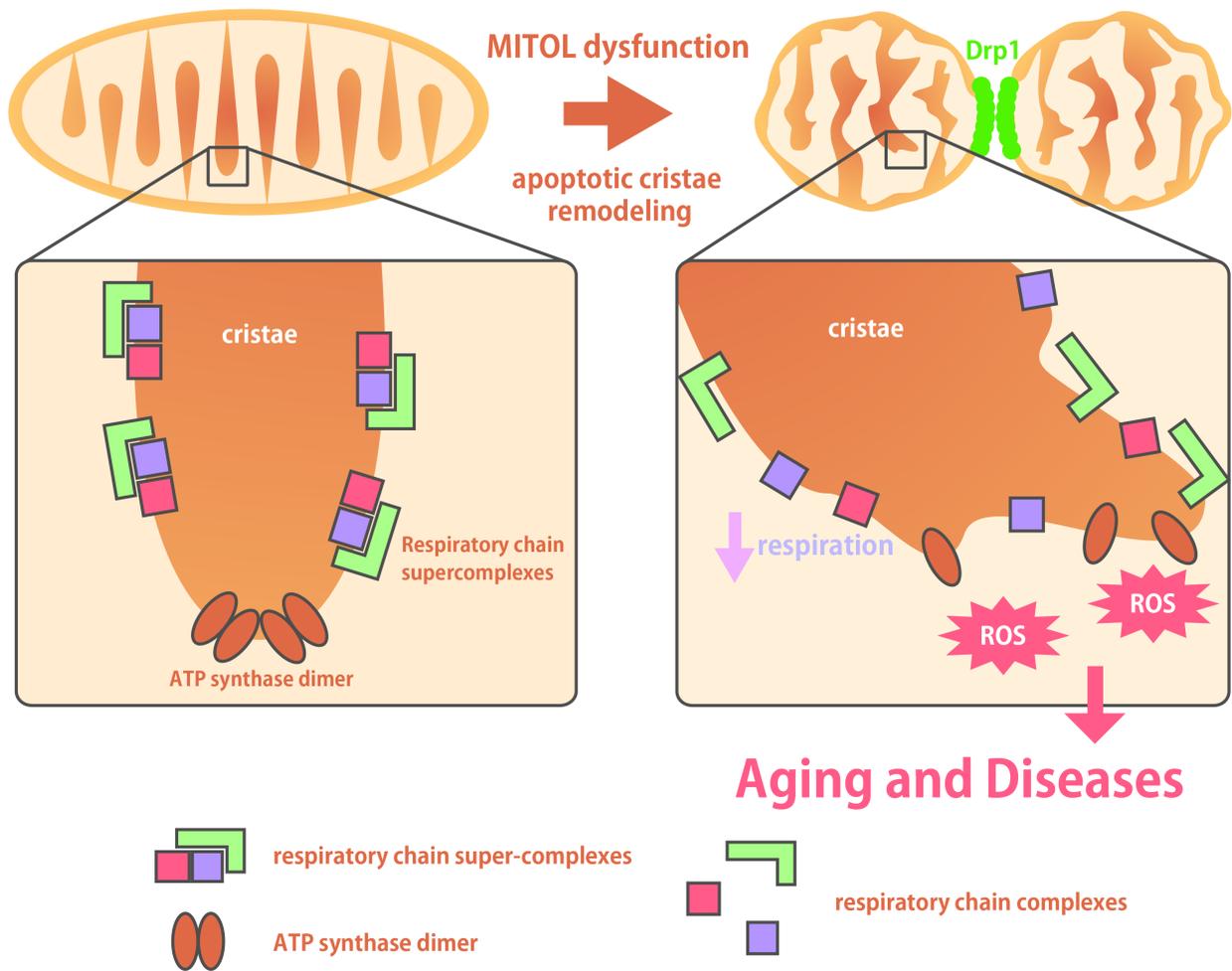


Figure.12 Drp1 の蓄積により、内膜クリステの構造崩壊が起こる

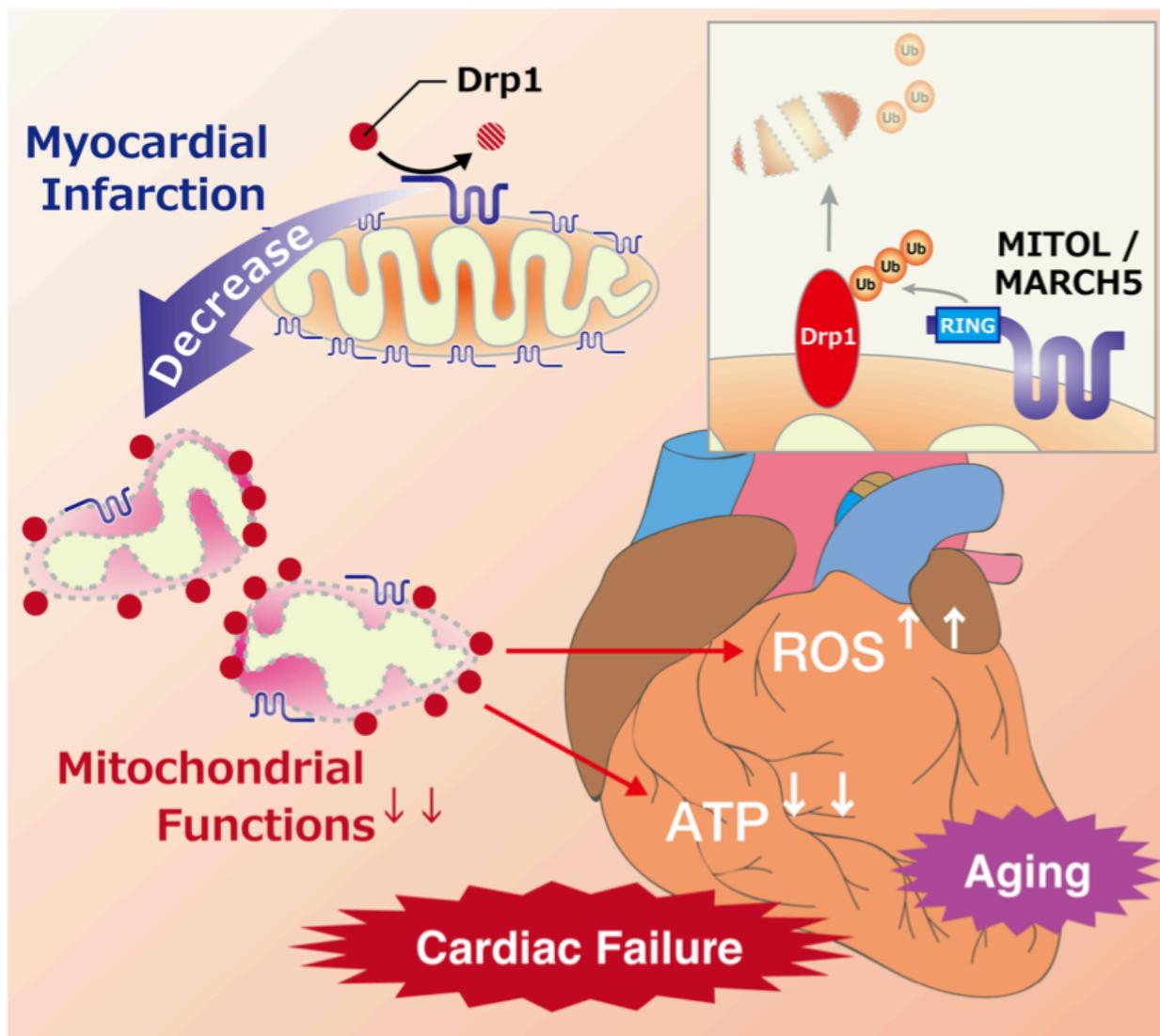


Figure.13 MITOL の持つ心機能維持機構の模式図

## Figure.1 MITOL と Drp1 の相互作用

### (A) 内在性の MITOL と Drp1 の相互作用

野生型 C57BL/6 マウス心臓を用いて、抗 Drp1 抗体による免疫沈降を行った。その後、抗 MITOL 抗体を用いて結合している MITOL の量を観察した。(平成 28 年度修士論文 熱田優斗と共同)

### (B) 過剰発現による MITOL と Drp1 の結合確認

HEK293 細胞に MITOL-HA、FLAG-Drp1 を Lipofectamine3000 を用いてトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。(平成 28 年度修士論文 熱田優斗と共同)

### (C) GST fusion assay

Drp1 を 4 つのドメインで分割し MITOL-FLAG を過剰発現させたライセートと合わせて結合ドメインを同定した。MITOL を 3 つのドメインで分割し FLAG-Drp1 を過剰発現させたライセートと合わせて結合ドメインを同定した。下の図はそれぞれのドメインの場所を示している。(平成 28 年度修士論文 熱田優斗と共同)

### (D) MITOL による Drp1 のユビキチン化

HEK293 細胞に Drp1 及び MITOL を過剰発現させ MG132 10uM 4 時間処置の後、Drp1 のユビキチン化を検出した。

### (E) MITOL 欠損細胞における Drp1 のユビキチン化

MITOL 欠損 MEF 細胞を用いて過剰発現させた Drp1 のユビキチン化を観察した。MITOL 欠損細胞において Drp1 のユビキチン化レベルが減少し、この細胞に MITOL を一過的に発現させたとき、Drp1 のユビキチン化が回復した。

### (F) Drp1 ユビキチン化サイトの同定

アミノ酸の保存及び「UbPred」による予測サイトから KR 変異体を作製し、HEK293 細胞に WT-MITOL と共発現させユビキチン化を検出した。MG132 10uM 6 時間。

### (G) K256R 変異体のミトコンドリアへの蓄積

MITOL がユビキチン化するとされる K256 を変異させた K256R 変異体を一過的に過剰発現させ、野生型の Drp1 よりもミトコンドリアへの蓄積が多いかを検証。MITOL-HA を同時に過剰発現させている。

## Figure.2 急性的 MITOL 欠損におけるミトコンドリアの異常

### (A) MITOL 欠損 MEF 細胞の樹立

MITOL flox/flox マウス胎児由来線維芽細胞(MEF)はタモキシフェン誘導性 Cre リコンビナーゼ (Cre-ERT2) を有した MITOL flox/flox マウスから得た細胞を SV40 ラージ T 抗原により不死化して樹立した。MITOL flox/flo MEF において MITOL は 1.06  $\mu$  M Tamoxifen での処置の 2~4 日後に完全にノックアウトされた。また、この時の Drp1 量も同時に観察した。

### (B) 急性的 MITOL 欠損細胞におけるミトコンドリア形態

抗 Tom20 抗体を用いてミトコンドリアを染色した。1.06  $\mu$  M Tamoxifen の処置後 4 日目の細胞を用いている。

### (C) MITOL による Drp1 の分解

HeLa 細胞に MITOL-HA を過剰発現させ、ミトコンドリア画分に蓄積する内在性の Drp1 の量をウェスタンブロットにより解析した。高分子量にシフトした MITOL-HA のバンドが確認できる。

### (D) ミトコンドリア画分 ROS 量の評価

1.06  $\mu$  M Tamoxifen の処置後の細胞を用いてミトコンドリア ROS の量をフローサイトメーターで測定した。検出薬には MitoSOX を使用した。Tamoxifen と同時・同期間の 10 $\mu$ M Mdivi-1 の処置によってミトコンドリア ROS の量が低下している。

## Figure.3 低酸素環境下における MITOL の変化

### (A) 低酸素による MITOL のダウンレギュレーション

マルチガスインキュベーターを用いて 1%酸素分圧下で HeLa 細胞を飼育し、MITOL のタンパク質量の変化をウェスタンブロットによって観察した。それぞれ低酸素暴露 2 時間、4 時間を示している。下グラフは、コントロールに対して MITOL のダウンレギュレーションを解析している。Data = 平均 $\pm$ SEM \* : p<0.05\_unpaired t-test (N = 3)

### (B) 低酸素による Drp1 の変化

A と同様の実験を行い Drp1 のタンパク質量の変化をウェスタンブロットによって評価した。また、プロテアソーム抑制剤である MG132 の処置を行い、MITOL のダウ

ンレギュレーションがプロテアソーム依存的かどうかを検証した。

(C) 低酸素にミトコンドリアの断片化

核をヘキストで染色し、Tom20 を用いてミトコンドリアを染色した。低酸素暴露は 6 時間行い、通常酸素分圧に極力曝されないよう固定を行った。通常酸素に対する断片化ミトコンドリアの割合を統計解析している。Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_unpaired t-test (N = 3)

**Figure.4 虚血心臓における MITOL のダウンレギュレーション**

(A) ヒト虚血心筋における MITOL のダウンレギュレーション

BioChain 社よりヒト心筋梗塞患者由来組織ライセートを購入し、total protein の MITOL タンパク質量の変化をウェスタンブロットによって解析した。年齢 66-70 歳、normal and infarct left ventricle.

