基礎老化研究 46（1）; 33－36, 2022

【奨励賞受賞者研究トピックス】

上喉頭神経への慢性電気刺激は骨粗鬆症モデルラットの骨密度減少を部分的に抑制する

飯村　佳織、渡辺　信博、堀田　晴美
東京都健康長寿医療センター研究所　老化脳神経科学研究チーム　自律神経機能研究

キーワード：骨粗鬆症、カルシトニン、上喉頭神経、骨密度、ニューロモデュレーション

１．はじめに

ヒトでは、骨粗鬆症は加齢とともに増加し、特に閉経後の女性に頻発する。通常、骨はリモデリングにより骨吸収と骨形成を繰り返すことで、骨組織の劣化が修復され骨密度が維持される。しかし、閉経によるエストロゲンの減少などにより、骨吸収と骨形成がアンバランスになると、破骨細胞による骨吸収が異常に高まり、それに骨芽細胞による骨形成が追い付かないことで、骨密度が低下し骨粗鬆症を招く[1]。骨粗鬆症の治療薬の一つとしてカルシトニンが挙げられる。カルシトニンは甲状腺から分泌されるホルモンで、破骨細胞の表面に発現するカルシトニン受容体に結合すると、破骨細胞によるアクチンリングの形成を阻害し、骨吸収を急速に抑制する[2]。アクチンリングは破骨細胞の細胞骨格の一つであるアクチンフィラメントがリング状に集合したものであり、破骨細胞が骨基質表面に密着して骨吸収を行う時に形成される。アクチンリングの内側では骨基質の融解および分解が行われ、骨基質表面にハウシップ窩と呼ばれるくぼんだ形状が見られるのが特徴である。カルシトニンは破骨細胞に作用し骨吸収を停止させることで、相対的に骨形成を促進するホルモンといえる。治療には、サケカルシトニンやウナギカルシトニンの誘導体製剤等が用いられており、骨密度の増加効果[3,4]のほか、鎮痛作用[5,6]が基礎および臨床研究において認められている。しかしながら、一定量以上のカルシトニン製剤の投与はカルシトニン受容体のダウンレギュレーションを誘発し、破骨細胞に対する抑制効果を減弱させる[7]ため、カルシトニン製剤治療では効果が見られる最小量の製剤を断続的に投与する必要があり[8]、通院が患者の負担となってコンプライアンスが保たれにくいという課題も抱えている。

一方、我々は最近、麻酔下ラットを用いた研究で、迷走神経から分岐する上喉頭神経（superior laryngeal nerve; SLN）を電気刺激すると、甲状腺からのカルシトニン（内因性カルシトニン）分泌が増加することを見出した[9]。もし、意識下の動物においても SLN への電気刺激が安全、かつ効果的にカルシトニン分泌を増加させることが実験的に示されれば、骨粗鬆症に対する新たなカルシトニン治療法として発展する可能性が期待できる。本稿では、英国 Galvani Bioelectronics 社と米国 Case Western Reserve University との共同研究により実施した、意識下における上喉頭神経への電気刺激がカルシトニン分泌や骨密度に与える影響についての研究成果[10]を、筆者らが共同研究先（米国）で学んだ神経慢性電気刺激の手法の紹介を交え報告する。

２．意識下における上喉頭神経電気刺激のカルシトニン分泌への影響（健常動物での検討）

SLN を電気刺激するために、麻酔下でラット（雄、11-16 週齢）の前頸部から両側 SLN に約 2㎜の小さなカフ電極を埋め込み、さらに、血中のカルシトニン濃度を測定するために採血用のカテーテルを上大静脈（右心房の手前）に留置した（図１a）。手術後から２週間の回復期間中、術後管理のために抗生剤を２日間、抗炎症鎮痛剤を５日間投与し、餌は通常のペレットに加えて、ペレットをふやかしたものやゼリー状飼料などの軟らかい餌も与えた。また、４日に１度のペースでカテーテル内の充填物（ヘパリングリセロール）を新しいものに置き換えることでカテーテルが詰まらないよう管理した。

上喉頭神経は咽頭筋や輪状甲状筋、甲状腺に分布するほか、咽頭や喉頭の知覚を中枢に伝えて嚥下反射を引き起すことや[11-14]、ラットでは呼吸の抑制に関与することも示唆されている[15]。そのため、まずは、意識下における上喉頭神経刺激が安全に行えるかを明らかにするための探索を行った。動物用プレスチモグラフを用いて、SLN 刺激中（刺激幅 0.5ms, 頻度 40Hz, 刺激強度 15 ～ 120μA）の一回換気量や呼吸頻度をモニターしながら、忌避行動がおこらないかを注意深く観察した結果、30 秒間または５分間の刺激中、いずれの刺激強度でも一回