(B) 心筋虚血モデルラットにおける MITOL のダウンレギュレーション

冠動脈の永久結紮による心筋梗塞 (MI) モデルラットにおける非梗塞領域心筋組織中の MITOL 量を、ウェスタンブロットをもちいて解析した。結紮後、2 週間経過した時点で開胸しサンプル化している。Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_unpaired t-test (sham = 3, MI = 3)

(C) 心筋梗塞 (MI) モデルマウスにおける MITOL のダウンレギュレーション

冠動脈の永久結紮による心筋虚血モデルマウスにおける非梗塞領域心筋組織中の MITOL 量をウェスタンブロットをもちいて解析した。結紮後、4 週間経過した時点で開胸しサンプル化している。ヒトとラット同様に、MITOL のダウンレギュレーションが確認できる。Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_unpaired t-test (sham = 6, MI = 6)

(D) 心筋虚血時の Drp1 の蓄積

心筋虚血モデルラット非梗塞領域心筋組織を用いてミトコンドリア分画を分取。ミトコンドリア分画上の Drp1 の蓄積をウェスタンブロットによって評価した。

(E) 心筋虚血時のミトコンドリア形態

心筋虚血モデルラットを用いてミトコンドリア分画を分取。フローサイトメトリーを用いてミトコンドリアの形態を観察した Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_ unpaired t-test (N = 3)。FSC (forward scatter) は粒子の大きさに比例する。

(F) 心筋虚血におけるミトコンドリア形態の観察

心筋虚血モデルラットを用いてミトコンドリアの形態を電子顕微鏡観察によって評価した。sham とくらべて小さく断片化したミトコンドリアが観察される。

(G) AAV アデノ随伴ウイルスの投与形態

冠動脈の永久結紮による心筋虚血モデルラットを使用し、処置 2 日後、AAV を頸動脈より投与した(AAV-9,  $2 \times 10^{13}$  viral genomes/mouse)。

(H) AAV による MITOL の過剰発現

G の通りにウイルスを注射し 14 日後に Sacrifice して心臓中の MITOL 量を、ウェスタンブロットを用いて測定した。1 回目、2 回目とも MITOL の若干のアップレギュレーションができていることがわかる。右 graph は tubulin あたりの MITOL 量を算出 (N = 3)。

(I) 心筋梗塞モデルラットにおける AAV の挙動

MI は心筋虚血群を示す。心筋虚血による MITOL のダウンレギュレーションが AAV の処置によって一部回避されている。

(J) 心臓の肥大化を観察

体重あたりの心臓重量を計算した。AAV-MITOL を処置した個体において若干の心臓重量の軽減が見られる (N = 2)。

(K) 線維化を Masson Trichrome 染色によって観察

左がコントロール心筋梗塞モデルラット、右がモデルラットに MITOL AAV を処置したもの。AAV の投与によって心筋梗塞による線維化が一部抑制されている。

## Figure.5 慢性的 MITOL 欠損におけるミトコンドリアの異常

### (A) 慢性的 MITOL 欠損 MEF の作製

MITOL flox/flo MEF において MITOL は  $1.06 \mu\text{M}$  Tamoxifen での処置の 2~4 日後に完全にノックアウトされたあとに、細胞死を起こさず生存する細胞群を stable (安定株) とした。この細胞のミトコンドリア形態を抗 Tom20 抗体を用いて観察した。急性的な MITOL 欠損と同様に安定株においてもミトコンドリアの形態異常がみられる。

### (B) 慢性的 MITOL 欠損 MEF における Drp1 の蓄積

細胞全体の Drp1 量をウェスタンブロットを用いて検出した。(平成 28 年度修士論文 熱田優斗と共同)

### (C) ミトコンドリア画分への Drp1 の蓄積

安定株では Drp1 の蓄積が減弱していたことから、ミトコンドリア画分へ蓄積している Drp1 の量を確認した。ホモジナイザーを用いてミトコンドリア画分を分取し、Drp1 の蓄積をウェスタンブロットを用いて検出した。SC = stable control、SK = stable knockout、Cyto = 細胞質画分、mito = ミトコンドリア画分 (平成 28 年度修士論文 熱田優斗と共同)

### (D) MITOL 欠損 MEF を用いて細胞老化を評価

代表的な老化の検出方法である SA- $\beta$  gal 染色を行った。老化した細胞は青色に染色される。Mdivi-1 は  $5\mu\text{M}$  で 36 時間処置している。処置後、時間を揃えて 4%PFA の固定の後、顕微鏡下で観察した。

### (E) MITOL 欠損 MEF を用いて細胞老化を評価

MITOL ノックアウト後、1ヶ月異常経過した stable KO line を使用し、細胞の肥大化を image j によって測定した。細胞は老化すると肥大することが言われている。bar = 平均 $\pm$ SEM \* :  $p < 0.05$  \_ t-test (N = 3, >100)

### (F) 肥大細胞におけるミトコンドリア形態

MITOL ノックアウトの MEF を 2 つの面積郡に選択し、その中でミトコンドリアの形態を評価した。面積の大きい細胞老化した細胞では断片化されたミトコンドリアの割合が増えている。bar = 平均 $\pm$ SEM \* :  $p < 0.05$  \_ t-test (N = 3, >100)

## Figure.6 タモキシフェン誘導型心筋特異的 MITOL 欠損マウスの表現型

### (A) 生存曲線のグラフ

タモキシフェン投与後のマウス生存率を集計した。(WT = 25, cKO = 45)

### (B) タモキシフェン投与後 6 ヶ月マウスの心エコー解析

タモキシフェンによる心筋特異的 MITOL 欠損マウス心臓の心エコー解析を行った。タモキシフェン投与後 6 ヶ月マウスを使用している。LVDD, diastolic left ventricle internal dimension; LVDs, systolic left ventricle internal dimension; FS, fractional shortening of left ventricle dimension. MITOL 欠損マウスにおいて心機能を示す FS 値がおよそ半減している。(平成 25 年度 申請者修士論文)

### (C) タモキシフェン投与による経時的な心機能低下

タモキシフェン投与後にそれぞれの期間において心機能を測定した。FS : fractional shortening of left ventricle dimension. FS は「左室内径短絡率」のことであり、左室容積が拡張期からから何%収縮したかを表す。

### (D) 心筋特異的 MITOL 欠損マウス心臓における心肥大

心不全の代表的な表現型である心臓の肥大化を観察した。ノックアウトにおいて肥大化した大きな心臓が観察される。(平成 25 年度 申請者修士論文)

### (E) 心筋特異的 MITOL 欠損マウス心臓における心不全マーカーの亢進

6 ヶ月経過マウス心臓より mRNA を抽出し、心不全マーカーである  $\alpha$ MHC 及び  $\beta$ MHC の mRNA 発現量を QRT-PCR によって測定した。不全心臓では MHC のクラスが  $\beta$  型へシフトすることが知られている。Data = 平均 $\pm$ SEM \* :  $p < 0.05$ \_unpaired t-test (WT\_N = 3, KO\_N = 3)。(平成 25 年度 申請者修士論文)

### (F) 心筋特異的 MITOL 欠損マウスにおける心筋線維化の割合

Tamoxifen による心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 6 ヶ月経過したマウスを用いてパラフィン切片を作製しマッソントリクローム染色により線維化面積を解析した。青色=線維化部分。Data = 平均 $\pm$ SEM \* :  $p < 0.05$ \_ANOVA Bonferroni test (WT\_N = 4, KO\_N = 4)

### (G) 心筋線維化の弱拡大の画像

F における弱拡大の画像を示している。

(H) TUNEL 染色による細胞死の解析

Fと同じ切片を用いて TUNEL 染色による細胞死の解析を行った。(bar) 平均±SEM  
\* : p<0.05\_t-test (WT\_N=4、KO\_N=4)

## Figure.7 心不全より先行して現れる心臓老化

(A) in vivo での組織老化の解析

心筋特異的 MITOL 欠損マウスは Tamoxifen によるノックアウトから 6 ヶ月経過したマウスを使用している。Sacrifice 後早急に凍結切片を液体窒素を用いて作成し、20um で薄切した。その後、SA-β gal 染色を行った。老化した細胞は青色に染色される。

(B) in vivo での組織老化の解析

心臓では組織が老化すると lipofuscin が蓄積する。Lipofuscin は自家蛍光を持っているため、無染色の凍結組織を赤色フィルターで観察すると赤色のドットとして現れる。心筋特異的 MITOL 欠損マウスは Tamoxifen によるノックアウトから 6 ヶ月・3 ヶ月経過したマウスを使用している。右側緑染色画像は WGA (Wheat Germ Agglutinin) を用いて細胞膜を染色し、心筋細胞の大きさを観察した。

(C) 大動脈結紮 (TAC) を処置した際の心エコー解析

Tamoxifen による心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 3 ヶ月経過したマウスを TAC (transverse aortic constriction) 処置し、処置 1 週間後に心エコー解析を行った。代表的なエコー画像を示している。(平成 25 年度 申請者修士論文)

(D) 大動脈結紮 (TAC : transverse aortic constriction) による心機能解析結果  
Tamoxifen による心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 3 ヶ月経過したマウスを TAC 処置し、処置 1 週間後に心エコー解析を行った。 Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_unpaired t-test (WT\_N = 4、KO\_N = 4) LVDD, diastolic left ventricle internal dimension; LVDs, systolic left ventricle internal dimension; FS, fractional shortening of left ventricle dimension. (平成 25 年度 申請者修士論文)

(E) 心筋細胞の収縮率を測定

Tamoxifen による心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 3 ヶ月経過したマウスを TAC 処置し、その後初代培養細胞を分取し、電気刺激における細胞収縮率を測定した。

MITOL 欠損マウス由来心筋細胞では、刺激に対する心筋細胞の収縮力が低下していることが分かる。(平成 25 年度 申請者修士論文) Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_ unpaired t-test

## Figure.8 心臓老化より先行して現れるミトコンドリアの断片化

### (A) MITOL 欠損マウスにおける心臓ミトコンドリア形態観察

Tamoxifen による心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 1 ヶ月・6 ヶ月の心臓ミトコンドリアを、電子顕微鏡観察を用いて観察した。通常、心筋細胞のミトコンドリアを観察すると黒色にミトコンドリアは観察される。小さく断片化されたミトコンドリアが MITOL 欠損マウスにおいて多く観察される。

### (B) 分裂した小さいミトコンドリアが蓄積する

A においてミトコンドリア一つ一つの面積を測定した。野生型に比べて面積の小さい分裂したミトコンドリアの分布が MITOL 欠損マウスにおいて増加していることが分かる (N = 2006 - 2568)

### (C) フローサイトメーターを用いた解析

小さく断片化されたミトコンドリアが増加しているかどうかを、フローサイトメーターを用いて解析した。FSC (forward scatter) は粒子の大きさに比例する。MitoTrackerGreen はミトコンドリア染色用色素である。Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_ unpaired t-test (WT\_N = 3、KO\_N = 3)

### (D) Drp1 の蓄積

A における Drp1 の心臓における蓄積をウェスタンブロットを用いて解析した。

## Figure.9 心筋特異的 MITOL 欠損マウスの心不全が Drp1 によるものであるかどうかの解析

### (A) 薬剤の投与様式

12 週のマウスに Tamoxifen を 5 日間投与後、2 週間待ち MITOL の心筋特異的ノックアウトマウスを作成した。浸透圧ポンプによって背中皮下よりイソプロテレノール

を投与した。このときに DMSO・corn oil で希釈した Mdivi-1 を腹腔内より投与した。

(B) 処置群のウェスタンブロット解析

処置・未処置のマウス心臓を SDS で可溶化し、ウェスタンブロットを行った。ホモジナイザーを用いてミトコンドリア画分を分取した。Mdivi-1 によってミトコンドリアへ移行する Drp1 の量が減少していることが分かる。

(C) 外見写真

ISO=イソプロテレノール処置群を意味する。右 graph は体重あたりの心臓重量を評価したもの (N = 3)。

(D) 線維化面積の確認

Masson Trichrome 染色を用いて心臓の線維化面積を観察した。面積は image J を使用し、心臓あたりの線維化の割合を算出した。Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_unpaired t-test

(E) 心筋細胞自体の肥大化を観察

WGA (wheat germ agglutinin) を用いて細胞の面積を測定した。染色には PFA 固定の凍結切片を使用した。線維方向に対して垂直に切片化されている部分の断面積を image J によって観察した。Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_unpaired t-test

## Figure.10 急性的 MITOL 欠損におけるミトコンドリアの異常

(A) マウス心臓中の ATP 量

心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 6 ヶ月経過マウス心臓中の ATP 量を測定した。組織より ATP を抽出し、ATP 発光試薬で ATP 量をホタル・ルシフェラーゼ発光法で測定後、タンパク質量によって Normalize した。Data = 平均±SEM \* : p<0.05\_unpaired t-test (WT\_N = 3、KO\_N = 3)。

(B,C) MITOL 欠損マウス心臓ミトコンドリアの酸素消費量

心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 6 ヶ月経過マウス心臓よりホモジナイザーを用いてミトコンドリア画分を分取した。このミトコンドリアを用いて酸素消費量を測定した。基質の存在する速い呼吸速度状態を stateIII といい、これは脱共役状態にあた

る。基質の存在しない遅い呼吸速度状態を stateIV といい、リン酸化を受けた状態にあたる。

これら速度の比 (stateIII の呼吸速度 / stateIV の呼吸速度) を呼吸調節率 (respiratory control ratio ; RCR) という。ミトコンドリアが障害を受けて酸化的リン酸化が起こらない場合には脱共役状態のままでこの値が 1 となる。

(D) 凍結切片を用いて呼吸活性を COX/SDH 染色によって評価。

開胸後直ぐに凍結切片を作成し、試薬はすべて直前調整。COX の活性と SDH の活性を二重染色している。この染色では呼吸鎖の機能が障害、異常になっている場合、その細胞は青色が染色される。心筋特異的 MITOL 欠損マウスは Tamoxifen によるノックアウトから 6 ヶ月経過したマウスを使用している。

(E) MITOL 欠損マウス心臓ミトコンドリアにおけるクリステの崩壊

Tamoxifen による心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 1 ヶ月・6 ヶ月の心臓ミトコンドリアを、電子顕微鏡を用いて観察した。コントロールと比較して MITOL 欠損マウス心臓では、ミトコンドリアの内部が空洞に近く白抜きになっている、つまりはクリステの崩壊が起きているミトコンドリアが数多く観察される。この表現型は欠損より 1 ヶ月後の早期から観察される。

(F) OPA1 を観察することによるクリステ崩壊の観察

ミトコンドリア内膜分子 OPA1 はクリステの崩壊にともなって切断型へ変化することが分かっている。心筋特異的 MITOL 欠損マウス誘導後 1 ヶ月・6 ヶ月の心臓における OPA1 の切断効率をウェスタンブロットを用いて検証した。

(G) ミトコンドリア由来の活性酸素種を測定

単離したミトコンドリアを用いてミトコンドリアの ROS 量をフローサイトメトリーで測定した。心筋特異的 MITOL 欠損マウスにおいて ROS の増加が観察される。測定には MitoSOX を使用し染色は RT 30 min で行った。Data = 平均 ± SEM \* :

p<0.05\_ unpaired t-test

(H) 過酸化タンパク質をウェスタンブロットによって評価

代表的な過酸化タンパク質であるカルボニル化タンパク質を検出。特にミトコンドリア分画における過酸化タンパク質の蓄積が心筋特異的 MITOL 欠損マウスで顕著に観察される。分画はホモジナイザーを用いる方法を採用している。

### Figure.11 Drp1 の過剰活性化による内膜異常による ROS 産生の増加

#### (A) 吸光度法を用いた呼吸鎖複合体活性の評価

吸光度を用いて各々の呼吸鎖複合体の活性を測定した。total のミトコンドリア量を反映するクエン酸シンターゼの活性によってそれぞれの呼吸鎖活性を評価した。各々の呼吸鎖複合体の活性に大きな差は見られない。

#### (B) 呼吸鎖の量を評価。

BN-PAGE を用いて呼吸鎖複合体の量を確認。界面活性剤には DDM を使用し、濃度は  $g/g=3$ 。呼吸鎖複合体各々の量に変化は見られない ( $N = 3$ )。Lane = 20ug のミトコンドリアを apply している。

#### (C) ウェスタンブロットによる呼吸鎖複合体の確認

SDS を用いて可溶化後、SDS-PAGE を行い表記の抗体を用いて呼吸鎖複合体の各々の量を確認した。こちらでも呼吸鎖複合体のそれぞれの量に変化は見られない。ミトコンドリア分画は 8000g と 16000g のものを使用。

#### (D) BN-PAGE を用いて呼吸鎖複合体の複合を確認。

Lane = 20ug のミトコンドリアを apply している。マーカーより呼吸鎖複合体 I を含む複合体を暫定している。SC の I・II・III が supercomplex のバンド。 ( $N = 3$ ) Data = 平均  $\pm$  SEM \* :  $p < 0.05$  \_ unpaired t-test

#### (E,F) ATP 合成酵素の複合形成率の評価

単離したミトコンドリアを用いて ATP 合成酵素の複合体の形成を評価した。左白の図は BN-PAGE 後、ウェスタンブロットによって ATP5A を blot したもの。(F) は ATP 合成酵素の in-gel activity assay で、活性があるほど白く染色される。心筋特異的 MITOL 欠損マウスは Tamoxifen によるノックアウトから 6 ヶ月経過したマウスを使用している。

#### (G,H) in vitro における Drp1 による複合体形成不全の証明

-Cはコントロール MEF、-Kはノックアウト MEFを意味している。Lane = 20ug のミトコンドリアを apply している。左は BN-PAGE 後、NDUFA9 によるウェスタンブロットを行ったもの。右は BN-PAGE 後、ウェスタンブロットによって ATP5A を blot したもの。Mdivi-1 (10uM) は Tamoxifen と同時に加え、48 時間後に回収し BN-PAGE を行っている。Supercomplex、ATP 合成酵素ともに Mdivi-1 によって複合体形成が回復している。

### Figure.12 Drp1 依存的な複合体乖離の模式図

通常、呼吸鎖複合体も ATP 合成酵素もクリステ上に複合体として存在し、その機能を維持している。しかし、ミトコンドリアが Drp1 の蓄積によって無理やり分裂させられてしまうと、外膜・内膜の構造が崩壊。ここでは恐らく体積圧の増加や、無理な内膜の切断が原因と考えている。その結果複合体が形成できず、効率的な電子伝達系と ATP 合成ができなくなる。その結果、非効率な呼吸鎖複合体より ROS が大量に漏れ出してしまう。また同時に ATP 合成酵素もうまく機能しなくなり ATP が枯渇する。

### Figure.13 本研究課題の総括図

MITOL は心臓においてミトコンドリアの機能を維持する分子であり、心機能を維持している。心筋虚血などが起こると MITOL のダウンレギュレーションが誘導され、これにともなって心臓ミトコンドリアは機能不全に陥る。MITOL のダウンレギュレーションによってミトコンドリア断片化因子である Drp1 が顕著にミトコンドリアへ集積し、過剰な断片化を引き起こす。この結果、ミトコンドリア内部のクリステ構造が崩壊し、内膜に位置している呼吸鎖複合体などの活性を低下させ、ミトコンドリアの機能異常を引き起こしていると考えている。このミトコンドリア異常の結果、心臓老化と心機能低下が発症する。

## 考察

---

### 本論文における主張

今回の研究成果は、**実際の心筋梗塞という病態において、ユビキチンリガーゼ MITOL がミトコンドリア機能不全を介した心不全発症メカニズムの一端に関与するという仮説を支持するとともに、MITOL の心臓における機能の一端を証明している。**以下にその論拠を述べる。

1. MITOL が具体的に Drp1 と相互作用していることを証明している。結合ドメインやユビキチン化サイトの同定を行い、MITOL が Drp1 を基質としていることを強く示唆している (Fig.1)。
2. 急性的な MITOL 欠損の場合に、Drp1 は蓄積し、逆に MITOL を過剰発現させると Drp1 が分解された。そして、この結果として起こると考えられるミトコンドリア ROS の上昇が Drp1 抑制剤の処置によって一部回復した。この結果は、MITOL が Drp1 を基質としていることをさらに強く示唆している (Fig.2)。
3. 具体的な病態生理条件下に置いて MITOL の重要性を証明している。MITOL と Drp1 の関係が低酸素という具体的な病態生理環境下において重要であることを証明している (Fig.3)。
4. さらに、細胞だけでなく組織においても病態生理的な MITOL の重要性を証明している。心筋虚血という疾患に着目し、人の組織における結果も織り交ぜながら MITOL の病態生理的な重要性を示唆するデータを出している (Fig.4)。
5. MITOL の創薬ターゲットの可能性を証明するため、AAV による過剰発現系によるレスキュー実験を試みている。心筋虚血による心毒性の一部が MITOL のダウンレギュレーションが原因であり、MITOL の創薬候補としての可能性を提唱している (Fig.4)。
6. 急性期だけでなく慢性期における MITOL の重要性として老化抑制を取り上げ、普遍的な MITOL の重要性を証明している (Fig.5)。

7. 心臓における MITOL の重要性を証明するためコンディショナルノックアウトマウスを作成している。心エコー組織学的解析 (Fig.6) など広い検証から心機能低下を証明している。
8. さらに心筋特異的 MITOL 欠損マウスの Drp1 毒性が心臓老化という表現型に結びつくことを *in vivo* と *in vitro* で証明している (Fig.5,7)。この結果はミトコンドリアダイナミクスの破綻が組織老化を引き起こすという重要な知見を含んでいる。
9. 心筋特異的 MITOL 欠損マウス心臓中のミトコンドリアは過剰に断片化されており、同時にミトコンドリア機能不全を引き起こしている (Fig.8)。またこのとき MITOL の基質である Drp1 の蓄積を確認しており、MITOL の機能低下と心機能低下を具体的に結びつけている。
10. *in vivo* において心筋特異的 MITOL 欠損マウスの表現型が基質である Drp1 によるものかどうかを、特異的 Drp1 抑制剤を用いて検証している (Fig.9)。MITOL 欠損によるダメージの一部の原因が Drp1 によるものであることを証明している。
11. 代表的なミトコンドリア機能不全を網羅的に測定しており (Fig.10,11)、さらに ATP 合成酵素の複合体乖離という新しい概念を提唱している (Fig.10,11)。ATP 合成酵素の複合体乖離に関して基質である Drp1 を抑制した際に解消されるかどうかのレスキュー実験を試みている。分子生物学的に今まで証明されていなかった Drp1 の過剰活性化による毒性を、クリステリモデリングを焦点に論じており、この点は非常に学術的意義が高いと言える。

これらを総合し、心臓におけるユビキチンリガーゼ MITOL の重要性に関して下記の可能性を示唆した。

- ① 心筋梗塞による心臓毒性が MITOL の機能低下によるものであること。
- ② MITOL は Drp1 を通したミトコンドリアダイナミクスの調整によって心臓の機能を維持していること。