連絡先：飯村　佳織
〒 173-0015　東京都板橋区栄町 35-2
TEL：03-3964-3241
E-mail： kiimura@tmig.or.jp

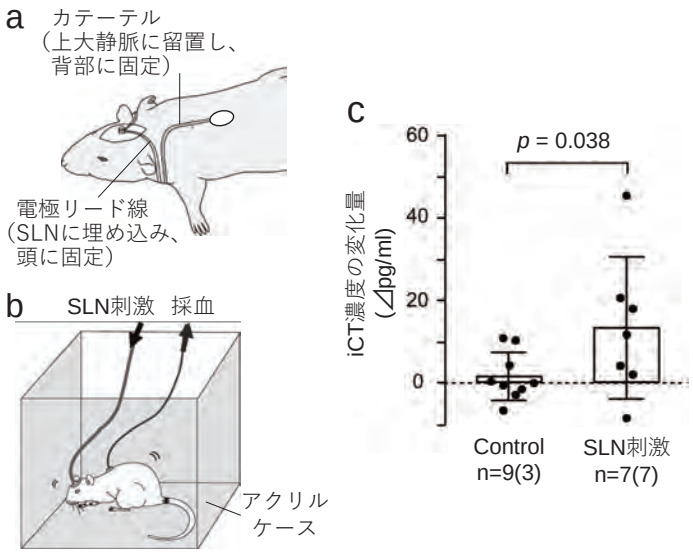

図１　意識下 SLN 刺激の方法と末梢血中 iCT 濃度への影響
a：SLN に埋め込んだ電極のリード線と上大静脈に留置したカテーテルは、皮下を通しラットの口が届かない頭頂部と背部に固定した。b:SLN 刺激（0.5ms, 40Hz, 90 μ A）および採血（各 500 μ l）は、アクリルケース内でラットの動きを制限することなく行われた。c：刺激前に対する刺激中の iCT 濃度の変化量を示す。平均値±標準偏差、●は各例の値を示す．unpaired t-test（one-tailed）。文献 10 より一部改変して引用。

換気量や呼吸頻度が抑制されることはなく、刺激を嫌がる行動も見られなかった。一方、90μA 以上の強度では、刺激中にラットが嚥下様の動きをしているのが見て取れた。

次に、安全性が確認できた刺激強度（90μA）で SLN 刺激を 8 分間おこない、刺激前と刺激中に、カテーテルを介して末梢血を採取した（図１b）。ELISA 法にて血漿中の免疫反応性カルシトニン（iCT）の濃度を計測し、刺激による変化を調べた結果、刺激中の iCT 濃度の増加はコントロール群（埋め込み手術をしたが刺激をしない群，３匹９例）に比べて刺激群（７匹７例）で有意に大きく、SLN 刺激群では刺激前よりも刺激中に約 13.3 pg/mL 増加していた（図１c）。これまでの麻酔下ラットにおける研究 [9] では SLN 刺激による甲状腺静脈血中での iCT の増加が明らかになっていたが、本研究により初めて意識下で末梢血レベルでの iCT 濃度の増加を確認することができた。ヒトでは末梢血中カルシトニンが 1pg/ml 増加すると骨吸収率が 1.27％減少することから [8]、意識下 SLN 刺激の骨密度低下に対する効果が大いに期待できる結果が得られた。

３．骨密度低下に対する上喉頭神経の慢性電気刺激の効果（骨粗鬆症モデルでの検討）

本実験には、閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出（OVX）ラットを用いた。12 週齢で卵巣摘出した３週後に、麻酔下で両側 SLN にカフ電極を埋め込み、前述した方法で術後管理をした。餌は標準的な量のカルシウムを含有する（約１％）ペレットを主に与えた。まず、筆者らの飼育環境下で骨粗鬆症モデルが作成できるのかを確認するために、*in vivo* で X 線像を撮影して大腿骨の骨密度の経時的変化を観察した。すると、術後２週目には卵巣を摘出していない偽手術ラットに比べて顕著な骨密度の低下が認められた。術後８週目に解剖し、大腿骨と脛骨の骨密度を DXA 法により厳密に調べると、大腿骨では遠位骨幹端、脛骨では近位骨幹端の骨密度が偽手術ラットに比べて約 30％も減少していた。この結果は、11 週齢で卵巣摘出されたラットにおいて、脛骨近位部と大腿部遠位部で局所性の骨量減少が見られた先行研究 [16] の結果と一致した。