MITOL の機能が破綻した場合に心不全を呈すことから、MITOL は個体の生存・心疾患発症に関して善玉的因子であると考えられる。そして MITOL のもつ心機能低下への影響は、心臓を構成している心筋細胞内ミトコンドリアの機能不全が関与していることが明らかとなった。詳細な MITOL からミトコンドリア機能不全へ発展するメカニズムは一部、基質である Drp1 の蓄積によるものであると証明している。MITOL 機能不全によるミトコンドリア機能障害により、心筋細胞における細胞内環境の劣悪化。この結果として心筋細胞死、心臓の収縮力低下をまねき、心臓老化が亢進、最終的に心不全を発症する、という一連の流れを証明した。

この研究成果より、「ミトコンドリアユビキチンリガーゼである MITOL は心臓の機能維持に必要な分子の一つである」ということが明らかとなった。さらに「MITOL の機能低下が心筋梗塞の毒性の中心である」という可能性を示唆した。コンセプチュアルには、ミトコンドリアダイナミクスの破綻が、心臓老化を亢進させて心疾患発症リスクを増大させる可能性があること、ミトコンドリア断片化とクリステ崩壊が相互しあっており、組織単位でその毒性が発揮されること、この2点を提唱できた点は非常に学術的意義が高いと考えている。

### **MITOL を用いた心筋梗塞における心筋毒性治療の可能性**

MITOL を AAV9 を用いて心筋梗塞を起こさせたラットに過剰発現させると、心筋梗塞による心筋細胞死が回避出来ることが明らかになった (Fig.4)。また、ヒト・ラット・マウスにおいて心筋梗塞を誘導すると MITOL はダウンレギュレーションされ、同時にミトコンドリアの形態異常が生じる (Fig.4)。このことは、心筋梗塞による心筋細胞死を代表とした毒性が MITOL のダウンレギュレーションを通したミトコンドリアダイナミクス異常によるものであることを示唆している。実際に、心疾患患者の心臓ミトコンドリアは過剰に断片化され、ミトコンドリアダイナミクスに異常が起きていることが示唆されている (Schaper et al., 1991; Hom and Sheu, 2009)。そして今回、MITOL を過剰発現させることで一部、心筋梗塞の毒性を抑えることに成功し

た。よって今後、MITOL やミトコンドリアをターゲットとした心筋梗塞回避のための創薬開発の可能性を考えている。

しかしながら本論文においては、なぜ MITOL が心筋梗塞などの環境下でダウンレギュレーションさせるのかの具体的なメカニズムを明らかにできていない。この点に関して一つの仮説を考えている。以前の研究報告より、MITOL は NO によって自己の活性が低下することが分かっている (Yonashiro et al., 2012)。また、心筋梗塞においては NO を合成する NOS が活性化されることが明らかにされている (Xuefeng et al., 2015; Toufektsian et al., 2006)。したがって、心筋梗塞の際に MITOL はニトロシル化され不活性化されることが予想される。そして、不活性化された細胞にとって不必要になった MITOL は他の E3、もしくは不活性化されていない MITOL によって自己同士で分解しあっていると考えている。今後は、創薬の開発のためにも MITOL のダウンレギュレーションのメカニズムをニトロシル化というキーワードを焦点に解明していくことが必要である。

### MITOL の生理学的な存在意義

MITOL はユビキタスに発現するタンパク質である。細胞を用いた実験や今回の組織レベルでの解析から、ミトコンドリアという生存に不可欠なオルガネラをターゲットとして MITOL は生物学的に機能を維持・調節する役割を持つことが予測される。既存の報告を含め、MITOL の基質の多くはミトコンドリアにとって毒であるものが多い。このことから MITOL はミトコンドリアへ集まるゴミや毒素をミトコンドリアの表面で分解し、ミトコンドリアを守っていると想像できる。そのため、ときに心筋虚血などの MITOL をダウンレギュレーションするような環境になった際には MITOL のミトコンドリア維持機構が崩れ、病気を発症してしまうことは想像に容易い。そして、MITOL の組織における機能を報告したのは今回が初めてである。MITOL はほとんどすべての臓器や器官で必要な分子であると考えられるため、その意義を証明するためにも心臓以外での MITOL の機能報告をしていく必要がある。そのため本研究の「成体レベルでの MITOL の機能の探求」に対する貢献度は大きいと考える。

## 今回の研究成果の学術的・臨床的意義

ミトコンドリアの働きが低下することが原因で起こる病気を総称してミトコンドリア病という。このミトコンドリア病における臓器障害は、エネルギーを大量に必要とする心筋や骨格筋、中枢神経系に出現しやすく、特に心筋障害がみられたものはミトコンドリア心筋症と呼ばれ、心不全や心室性不整脈の合併が生命予後に非常に密接に関与していることが分かっている。このようにミトコンドリアの機能異常を介した疾患は数多く存在し、ミトコンドリアを健康に保つ仕組みの理解はこれら疾患の治療の確立のために必要不可欠であると言える。近年、心筋におけるミトコンドリアの形態が心臓の機能にとって重要であるとする論文報告が多数報告されている (Li et al., 2010; Wang et al., 2011)。ミトコンドリアの融合因子をノックアウトしたマウスはミトコンドリアが過剰に断片化され心不全を起こす。また、逆にミトコンドリア分裂因子である Drp1 のノックアウトマウスもまた心不全をきたす。しかしながらこれらの研究報告はすべて人為的にミトコンドリア因子をノックアウトしている結果にとどまっている。そのため、ミトコンドリアの形態が心臓の機能に重要であることは明らかであったが、この機構が実際に病態生理的に起きているのかどうかに関して議論しているものは殆どなかった。また、心不全という病態からの臨床研究方面では、ミトコンドリア機能不全と心不全の関連性が示唆されていたが、実際にどの分子が関与していたのかを明らかにしているものは少ない (Zoltan et al., 2006; Chen et al., 2009; Chung S et al, 2007)。この双方の問題点に関して、本研究報告は心筋梗塞という生理的な病態が、MITOL という分子をダウンレギュレーションすることで、ミトコンドリア形態異常をおこし心機能を低下させるという概念を提唱している。実際の心筋梗塞という病気とミトコンドリア形態異常を一つの分子で繋げていることから、学術的な意義は高いといえる。

現在心不全は日本の死因第2位である。心不全という病態であるが、ここまで人を脅かす存在であるにもかかわらず未だブラックボックスの多い疾患である。この心不全の治療・原因を明らかにすることが急がれる中、MITOL という今まで心不全と関係があるのか明らかでなかった分子が心不全発症に寄与していることを報告する本研究内容は、心不全の新たな治療方法の創出に繋がる可能性を秘めていると考える。人

間の永遠の課題とも言える不老不死への願望に対して、心不全の新たな知見・治療法の創出という観点から、今回の MITOL - 心不全の関連性を示唆した研究成果は大いに貢献できる内容を含むと考えられる。

### **Drp1 によるミトコンドリア断片化の毒性に対する新たな知見**

Drp1 はミトコンドリア唯一の分裂因子であり、その研究報告は多大に渡る。ミトコンドリアの研究界において分裂した小さなミトコンドリアは、機能が低下している細胞にとって毒である存在との知見がほとんどである。しかしながら、「なぜミトコンドリアが断片化すると機能不全になるのか」については一切が明らかにされてきていない。つまり、外膜に蓄積する Drp1 がどういったメカニズムでミトコンドリアを機能不全にし、ROS を産生させるのかは分かっていない。この点に関して、本研究報告はクリステリモデリングという現象が、強制的に外膜が締め付けられた際に生じ、ROS が産出されるという新しい概念を提唱している。Drp1 はミトコンドリア上で指輪のようにリングを形成し、GTPase 活性によってそのリングが小さくなり最終的にミトコンドリアを引きちぎるタンパク質である。よって、Drp1 の分裂は、ある意味ミトコンドリアを無理やり引きちぎっていると想像できる。引きちぎられることによる体積の圧迫や、内膜の切断によってクリステの構造が崩壊し、呼吸鎖複合体・ATP 合成酵素の複合異常を起こして ROS の産生を上昇させているという可能性を示唆した。この概念は今までに無いものであり、いままで触れられていなかった分裂状ミトコンドリアの機能不全を証明できる新しい知見になると考えている。この概念を証明するためにも、分子メカニズムのより詳細な解析が必要である。

## 総括

---

ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL が Drp1 の分解・排除によって、心臓の機能を正に調節していることを証明した。また、実際の心筋梗塞という病態において MITOL の機能が低下し、これが一部の心筋梗塞の毒性であることを証明した。MITOL の組織レベルでの解析は今回が初であり、MITOL の成体での重要性を示唆できた点も学術的に重要な知見である。

特に、Drp1 の毒性メカニズムをクリステリモデリングという新しい着眼点より提唱した点と、AAV を用いて MITOL の心筋梗塞時の創薬候補の可能性を証明した点は、学術的・臨床的に非常に貢献度が高いといえる。

ミトコンドリアをターゲットとした創薬開発はほとんどなされていない。心筋梗塞における MITOL のダウンレギュレーションのメカニズムを詳細に研究することで、日本発信のミトコンドリアターゲティングドラッグの開発が可能になるのではないかと考えている。今後は、MITOL の重要性をより明らかにするべく他の組織での解析を進め、MITOL という分子の意味を追っていきたい。

## 参考文献

---

1. Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoh, S., Tanaka, M., Shiojima, I., Hiroi, Y., and Yazaki, Y. (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 100, 1813-1821.
2. Archer, S.L. (2013). Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* 369, 2236-2251.
3. Casademont, J., and Miro, O. (2002). Electron transport chain defects in heart failure. *Heart Fail Rev* 7, 131-139.
4. Chen, L., Gong, Q., Stice, J.P., and Knowlton, A.A. (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* 84, 91-99.
5. Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2008). Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 294, C460-466.

6. Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., and Terzic, A. (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4 Suppl 1, S60-67.
7. Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnoczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of cell biology* 174, 915-921.
8. Dai, D.F., Johnson, S.C., Villarin, J.J., Chin, M.T., Nieves-Cintrón, M., Chen, T., Marcinek, D.J., Dorn, G.W., 2nd, Kang, Y.J., Prolla, T.A., et al. (2011). Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circ Res* 108, 837-846.
9. de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610.
10. Deng, H.X., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G.H., Khan, M.S., Hung, W.Y., Bigio, E.H., et al. (2006). Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular

linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 7142-7147.

11. Dhalla, N.S., Temsah, R.M., and Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18, 655-673.
12. Dorn, G.W., 2nd, and Maack, C. (2013). SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *J Mol Cell Cardiol* 55, 42-49.
13. Dorn, G.W., 2nd, and Scorrano, L. (2010). Two close, too close: sarcoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk and cardiomyocyte fate. *Circ Res* 107, 689-699.
14. Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358-362.
15. Hahn, A., Parey, K., Bublitz, M., Mills, D.J., Zickermann, V., Vonck, J., Kuhlbrandt, W., and Meier, T. (2016). Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Mol Cell* 63, 445-456.

16. Hausladen, A., and Fridovich, I. (1994). Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269, 29405-29408.
17. Hom, J., and Sheu, S.S. (2009). Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 46, 811-820.
18. Hoppel, C.L., Tandler, B., Fujioka, H., and Riva, A. (2009). Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1949-1956.
19. Ingraham, C.A., Burwell, L.S., Skalska, J., Brookes, P.S., Howell, R.L., Sheu, S.S., and Pinkert, C.A. (2009). NDUFS4: creation of a mouse model mimicking a Complex I disorder. *Mitochondrion* 9, 204-210.
20. Ishii, K., Hirose, K., and Iino, M. (2006). Ca<sup>2+</sup> shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO Rep* 7, 390-396.
21. Levy, D., Kenchaiah, S., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Kupka, M.J., Ho, K.K., Murabito, J.M., and Vasan, R.S. (2002). Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 347, 1397-1402.

22. Li, J., Donath, S., Li, Y., Qin, D., Prabhakar, B.S., and Li, P. (2010). miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS Genet* 6, e1000795.
  
23. Lin, X., Wu, M., Liu, B., Wang, J., Guan, G., Ma, A., and Zhang, Y. (2015). Candesartan ameliorates acute myocardial infarction in rats through inducible nitric oxide synthase, nuclear factor- $\kappa$ B, monocyte chemoattractant protein 1, activator protein 1 and restoration of heat shock protein 72. *Molecular medicine reports* 12, 8193-8200.
  
24. Mela-Riker, L.M., and Bukoski, R.D. (1985). Regulation of mitochondrial activity in cardiac cells. *Annu Rev Physiol* 47, 645-663.
  
25. Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 191, 1141-1158.
  
26. Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high  $Ca^{2+}$  close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744-747.

27. Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006). Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86, 369-408.
28. Rosca, M.G., Tandler, B., and Hoppel, C.L. (2013). Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 55, 31-41.
29. Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 114, 867-874.
30. Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., Hashizume, H., Speiser, B., Friedl, A., and Bleese, N. (1991). Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 83, 504-514.
31. Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N., and van der Bliek, A.M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *The Journal of cell biology* 143, 351-358.
32. Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H.M., Fukuda, T., Matsushita, N., et al. (2013). MITOL

regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol Cell* 51, 20-34.

33. Sugiura, A., Yonashiro, R., Fukuda, T., Matsushita, N., Nagashima, S., Inatome, R., and Yanagi, S. (2011). A mitochondrial ubiquitin ligase MITOL controls cell toxicity of polyglutamine-expanded protein. *Mitochondrion* 11, 139-146.
34. Toufektsian, M.C., Yang, Z., Prasad, K.M., Overbergh, L., Ramos, S.I., Mathieu, C., Linden, J., and French, B.A. (2006). Stimulation of A2A-adenosine receptors after myocardial infarction suppresses inflammatory activation and attenuates contractile dysfunction in the remote left ventricle. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 290, H1410-1418.
35. von Harsdorf, R., Li, P.F., and Dietz, R. (1999). Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99, 2934-2941.
36. Wang, J.X., Jiao, J.Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J.P., Li, Y.R., and Li, P.F. (2011). miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med* 17, 71-78.

37. Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., et al. (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 25, 3618-3626.
38. Yonashiro, R., Kimijima, Y., Shimura, T., Kawaguchi, K., Fukuda, T., Inatome, R., and Yanagi, S. (2012). Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL blocks S-nitrosylated MAP1B-light chain 1-mediated mitochondrial dysfunction and neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2382-2387.
39. Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Ogata, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., and Yanagi, S. (2009). Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Mol Biol Cell* 20, 4524-4530.
40. Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23, 5409-5420.

41. Ytrehus, K., Myklebust, R., Olsen, R., and Mjos, O.D. (1987).  
Ultrastructural changes induced in the isolated rat heart by enzymatically  
generated oxygen radicals. *J Mol Cell Cardiol* 19, 379-389.

## 実験試薬・操作

---

### [マウス]

C57BL/6N mouse (日本 SLC)

MITOL Flox mouse (理研、昭和薬科大学、石戸 聡先生より譲渡)

$\alpha$ MHC-MerCreMer mouse (日本クレア)

### [一次抗体]

Mitochondrial Marker Antibody Sampler Kit #8674 (Cell Signaling)

Drp1 (BD Bioscience, 611112)

Tom20 FL-145 (Santa Cruz, sc-11415)

$\alpha$ -Tubulin (Sigma, T-9026)

GAPDH (Acris, ACR001-PT)

MITOL3-1 (当研究室で作製)

MITOL N-terminal (Abcam, ab174959)

NDUFA9 (Invitrogen, 4591000)

ATP5A (Abcam, ab14748)

UQCRC2 (Abcam, ab14745)

Phalloidin TRITC (Sigma)

anti-HA mouse monoclonal 抗体 (COVANCE)

anti-FLAG M2 monoclonal 抗体 (Sigma)

### [二次抗体]

HRP-conjugated anti-mouse IgGs (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc)

HRP-conjugated anti-rabbit IgGs (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc)

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488

[フローサイトメトリーに用いた色素]

MitoTracker® Green FM (Molecular Probes, M7514)

MitoTracker® Red CMXRos (Molecular Probes, M7512)

MitoSOX™ Red (Molecular Probes, M36008)

[Genome PCR]

- Ex-Taq (TaKaRa)
- 10× Ex Taq Buffer (TaKaRa)
- dNTP Mixture (TaKaRa)
- primer Cre-Forward (Integrated DNA Technologies)  
5'-GTTTCACTGGTTATGCGGCGG-3'
- primer Cre-Reverse (Integrated DNA Technologies)  
5'-TTCCAGGGCGCGAGTTGATAG-3'
- primer IL-2-Forward (Integrated DNA Technologies)  
5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'
- primer IL-2-Reverse (Integrated DNA Technologies)  
5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'
- primer MITOL flox F (Integrated DNA Technologies)  
5'-CACAGGTACGGTAGGTGTGTAAGC-3'
- primer MITOL flox R (Integrated DNA Technologies)  
5'-ATGGGAATGTGGTTCAGTTGTACC-3'

[TUNEL 染色]

- In Situ Cell Death Detection Kit (Roche 11684795910)

[SA-β-gal 染色]

- Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling #9860S)

[qRT-PCR]

RNA 抽出 : RNeasy Mini Kit (QIAGEN)  
SV Total RNA Isolation System (Promega)  
cDNA 合成 : ReverTra Ace® qPCR RT Kit (TOYOBO)  
qRT-PCR 試薬 : Thunderbird (TOYOBO)  
RNAlater (sigma)

• primer

[ $\alpha$ MHC]

Fw : 5'- ACGGTGACCATAAAGGAGGA -3'

Rv : 5'- TGTCCTCGATCTTGTCGAAC-3'

[ $\beta$ MHC]

Fw : 5'- GCCCTTTGACCTCAAGAAAG -3'

Rv : 5'- CTTACAGTCACCGTCTTGC -3'

[GAPDH]

Fw : 5'- CCTGCACCACCAACTGCTTAGC -3'

Rv : 5'- GCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC -3'

[組織免疫染色]

•20% PFA

PFA10g を 1×PBS に溶かし、50mL までメスアップし、65℃ で溶かす。溶けない場合は、10N NaOH を加える。

•20% スクロース

スクロース 10g を PBS で溶かし、50mL までメスアップ

•10% スクロース

スクロース 5g を PBS で溶かし、50mL までメスアップ

•OCT compound (Sakura)

•Hoechst 33258 (Nacalai Tesque)

パラフィン切片

HE 染色 : Mayer's Hematoxylin Soln (和光純薬工業)

1 %Eosin Y Solutions (和光純薬工業)

TUNEL assay : in situ cell death detection kit, TMR red (Roche)

Masson's Trichrome Stain : (Sigma)

蛍光染色

[Tom20]

- anti-Tom20 (SANTA CRUZ Tom20(FL-145) : sc-11415)
- Alexa Fluor 488

[LC3B]

- anti-LC3B (NOVUS NB600-1384)
- Alexa Fluor 488

[Blocking]

BSA : nacalai tesque pH 7.0 牛血製アルブミン(一般グレード)純度 98%

FBS : SIGMS Fetal Bovine Serum Cell Culture Tested Sterile Filtered Hybridoma Tested  
172012-500ML

• 10x PBS

NaCl	58g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	3.6g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12H <sub>2</sub> O	27.6g
Total	1L (milliQ)

• sample buffer 1x

0.5M Tris-HCl pH6.8	1.25mL
2-メルカプトエタノール (Wako)	0.5mL
10% SDS	2mL
Sucrose (関東化学工業)	0.5g
Bromophenol Blue (Wako)	0.5mg
Total	10mL (milliQ)

• sample buffer 4x

2M Tris-HCl (pH7.5)	5mL
SDS	4g
グリセロール	20mL
BPB(Wako)	0.15g
Total	50mL (milliQ)

• western buffer

Glycine	14.4g
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol	3.0g
Sodium Dodecyl Sulfate	0.1g
MeOH	200mL
Total	1L (milliQ)

• 10x Tris-glycine 泳動 buffer

Tris	30.2g
Glycine	144.2g
SDS	10g
	MQ で up to 1000ml

• TBS 1x

NaCl	8g
KCl	0.2g
Tris	3g
	MQ で up to 1000ml

- TBST

1×TBS 1000ml に、10% tween20 を 5ml 加える。

- ウェスタンブロッティング用ゲル作製

	6%	8%	10%	12%	14%
30% Acrylamide Mix	3ml	4ml	5ml	6ml	7ml
DW	8.15ml	7.15ml	6.15ml	5.15ml	4.15ml
1.5M Tris-HCl(pH8.8)	3.75ml	3.75ml	3.75ml	3.75ml	3.75ml
10%SDS	150μl	150μl	150μl	150μl	150μl
TEMED	12μl	12μl	12μl	12μl	12μl
(ミニゲル二枚分)					Total15ml

濃縮ゲル

30% Acrylamid mix	0.75ml
DW	4.8ml
0.5M Tris-HCl (pH6.8)	1.87ml
10% SDS	75μl
TEMED	6μl
(ミニゲル二枚分)	

- Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution(TOYOBO)

- Immobilon Western HRP Substrate Luminol Reagent (MILLIPORE)

- Homogenization buffer

1M HEPES-KOH (pH7.4)	5mL
D (-) – Mannitol (和光純薬工業)	20g
Sucrose	11.98g

Total 500mL  
(milliQ)

• Complex I Activity Assay buffer

Assay medium		stock	vol
25 mM	K phosphate (pH7.2, 20°C)	1M	0.5 ml
5 mM	MgCl <sub>2</sub>	1M	100 ul
2.5 mg/ml	BSA (fraction V)	100 mg/ml	0.5 ml
		H <sub>2</sub> O	18.9 ml
		total	20 ml
13 mM	NADH		
65 mM	Ubiquinone1 (in ethanol)		
1 mg/ml	Antimycin A (in ethanol)		
1 mg/ml	Rotenone (in ethanol)		

• Complex II Activity Assay buffer

Assay medium		stock	vol
25 mM	K phosphate (pH7.2, 20°C)	1M	0.5 ml
5 mM	MgCl <sub>2</sub>	1M	100 ul
20 mM	Sodium succinate	1M	0.4 ml
		H <sub>2</sub> O	19 ml
		total	20 ml
0.3M	KCN		
5 mM	2,6-Dichlorophenolindophenol (DCIP)		
65 mM	Ubiquinone1 (in ethanol)		
1 mg/ml	Antimycin A (in ethanol)		
1 mg/ml	Rotenone (in ethanol)		

•Complex III Activity Assay buffer

Assay medium		stock	vol
50 mM	K phosphate (pH7.4, 20°C)	1M	1.0 ml
1.0 mg/ml	BSA (fraction V)	25 mg/ml	0.8 ml
		H2O	18.2 ml
		total	20 ml
2.5 mM	Cytochrome c (III)		
30 mM	n-Dodecyl-b-D-maltoside		
solod	Ascorbic acid		
10 mM	Decylubiquinol (in ethanol)		
1 mg/ml	Rotenone (in ethanol)		

•Complex IV Activity Assay buffer

Assay medium		stock	vol
20 mM	K phosphate (pH7.2, 20°C)	1M	0.4 ml
		H2O	19.6 ml
		total	20 ml
3 mM	Cytochrome c (II)		
30 mM	n-Dodecyl-b-D-maltoside		

• Ischemia Buffer

NaCl	118mM
NaHCO <sub>3</sub>	24mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5mM
MgCl <sub>2</sub>	1.2M
KCL	16mM

Sodium Lactate	0.28%
2-deoxyglucose	0.16%

• Homogenization Buffer

1M HEPES-KOH pH7.4	10mM
Mannitol	220mM
Sucrose	0.07M

• RIPA Buffer

2M Tris-HCL pH8.0	10mM
EDTA	5mM
NaCl	150mM
SDS	0.1%
DOC	0.05%
TritonX-100	1%

※最終的に pH7.4 に調整

機器

サーマルサイクラー

TaKaRa PCR Thermal cycler Dice (TaKaRa)

Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems)

顕微鏡

OLYMPUS FV1000-D

OLYMPUS IX71

Nikon SMZ1500

KEYENCE BZ-9000

遠心機

SAKUMA 50A-IVDP

TOMY MX-100

Himac CF 15RX

クリオスタット

HIM550 (MICROM EDGE instruments)