次に、上記モデルを用いて SLN を慢性的に刺激した場合の骨密度への影響を調べた。11 匹のラットに埋め込み手術を行ったが、そのうち５匹は、ラット自身が電極接続部分を破壊してしまったため SLN 刺激が不可能となってしまった。そのため、本研究における慢性 SLN 刺激モデル作成の成功率は約５割であった。２週間の回復期間後、前述の実験で末梢血中の iCT 濃度を増加させた刺激パラメーターを用いて、SLN 刺激を断続的（１時間ごとに１回８分間の刺激を１日７回、これを週に４日間）に３- ４週間実施した（図２a）。なお、OVX ラットに対するカルシトニン製剤投与は暗期よりも明期が効果的であった報告 [17] から SLN 刺激は明期のみ実施した。刺激期間終了後ラットを安楽殺し、カフ電極内に SLN が収まっているか、周囲組織に炎症がないかを確認した。SLN 刺激を実施した６匹中１匹では電極を埋め込んだ部分の周囲に炎症が見られたため、この例を除いた５匹を SLN 刺激群として解析した。コントロール群（卵巣摘出と埋め込み手術は行ったが SLN 刺激は受けなかった群，n=5）では炎症は確認されなかった。続いて、これら刺激群とコントロール群から大腿骨と脛骨を取り出し、DXA 法にて骨密度を計測した。卵

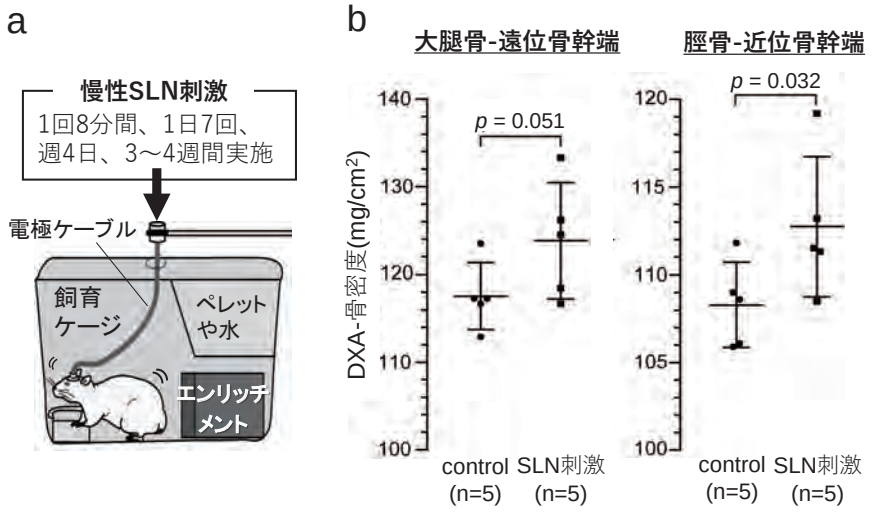

図２　卵巣摘出ラットへの慢性 SLN 刺激の方法と骨密度低下に対する効果
a：慢性 SLN 刺激はラットが生活している飼育ケージ内で実施した。電極ケーブルはラットがケージ内を行動するために十分な長さ（約 40㎝）であり、自由給餌および給水が可能であった。b：慢性 SLN 刺激後における大腿骨（遠位骨幹端）および脛骨（近位骨幹端）の骨密度を示す。SLN 刺激群の骨密度は control 群に比べて大腿骨では高い傾向があり、脛骨では有意に高かった．平均値±標準偏差、●および■は各例の値を示す。Unpaired t-teat（one-tailed)。文献 10 より一部改変して引用。

巣摘出により最も影響を受ける部位（大腿骨の遠位骨幹端部､脛骨の近位骨幹端部）を､SLN 刺激群とコントロール群とで比較したところ、刺激群ではコントロール群に比べて、いずれの部位でも 4-5％骨密度が高かった。これらのことから、意識下における３- ４週間の間歇的な SLN 刺激は、卵巣摘出による骨密度低下を部分的に抑制することが示唆された。

前述の SLN 刺激時に末梢血中カルシトニン濃度が増加した結果と本結果を合わせると、慢性的な SLN 刺激により、おそらくカルシトニン放出が促進したことで、卵巣摘出における骨密度低下を部分的に抑制したと予想された。一方で、カルシトニンとは別の骨密度の制御メカニズムが相互的に働いていた可能性もある。例えば、SLN の電気刺激は交感神経を介して反射的に麻酔動物の下肢の血管拡張を誘導することが報告されており [18, 19]、この反応は大腿骨や脛骨の骨密度の増加にも寄与しているかもしれない。