クリオスターNX70 (Thermo scientific)

その他

LAS-3000mini (FUJIFILM)

MULTI-SHAKER OVEN HB (TAITEC)

SONIFIER 150 (BRANSON)

Printgraph (ATTO)

BI-525 (ASTECC)

Prescyto MG-71M (タイテック)

## 操作

### マウス実験

マウスを用いた実験においては、東京薬科大学 動物実験施設管理運営委員会により実験の承認を頂いており（「遺伝子改変マウスを利用したミトコンドリアの機能解析」）、「東京薬科大学 実験動物施設利用の手引」を遵守しながら、動物愛護の観点に基づき遂行した。

### 麻酔方法

開胸の際は頸椎脱臼により安楽死処置を行った上で行った。ネンブタール注射液（濃度 50mg/ml）を生理食塩水で 10 倍に希釈し、投与量 30～40mg/kg で麻酔を行った。また、5%イソフルランによる吸引麻酔を導入麻酔として利用した。

### Genome 精製

組織片(マウスの尾)に 50mM NaOH 180 $\mu$ L を加え、95°C 30 分インキュベートした。次に、1M Tris-HCl (pH8.0) 20 $\mu$ L を加え、ボルテックスで攪拌後、15000rpm 4°C 10 分遠心した。

### Genome PCR

#### ・ PCR-Cre

Ex-Taq	0.05 $\mu$ L
10 $\times$ Ex Taq Buffer	1 $\mu$ L
dNTP Mixture	0.8 $\mu$ L
10 $\mu$ M primer Cre-Forward	0.25 $\mu$ L
10 $\mu$ M primer Cre-Reverse	0.25 $\mu$ L
10 $\mu$ M primer	0.25 $\mu$ L
IL-2-Forward	
10 $\mu$ M primer IL-2-Reverse	0.25 $\mu$ L
Template	0.5 $\mu$ L

Total	10 $\mu$ L (DW)
• PCR-MITOL flox	
Ex-Taq	0.05 $\mu$ L
10 $\times$ Ex Taq Buffer	1 $\mu$ L
dNTP Mixture	0.8 $\mu$ L
10 $\mu$ M primer MITOL flox F	0.25 $\mu$ L
10 $\mu$ M primer MITOL flox R	0.25 $\mu$ L
Template	0.5 $\mu$ L
Total	10 $\mu$ L (DW)

PCR チューブに表の組成で試薬を入れ、サーマルサイクラーで PCR を行う。

• Reaction Conditions

Step	temp (°C)	time (秒)	Note
1	98	30	
2	94	1	Repeat for 30 cycles
3	60	10	
4	68	30	
5	4	$\infty$	

### TUNEL 染色

パラフィン切片を段階的なエタノールとキシレンを用いて脱パラフィンし、DW に 5 分浸水させた。20 $\mu$ g/mL Protein Kinase / PBS (+) を PBS で 500 倍希釈し、100 $\mu$ L ずつ滴下し、室温 15 分インキュベートした。PBS を用いて洗浄した。positive control を作製する場合、DNase1 (20 $\mu$ g/mL) を 100 $\mu$ L ずつ滴下し、37°C 20 分 インキュベートさせた。In Situ Cell Death Detection Kit (buffer 45 $\mu$ L, enzyme 5 $\mu$ L) を滴下し、37°C 90 分 インキュベートした。PBS を用いて洗浄した。ヘキスト処理を行う (Hoechst 100000 倍希釈) 1 分。PBS を用いて洗浄した。Fluorescent Mounting Medium を使用し封入した。

### 電子顕微鏡観察

マウスを頸椎脱臼し早急に心臓を取り出す。PBS (4°C) を用いて心臓中の血液を取り除く。PBS (4°C) 中で組織を素早くエタノールで脱脂した剃刀で 1mm 角程度の角材に切り出す。2.5% Glutaraldehyde-0.1M Phosphate Buffer の固定液に入れて、4°C 2時間の固定を行う。固定後、専用の容器に組織片を潰さないように移動し、BML 電子顕微鏡診断サービスへ送付した。得られた画像よりミトコンドリアの大きさを、Fiji を用いて面積を測定し分布を解析した。

### ミトコンドリア分画の採取

マウスを頸椎脱臼し早急に心臓を取り出す。PBS (4°C) を用いて心臓中の血液を取り除く。PBS (4°C) 中で心臓を細断した。おおよそ 0.5mm 角以下になるまでしっかり細断した。裁断後、数回 PBS (4°C) を用いて組織片を洗浄し血液を取りきった。PBS を 4°C HB buffer (10mM HEPES, 220mM mannitol, 0.07M sucrose, +protease inhibitor (1mM PMSF, 10ug/mL Leupeptin, 10ug/mL Aprotinin)) に置換した。置換後、ダウンスホモジナイザーを用いて組織片をホモジェネートした。10~15 Stroke のホモジェネートを行い、遠心分離をかけた。800g 10分 4°C後、上清を再度、800g 10分 4°Cにかけた。次に、上清を 8000g 10分 4°Cの遠心にかけてミトコンドリア分画を取った。沈殿のミトコンドリアを一度 HB buffer を用いて再懸濁し洗浄した。再度、8000g 10分 4°Cの遠心にかけてミトコンドリア分画を採取した。細胞の場合、15cm プレートで培養した細胞にプロテアーゼインヒビターを添加した Homogenization Buffer (PMSF×200, Aprotinin×1000, Leupeptin×1000, DTT×100)を加えてスクレーパーで剥ぎ取り回収した。その後、ホモジナイザーで細胞を破碎し、これを Whole Cell Lyate (WCL)分画として回収した。後の操作は組織と同様に行った、

### フローサイトメトリーを用いたミトコンドリア形態評価

得られたミトコンドリア分画を 200nM MitoTracker Green, 2.5uM MitoSOX / PBS を用いて室温 20分の染色を行った。フローサイトメトリーは SONY SH800 を使用し、

ミトコンドリアサイズはフローサイトメトリーの FSC および MitoTrackerGreen (FITC channel) のシグナルによって評価した。ミトコンドリア ROS 量は MitoSOX (PE channel) によって検出した。それぞれ 100,000 events 以上のミトコンドリアをカウントし、統計解析を行った。

#### 免疫沈降

細胞をインキュベーターから取り出し、1×PBS で 1 回 wash した。プロテアーゼインヒビターを添加した RIPA Buffer (PMSF×200, Aprotinin×1000, Leupeptin×1000, DTT×100) で細胞を溶解し、その後氷上にしばらく置いた後、スクレーパーで細胞を剥ぎ取り回収した。氷上に静置した後、ソニケーションにより細胞を破碎し、14000G で 10 分間遠心した。上清を用いて目的の抗体と反応させた後に、ProteinG を添加して反応させた。RIPA Buffer で 5 回 wash をしてからサンプルバッファーを加えてサンプル化した。

#### ウェスタンブロット解析

1mg のタンパク質に対し 1x sample buffer を 30 倍量加え、95°C で 5 分間処理した。適した濃度のポリアクリルアミドゲルに泳動し、0.45 μm PVDF メンブレンに転写した。転写メンブレンを blocking buffer (5% Skim Milk、0.05% Tween20/PBS) で室温 1 時間浸透後、blocking buffer で希釈した一次抗体を加え、4°C で一晩浸透した。組織サンプルを使用する場合、一次抗体希釈の際に Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) を使用した。使用した 1 次抗体は以下の通りである： Mitochondrial Marker Antibody Sampler Kit #8674 (Cell Signaling); それぞれ 2000:1、Drp1 (BD Bioscience, 611112); 1000:1、Tom20 FL-145 (Santa Cruz, sc-11415); 2500:1、α-Tubulin (Sigma, T-9026); 5000:1、GAPDH (Acris, ACR001-PT); 2000:1、MITOL3-1 (当研究室で作製); 1000:1、MITOL N-terminal (Abcam, ab174959); 1000:1、NDUFA9 (Invitrogen, 4591000); 2500:1、ATP5A (Abcam, ab14748); 2000:1、UQCRC2 (Abcam, ab14745); 4000:1、Phalloidin TRITC (Sigma); 5000:1、anti-HA mouse monoclonal 抗体 (COVANCE); 2000:1、anti-FLAG M2 monoclonal 抗体 (Sigma); 2000:1。反応後 0.1% Tween20/PBS にて洗

浄し、blocking buffer で希釈した HRP-conjugated anti-mouse IgGs (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc) (10000:1)、  
HRP-conjugated anti-rabbit IgGs (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc) (10000:1)  
を室温で1時間反応させ、再度 wash buffer にて洗浄後、Immobilon Western HRP  
substrate (Millipore)で検出した。定量解析は ImageQuant™ LAS4000 biomolecular  
imager(GE Healthcare)、LAS-3000mini (FUJIFILM)、WSE-6100 LuminoGraph  
(ATTO) にて行った。

#### 組織 ATP 量の測定

東洋インキ 『組織の』 ATP 測定キット (Wako) を使用した。マウスを頸椎脱臼し早急に心臓を取り出した。PBS (4°C) を用いて心臓中の血液を取り除いた。新鮮な動物臓器 0.1g に、冷えた 10mL(100 倍容)のホモジネートバッファー(0.25M Sucrose 10mM HEPESNaOH pH 7.4)を加えて、氷中でホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離(1,000g 4°C 10 分)した。上清をパスツールピペットを用いてきれいなチューブに分取し、氷中に静置した。ボルテックスミキサーで懸濁した上清 1mL に、冷えた 7mL(8 倍容)のホモジネートバッファーを加えて、氷中に静置した。希釈した上清をボルテックスミキサーで懸濁し、上清と室温に戻した ATP 抽出試薬を等量混合した(上清 50  $\mu$  L+ATP 抽出試薬 50  $\mu$  L)。5 回転倒混和を行い、上清と ATP 抽出試薬を混合した。室温に 30 分間静置し、ATP を抽出させた。検体を数回転倒混和し、濃度を均一化させた後、キュベットに検体 20  $\mu$  L を分注した。キュベットに、室温に戻した L/L 試薬 100  $\mu$  L を添加した。素早くキュベットを 2、3 度振り、ルミノメーターを用いて 1 検体毎測定を行った。

#### タンパク質量の測定

XL-Bradford [SDS-PAGE 適応] (アプロサイエンス) を使用した。

SDS-PAGE サンプルバッファーを用いて 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/mL のウシ血清アルブミン(BSA)溶液を調製し、通常の Bradford 法と本試薬を用いて検量線を作製した。[ $\times 5$ ] XL-Bradford 試薬を室温に戻してから、超純水で 5 倍希釈して十分に

混和し、0.45  $\mu$  m フィルターなどを用いてフィルトレイトした。

サンプル及びスタンダード 10  $\mu$  L に対して、希釈・ろ過した XL-Bradford 試薬を 500  $\mu$  L 加え、混合した。次に、室温で 5 分間インキュベートした。最後に 595nm で吸光度を測定した。

### 吸光度法を用いた呼吸鎖活性評価

#### Complex I Activity Assay

ミトコンドリアは、あらかじめ低張液中 (25 mM K phosphate (pH7.2, 20°C), 5 mM MgCl<sub>2</sub>) で凍結融解を 3 回繰り返す、膜を破壊しておいた。

##### Protocol

Assay is performed at 30°C

1 mL Assay medium

↓ add 6.7  $\mu$ L of 0.3 M KCN

NADHの酸化を測定 ( $e= 6.81 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

↓ add 10  $\mu$ L of 13 mM NADH

↓ add 2  $\mu$ L of 65 mM Ubiquinone1

↓ add 2  $\mu$ L of 1mg/mL Antimycin A

measure OD340nm (ref. 425 nm) each 10 秒 for 1 分

↓ add mitochondria (20  $\mu$ g protein for heart; 200  $\mu$ g for liver)

measure OD340nm (ref. 425 nm) each 10 秒 for 2 分

↓ add 2  $\mu$ L of 1mg/mL Rotenone

measure OD340nm (ref. 425 nm) each 10 秒 for 1 分

#### Complex II Activity Assay

##### Protocol

Assay is performed at 30°C

1 mL Assay medium

↓ add mitochondria (10  $\mu$ g protein for heart; 40  $\mu$ g for liver)

preincubate at 30°C for 10 分

↓ add 2  $\mu$ L of 1mg/mL Antimycin A

DCIPの還元を測定 ( $e= 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

↓ add 2  $\mu$ L of 1mg/mL Rotenone

↓ add 6.7  $\mu$ L of 0.3 M KCN

↓ add 10  $\mu$ L of 5 mM Dichlorophenolindophenol

measure OD600 nm each 10 秒 for 1 分

↓ add 1  $\mu$ L of 65 mM Ubiquinone1

measure OD600 nm each 10 秒 for 2 分

## Complex III Activity Assay

Protocol	Assay is performed at 30°C
1 mL Assay medium	
1 mM ↓ add 2 uL of 0.5 M KCN	
1ug/mL ↓ add 1 uL of 1mg/mL Rotenone	
1 mM ↓ add 33 uL of 30 mM n-Dodecyl-β-D-maltoside	
↓ add mitochondria (4 ug protein for heart; 20 ug for liver)	
100 uM ↓ add 10 uL of 10 mM Decylubiquinol	
15 uM ↓ add 6 uL of 2.5 mM cyt c (III)	cyt c の還元を測定 (e= 19 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )

## Complex IV Activity Assay

Protocol	Assay is performed at 30°C
1 mL Assay medium	
↓ add 5 uL of 3 mM cyt c (II)	cyt c の酸化を測定 (e= 19 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
↓ add 15 uL of 30 mM n-Dodecyl-β-D-maltoside	
measure OD550nm (ref. 580 nm) each 4 秒 for 30 秒	
↓ add mitochondria (3 ug protein for heart; 15 ug for liver)	
measure OD550nm (ref. 580 nm) each 4 秒 for 90 秒	

## COX/SDH 染色

### 【凍結切片の作成】

頸椎脱臼もしくは断頭によってマウスを処置した。直ぐに組織を取り出し、PBS (4°C) を用いて組織に付着している血液を洗浄した。洗浄した組織をOTCコンパウンドになじませたあと液体窒素を用いて急速冷凍した。薄切のため、台に組織を固定し、-18°C 14umの設定で組織を薄切した。

### 【COX染色】

切片の乗ったスライドガラスを室温で十分に乾燥させた。染色の際は全て湿潤箱中で操作した。1X DAB / 100μM cytochrome c in 0.1M PBS pH=7.0 を、Vortexを用いて混合した。この溶液に2μg bovine catalase (2μg/mL or approximately 4IU/mL) を加え、次にカタラーゼの全粒子を破壊するためにボルテックスを用いてよく混和した。

全面に行き渡るようにスライドに垂らした。150-200 $\mu$ L / Slide 37°Cで40分間、湿潤箱中で温める。最後に0.1M PBS pH=7.0 を使用して4回10分の洗浄を行った。

#### 【SDH染色】

1.5mM NBT, 130mM sodium succinate, 0.2mM PMS, and 1.0mM sodium azide in 0.1M PBS pH=7.0 を混ぜてVortexした。全面に行き渡るように溶液をスライドに垂らした。150- 200 $\mu$ L / Slideを37°Cで40分間、湿潤箱中で温めた。次に0.1M PBS pH=7.0 を使用して4回10分の洗浄を行った。ここまでの脱水の作業までは全て遮光で操作した。脱水操作に入り、70%→70%→95%→95%→99.5%それぞれ2分ずつ入れた。最後に99.5%エタノール10分を行います。最後xyleneに10分浸し、カバーガラスをマウントした。少なくとも1～2時間は乾燥させて顕微鏡下で観察した。

#### カルボニル化タンパクの検出

##### 【電気泳動と転写】

電気泳動用サンプルを調製した。サンプルを電気泳動した。酸化タンパク質コントロールは1レーンあたり10 $\mu$ Lを使用した。ゲル中のタンパク質をPVDF膜に転写した。

##### 【DNPH 誘導体化】(すべての項目は室温で行う。また、膜を振盪した。)

転写した膜を100%メタノールに1分間浸漬した。膜を20%メタノール - 80% TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.14 M NaCl)で5分間振盪した。次に膜を2 N HClで5分間振盪した。10 mLの1 $\times$ DNPH溶液を調製し(10 $\times$ DNPH溶液をよく振盪し、2 N HClで希釈)、膜を1 $\times$ DNPH溶液に正確に5分間、振盪、反応させた。反応後、膜を2 N HClで5分間 $\times$ 3回振盪した。膜を100%メタノールで5分間 $\times$ 7回振盪した。最後に、膜をTBSで5分間振盪した。

##### 【抗体反応、検出】

ブロッキング液5%スキムミルク/TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 0.1%Tween-20)で1時間振盪させブロッキングした。ウサギ抗DNP抗体を10 mLの5%スキムミルク/TBSTに2,000倍希釈(5 $\mu$ Lを使用)し、室温で1時間反応させた。TBSTで5分間 $\times$ 3回振盪した。二次抗体を5%スキムミルク/TBSTで希釈

し、室温で 1 時間反応させた。TBST で 5 分間×3 回振盪した。最後に、ケミルミネッセンス (化学発光) を使用して発光を確認した。

## BN-PAGE

NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System を使用。

### 【Running Buffer の準備】

BisTris(ナカライテスク) 10.46g と Tricine(ナカライテスク) 8.96g を milliQ 1000mL に溶かした。溶かした後、一部を Cathode 用に分取し、CBB G-250(ナカライテスク) を 0.02% となるように加えてよく溶かした。Running Buffer と Cathode Buffer はパラフィルムをし、氷上で冷却した。

### 【サンプル調整】

20ug / lane のミトコンドリアを使用し、detergent / protein (g/g) となるようにジギトニン(和光純薬工業)・DDM(同仁化学研究所)を加えた。4x sample buffer 10uL + detergent + ミトコンドリア (20ug) を DW で 40uL へメスアップした。十分に溶解させるため室温において 50 回ピペッティングした。ピペッティング後、サンプルを氷上に 15 分静置した。不溶分画を除くため 15,000rpm、30 分、4°C で遠心かけた。遠心後、沈殿を吸わないように上清を新しい PCR チューブに回収し、detergent の 1/4 量の 5% CBB G-250 を添加した。サンプル全量を NativePAGE™ Novex™ 3-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well にアプライした。

### 【電気泳動】

泳動槽を予め 4°C 室で冷しておいた。ゲルをセットし、サンプルのアプライができたから泳動槽と電源を 4°C 室へ移動させ冷却しながら泳動を開始した。始めサンプル下端の泳動がウェルの下端に来るまでは定電圧 100V で泳動し、その後定電圧 150V で泳動した。泳動がゲル版の上部 1/3 まで来たら、その時点での電流で泳動を再スタートさせた。このときに Cathode buffer を CBB G-250 0.02% のものから 0.002% のものに交換した。

#### BN-PAGE からのウェスタンブロッティング

ウェット型の転写装置を用いてタンパク質を PVDF 膜へ転写させた。転写の際には SDS の含まれていない Transfer Buffer (192mM Glycine, 25mM Tris, 20%(v/v) Methanol) を使用した。気泡が入らないようゲルとろ紙・スポンジをセットし、4℃ 室において 30V 90mA 定電流で泳動を over night で行った。泳動後タンパク質の固定のために、8% Acetic Acid / milliQ に室温 15 分浸した。固定後、酢酸の匂いが取れるまで milliQ でメンブレンを洗浄した。数回の洗浄後、メンブレンをキムタオルの上に静置し、室温でメンブレンを白くなるまで乾燥させた。乾燥後、CBB の色素を取り除くため Methanol にメンブレンを浸し、色素を取り除いた。メンブレンが白くなったら再度 milliQ を用いて洗浄し、ブロッキングの工程へ入った。マーカー部分は Methanol による脱色の前にハサミで切り取り、Colloidal Gold Total Protein Stain (Bio-Rad) をもちいて室温 30 分~で染色した。

#### ComplexV in gel activity assay

ComplexV の活性評価を行う際は、途中 CBB G-250 0.002% に交換はせずにそのまま CBB G-250 0.02% で泳動を行った後のゲルを使用した。このゲルを Incubation Buffer (35mM Tris, 270mM Glycine, 14mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2%(w/v) Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 8mM ATP) で 37℃ 3 時間、浸透しながら反応させた。反応後、ゲル表面の粉っぽさがある程度取れるまで DW で洗浄し、ゲル中の白いバンドを定量した。

#### 浸透圧ポンプを用いた心負荷モデルマウスの作製

イソプロテレノール(ナカライテスク)を 60mg/kg/days となるように PBS で希釈し、Alzet mini-osmotic pump (DURECT Corporation) をマウス背中側の皮下に埋め込み、心負荷を誘導させた。コントロール群として PBS のみのものを使用した。誘導から 7 日後に心臓を取り出し解析を行った。

### 心筋細胞肥大の測定

凍結切片を用いてWheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 488 Conjugateの染色で細胞の肥大を測定した。頸椎脱臼によってマウスを処置したあと、直ぐに組織を取り出し、PBS (4°C) を用いて組織に付着している血液を洗浄した。洗浄した組織をOTCコンパウンドになじませたあと液体窒素を用いて急速冷凍した。薄切のため、台に組織を固定し、-18°C 8umの設定で組織を薄切した。薄切した組織をスライドガラスに貼り付け、室温30分以上乾燥させた。次に、スライドガラスをPBSで洗浄しOTCコンパウンドを取り除いた。しっかりと取り除いたことを確認し、4%PFA(WAKO) / PBSで組織を固定した。固定後、5% BSA(sigma) / PBSを用いて室温 30分の固定を行い、その後1/2500希釈したWheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 488 Conjugateをスライドガラスに垂らし、乾燥を防ぐためパラフィルムをして室温 60分の反応を行った。PBSの洗浄を5分 3回を行い、Fluorescence Mounting Medium(DAKO)を使用して封入した。細胞面積の測定にはFijiを用い、薄切方向による細胞肥大の影響を取り除くため、心筋繊維方向に対して垂直に薄切されている断面が真円に近い部位の心筋細胞の面積を測定した。

### マッソントリクローム染色

Trichrome Stain(Masson)Kit(Sigma-Aldrich)を使用した。

#### 【パラフィン切片の作製】

頸椎脱臼によってマウスを処置したあと、直ぐに組織を取り出し、PBS (4°C) を用いて組織に付着している血液を洗浄した。血液がしっかりと洗浄されていることを確認し、4%PFA(WAKO) / PBS を用いて組織を 4°C over night で固定させた。固定液が残留すると置換作業に影響がでるため、固定した組織を水道水で流洗した。カセットに組織を入れ、シャープペンシルで個体番号を表記した後、このカセットごと5分以上流洗した。純粋で希釈したエタノールを用いて組織中の水分をエタノールに置換した。はじめに5分浸す作業を2回行った。次に、組織中の水分を完全にエタノールに置換するため、overnight 室温で置換させた。置換後、密閉型自動固定包埋機" Tissue-Tek VIP5 junior"を使用してパラフィン置換を行った。置換後、包埋機"TEC P-S-JO"を用いて組織をブロックへ包埋した。薄切は4umで行い、湯浴上でしっかりと進展させてからス

ライドガラスに貼り付けた。室温 風乾を 1 時間以上行いしっかりと乾燥させた後、染色工程へ入った。

#### 【マッソントリクローム染色】

キシレン・アルコールで脱パラフィンしたあと、流水洗後に精製水を通した。ブアン溶液-Bouin's solution で組織を 56°Cで 15 分で固定させた。水道水による水洗を行い、次に、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン溶液で 5 分染色した。水道水による水洗を行いビーブリッヒスカーレットー酸フクシン溶液で 5 分染色を行った。染色後、再度水道水による水洗を行い、最後に精製水で洗浄した。10%リンタングステン酸と 10%リンモリブデン酸を等量混合した溶液に 5 分浸水させ、洗浄せずそのままアニリン青溶液に 10 分浸水させた。染色後、スライドガラスに付着している染色が取れるまで精製水で洗浄し、イソプロパノールを用いて脱水した。スライドガラス上に粒状の水滴が無くなったことを確認し、キシレンで透徹した。最後にマリノール(武藤化学)で封入し、観察した。線維化面積の測定には Fiji を使用し、同じ部位の染色画像から心筋の単位面積当たりの線維化部位の割合 (%) を算出した。