４．おわりに

これらの結果は、SLN 刺激によるカルシトニン分泌の促進が、骨粗鬆症に対する新たな治療法として発展する可能性を示した。しかしながら、SLN 刺激群の骨密度は卵巣摘出をしていないラットに比べると著しく低く（約 - 40㎎ /㎠）、３- ４週間の SLN 刺激による効果は卵巣摘出による骨密度低下を部分的に改善するに留まった。また､骨密度以外の組織学的指標（破骨細胞数など）には明確な差を見ることはできなかった。OVX ラットへの約２か月間のカルシトニン製剤の投与は、大腿骨の約 15％の骨密度増加 [20] や、破骨細胞数の有意な減少 [3] を起こすことが報告されている。神経性調節による内因性カルシトニン分泌増加は、従来の外因性カルシトニン治療とは異なる制御メカニズムを介して骨に対して機能することも考えられるが [21]、より長期間の SLN 刺激では骨密度低下に対し、より明確な効果が見られる可能性もある。本研究では、神経に埋め込んだ電極から刺激装置の間で断線するトラブルから、埋め込み手術をした約半数のラットで刺激を行えなくなってしまった｡今後は、無線による SLN 刺激などの長期間の検討に耐えうるデバイスへの変更も視野に入れ、より長い期間の SLN 電気刺激による骨密度への影響を追求していく必要がある。

引用文献

1. Seeman E, Delmas PD. Bone quality — The material and structural basis of bone strength and fragility. N Engl J Med 354(21): 2250-2261, 2006.
2. Kuroda H, Nakamura M, Kamiyama K. Effects of calcitonin and parathyroid hormone on the distribution of F-actin in the clear zone of osteoclasts in vivo. Bone 19(2): 115-120, 1996.
3. Hsiao CY, Chen TH, Chu TH, *et al*. Calcitonin induces bone formation by increasing expression of Wnt10b in osteoclasts in ovariectomy-induced osteoporotic rats. Front Endocrinol (Lausanne) 11: 613, 2020.
4. Orimo H, Hirotoshi M, Tetsuo I, *et al*. Effect of elcatonin on involutional osteoporosis. J Bone Miner Metab 14: 73-78, 1996.
5. Shibata K, Takeda M, Ito A, *et al*. Ovariectomy-induced hyperalgesia and antinociceptive effect of elcatonin, a synthetic eel calcitonin. Pharmacol Biochem Behav 60(2): 371-376, 1998.

6. Knopp JA. Diner BM, Blitz M, *et al*. Calcitonin for treating acute pain of osteoporotic vertebral compression fractures: a systematic review of randomized, controlled trials. Osteoporos Int 16(10): 1281-1290, 2005.
7. Ikegame M, Ejiri S, Ozawa H. Calcitonin-induced change in serum calcium levels and its relationship to osteoclast morphology and number of calcitonin receptors. Bone 35(1): 27-33, 2004.
8. Yamauchi H, Suzuki H, Orimo H. Calcitonin for the treatment of osteoporosis: dosage and dosing interval in Japan. J Bone Miner Metab 21: 198-204, 2003.
9. Hotta H, Onda A, Suzuki H, *et al*. Modulation of calcitonin, parathyroid hormone, and thyroid hormone secretion by electrical stimulation of sympathetic and parasympathetic nerves in anesthetized rats. Front Neurosci 11: 375, 2017.
10. Iimura K, Watanabe N, Milliken P, *et al*. Chronic electrical stimulation of the superior laryngeal nerve in the rat: A potential therapeutic approach for postmenopausal osteoporosis. Biomedicines 8(9): 369, 2020.
11. Andrew BL. A functional analysis of the myelinated fibres of the superior laryngeal nerve of the rat. J Physiol 133(2): 420-432, 1956.
12. Furusawa K, Yasuda K, Okuda D, *et al*. Central distribution and peripheral functional properties of afferent and efferent components of the superior laryngeal nerve: morphological and electrophysiological studies in the rat. J Comp Neurol 375(1): 147-156, 1996.
13. Miller AJ, Loizzi RF. Anatomical and functional differentiation of superior laryngeal nerve fibers affecting swallowing and respiration. Exp Neurol 42(2): 369-387, 1974.
14. Kitagawa J, Shingai T, Takahashi Y, *et al*. Pharyngeal branch of the glossopharyngeal nerve plays a major role in reflex swallowing from the pharynx. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 282(5): R1342-R1347, 2002.
15. Sun QJ, Bautista TG, Berkowitz RG, *et al*. The temporal relationship between non-respiratory burst activity of expiratory laryngeal motoneurons and phrenic apnoea during stimulation of the superior laryngeal nerve in rat. J Physiol 589(Pt 7): 1819-1830, 2011.
16. Nakamuta H, Sasaki M, Ichikawa M, *et al*. An acute and focal osteopenia model using ovariectomized rats: a rapid detection of the protective effect of salmon calcitonin. Biol Pharm Bull 16(3): 325-327, 1993.
17. Simmons DJ, Yang C, Gundberg CM, *et al*. Calcitonin: chronotherapeutic effect on osteopenia in the ovariectomized rat. Prog Clin Biol Res 341A: 517-527, 1990.
18. Faber JE, Brody MJ. Reflex hemodynamic response to superior laryngeal nerve stimulation in the rat. J Auton Nerv Syst 9(4): 607-622, 1983.
19. Possas OS, Lewis SJ. NO-containing factors mediate hindlimb vasodilation produced by superior laryngeal nerve stimulation. Am J Physiol 273(1 Pt 2): H234-H243, 1997.
20. Rico H, Valencia MJ, Villa LF, *et al*. Calcitonin versus clodronate in the prevention of ovariectomy-induced osteopenia in rats. Clin Rheumatol 19(1): 47-50, 2000.
21. Davey RA, Findlay DM. Calcitonin: Physiology or Fantasy? J Bone Miner Res 28(5): 973-979, 2013.