#### 細胞肥大の測定

老化細胞に見られる細胞肥大は Phalloidin TRITC (Sigma)の染色像から算出した。細胞培養は 5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下において 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO)、100U/mL penicillin、100mg/mL streptomycin を含んだ DMEM (Nissui) で培養した。カバーガラスの入った 12well plate に細胞を播種し、5~6 割コンフルエントの状態での染色に入った。37°C PBS を用いて一度細胞を洗浄し、37°C 4% PFA / PBS を用いて 37°C 10 分の固定を行った。その後 PBS で洗浄し、0.2% TritonX-100/PBS で 10 分間静置した。PBS で 3 回洗浄し、3% BSA/PBS で 10 分間ブロッキングを行った。そして一次抗体を含む BSA 溶液を用いて室温で 1 時間反応させた。1 時間後 PBS で 3 回洗浄し、Fluorescent Mounting Medium (Dako)で封入して、顕微鏡で観察した。

### ミトコンドリアの形態観察

ミトコンドリアは冷却による刺激によって早急に形態が変化することから、固定までの作業は37°Cを維持するよう心がけた。細胞培養は5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下において10% Fetal Bovine Serum (GIBCO)、100U/mL penicillin、100mg/mL streptomycin を含んだDMEM (Nissui) で培養した。細胞をPBSで洗浄し、4% PFAを用いて37°C、10分間固定した。その後PBSで洗浄し、0.2% TritonX-100/PBSで10分間静置した。PBSで3回洗浄し、3% BSA/PBSで10分間ブロッキングを行った。そして一次抗体を含むBSA溶液を用いて1時間反応させた。1時間後PBSで洗浄し、二次抗体とHoechstを含むPBS溶液で30分間反応させた。そしてPBSで3回洗浄後、Fluorescent Mounting Medium (Dako)で封入して、顕微鏡で観察した。

### SA-β-gal 染色

Senescence β-Galactosidase Staining Kit(Cell Signaling)を使用した。35mm glass bottom dishに細胞を播種し8割コンフルエントあたりで染色を行った。37°C PBSで細胞を一度洗浄し、1x Fixative Solution 1mLで室温15分の固定を行った。室温のPBSを用いて2回の洗浄を行い、β-Galactosidase Staining Solutionを加えた。Staining Solution, SolutionA, SolutionB, X-galの入ったβ-Galactosidase Staining SolutionのpHを塩酸を使用して6.0に合わせた。β-Galactosidase Staining Solutionの入った35mm Dishにパラフィルムをし、炭酸ガス調整のない37°Cインキュベーターでovernightの染色を行った。染色後、顕微鏡下で青色に示させる老化細胞を観察した。組織の染色においては、頸椎脱臼もしくは断頭によってマウスを処置したあと、直ぐに組織を取り出し、PBS(4°C)を用いて組織に付着している血液を洗浄した。血液がしっかりと洗浄されていることを確認し、4%PFA(WAKO)/PBSをもちいて組織を4°C over nightで固定させた。PBSでWashし、10% Sucrose → 20% Sucrose → 30% Sucroseにそれぞれ半日以上の置換を行った。O.C.T. compound (Sakura)で凍結包埋し、クライオスタットで20umに薄切し、MASコートスライドガラスに貼り付けた。この切片を1時間程乾かした後に染色を行った。1X PBSでWashし、O.C.T. compoundを取り除いた後、pH4.0のβ-Galactosidase Staining Solutionに切片を浸けた。スライドメーラーにスライ

ドガラスを入れ、乾燥を防ぐためパラフィルムをし、37°Cで一晩インキュベートした。最後に 70% Glycerol in PBS で封入し、 $\beta$ -Galactosidase 陽性面積（青色発色）／全体の組織切片面積で解析および定量した。

#### リポスチンの観察

凍結切片を作製し、Keyence BZ-9000 を用いて赤色の自家蛍光を観察した。

頸椎脱臼によってマウスを処置したあと、直ぐに組織を取り出し、PBS (4°C) を用いて組織に付着している血液を洗浄した。洗浄した組織を OTC コンパウンドになじませたあと液体窒素を用いて急速冷凍した。-18°C 10um の設定で組織を薄切した。薄切した組織をスライドガラスに貼り付け、室温 30 分以上乾燥させた。次に、スライドガラスを PBS で洗浄し OTC コンパウンドを取り除いた。しっかりと取り除いたことを確認し、4%PFA(WAKO) / PBS で組織を固定した。

70% Glycerol in PBS で封入し、Keyence BZ-9000 を用いて赤色の自家蛍光を観察した。

#### 細胞における飢餓刺激

飢餓刺激を入れるまでは、細胞培養は 5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下において 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO)、100U/mL penicillin、100mg/mL streptomycin を含んだ DMEM (Nissui) で培養した。培地を捨て、37°Cの HBSS(+)（フェノールレッド不含）（Wako）で2度の洗浄を行い、5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下において HBSS による飢餓刺激を入れた。

#### 虚血刺激

刺激を入れるまでは、細胞培養は 5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下において 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO)、100U/mL penicillin、100mg/mL streptomycin を含んだ DMEM (Nissui) で培養した。予め虚血 buffer を低酸素インキュベーター 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、37°C（MG-70M タイテック）に置いておき、buffer 中の溶存酸素を取り除いておいた。培地を捨て、虚血 buffer による洗浄を行った後、虚血 buffer をシャーレに入れて低酸素刺激を行った。刺激後は、大気中の酸素分圧に極力曝されないよう、早急にサンプル処理を行った。

## 心筋特異的ノックアウトマウスの作製

本研究において作成したマウスは Cre-loxP 部位特異的組換え反応を利用した方法を使用している。組換え酵素の Cre は薬剤誘導により核内へ移行するようエストロゲン受容体の改変型タンパク Mer との融合型として発現するように遺伝子をデザインしている。「Cre-loxP 部位特異的組換え反応」とは 1981 年における phage の研究から見いだされた遺伝子の組換え反応であり、loxP という短い遺伝子配列を認識して Cre 組換え酵素が loxP 同士の配列間で組換え反応を起こす。この機序を用いて MITOL 遺伝子の exon を染色体から切り離し、MITOL の機能をなくす。

組換え酵素である Cre の遺伝子は心筋特異的に遺伝子発現している  $\alpha$ -MHC プロモーターの下流に挿入されている。またその前後に変異型エストロゲン受容体 Mer をコードする遺伝子を付加させることで、心筋でのみ転写翻訳後に Mer-Cre-Mer の融合型のタンパク質が発現するようにされている (Sohal, 2001)。変異型エストロゲン受容体 Mer は内在のエストロゲン様の物質には反応性を持たないが、外因性の Tamoxifen というエストロゲン様の化合物に反応する。転写翻訳後の Mer-Cre-Mer は細胞質内で HSP90 のシャペロンタンパクと複合体を形成しており、そのままではそのタンパク質の大きさの問題から核内へ移行できない (Zhang et al., 1998)。しかしながら外から Tamoxifen が細胞内へ入ることにより HSP90 が Mer-Cre-Mer から離れ、その結果として Cre 組換え酵素が核内へ移動できるようになる (図 7)。すなわち、この時に核内で Cre-loxP の反応が生じ MITOL の遺伝子がノックアウトされる。

loxP の配列は MITOL の機能ドメインであるリングフィンガードメインを含んでいる Exon の二番目を挟むように遺伝子挿入されている (図 a)。

### <要約>

- MITOL の Exon2 を挟むように loxP を挿入
- 心筋でのみ Mer-Cre-Mer を発現させる ( $\alpha$ -MHC プロモーターの下流)
- Tamoxifen 処置により Cre を核内へ移動させる
- 心筋でのみ MITOL を挟んだ loxP の組換えが生じる

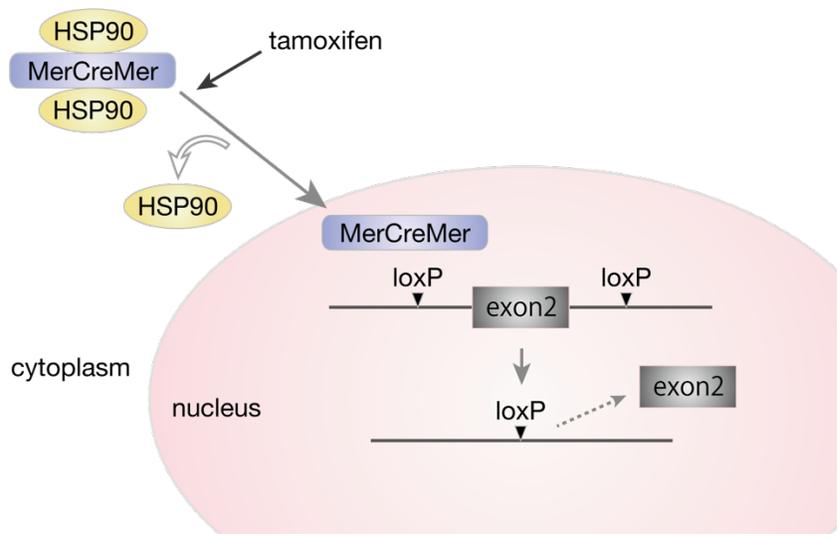


図 a : コンディショナル MITOL ノックアウトマウス作製方法

## 共同研究を行っていただいた先生

### ミトコンドリア呼吸活性評価

共同研究として防衛大学校 応用化学科 講師 天羽 拓にご依頼した。

### 心筋梗塞モデルラット作製・解析

共同研究として北海道大学大学院医学研究科 循環病態内科学・講師 絹川 真太郎先生、研究員 高田 真吾先生にご依頼した。

### 電子顕微鏡観察

共同研究として国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部室長 若月修二先生にご依頼した。

### AAV9 のパッケージング

共同研究として群馬大学 医学系研究科 神経生理学分野 助教 今野 歩先生にご依頼した。

### 心筋組織切片染色法

共同研究として慶応義塾大学 医学部 循環器内科 准教授 佐野 元昭先生にご依頼した。

### 心臓組織 SA- $\beta$ -gal 染色

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所）西田基宏 教授 西村明幸 特任助教にご依頼した。

### 心エコー解析

川崎医科大学 医学部 基礎医学 生理学 毛利聡 教授にご依頼した。

## 謝辞

---

本研究を進めるにあたり、多くの方々にご協力を頂きましたことを、この場をお借りして御礼申し上げます。

松下暢子准教授、福田敏史講師、長島駿助教、杉浦歩先生、稲留涼子先生には実験方法や研究の進め方など、的確なアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

防衛大学校 応用化学科 講師 天羽拓先生には共同研究を通して、多くのアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

北海道大学大学院医学研究科 循環病態内科学・講師 絹川 真太郎先生、研究員 高田 真吾先生には共同研究を通して、多くのアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部室長 若月修二先生には共同研究を通して、多くのアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

群馬大学 医学系研究科 神経生理学分野 助教 今野 歩先生には共同研究を通して、多くのアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

慶応義塾大学 医学部 循環器内科 准教授 佐野 元昭先生には共同研究を通して、多くのアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所）西田基宏 教授 西村明幸 特任助教には共同研究を通して、多くのアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

川崎医科大学 医学部 基礎医学 生理学 毛利聡教授には共同研究を通して、多くのアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

分子生化学研究室の研究室の先輩方、卒研生の方々には大変お世話になりました。感謝致します。

本大学、心血管医科学研究室、渡部琢也教授には副指導教官として御指導して頂きました。深く御礼申し上げます。

本大学、分子細胞生物学研究室、多賀谷光男教授には副指導教官として御指導して頂きました。深く御礼申し上げます。