基礎老化研究 46（1）; 37－41, 2022

【奨励賞受賞者研究トピックス】

呼吸鎖超複合体形成による骨格筋のミトコンドリア機能調節とその制御因子

小林　天美[1, 2]

[1] ハーバード大学附属ブリガム・アンド・ウィメンズ病院脳神経内科

[2] 東京都健康長寿医療センター研究所システム加齢医学研究チーム

キーワード：mitochondria, respiratory chain supercomplex, FRET, skeletal muscle

１．はじめに

骨格筋は、筋タンパク質の合成と分解が繰り返し行われることによって維持されている組織であり、骨格筋量と筋力は老化と共に減少する[1]。骨格筋の老化メカニズムとして、性ホルモン濃度の減少、筋組織におけるアポトーシスの誘発などが加齢と共に生じることが要因となっている。その背景として、筋肉の質を維持するミトコンドリアの機能低下が指摘されており[2-9]、骨格筋量の低下に先行してミトコンドリア機能障害が生じることも報告されている[10]。また、骨格筋は収縮速度の観点から速筋及び遅筋に分類されるが、ミトコンドリアは遅筋に多く分布しており、ミトコンドリアタンパク質の変化に伴うミトコンドリア機能低下は姿勢維持及び歩行などの低強度運動を支える遅筋に大きな影響を与えると考えられている。

ミトコンドリアは、ほぼ全ての真核生物の細胞に存在する細胞内小器官で、酸化的リン酸化により生命活動に必要なエネルギーであるアデノシン三リン酸（Adenosine Triphosphate; ATP）産生を主に行っている。外膜と内膜という２枚の脂質膜を有しており、真核生物では内膜に酸化的リン酸化を担う呼吸鎖複合体が配列している。この呼吸鎖複合体は複合体 I, II, III, IV という４つの異なる複合体により構成され、ATP 合成酵素が働くためのプロトン（H^+）濃度勾配をつくり出している。呼吸鎖複合体のうち、複合体 I, III, IV は複合体同士が結合しさらに高次の超複合体を形成することが報告されている[2]。我々が過去に報告した研究では、呼吸鎖超複合体の形成が減少したマウスの胎児より樹立した胎仔線維芽細胞では ATP 産生が低下した[12]。また、同様の成体マウスにおいては、トレッドミルにおける運動持続時間が短縮した一方で、呼吸鎖超複合体の形成促進因子を遺伝子導入にて過剰発現させたマウスにおいては、トレッドミルにおける運動持続時間が延長していた[12]。このことより、呼吸鎖超複合体形成がエネルギー産生率を上昇させる働きを有し、筋持久力に関わることを示唆している。その他、加齢ラットの骨格筋においては、若齢ラットと比較して呼吸鎖超複合体の形成が減少することが報告されている[13]。ヒトの骨格筋においては、高齢になるにつれて OPA1（optic atrophy 1）というミトコンドリア内膜の構造維持とともに呼吸鎖超複合体形成にもかかわるタンパク質の発現の低下がみられた[4]。以上から、骨格筋の老化メカニズムにミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成変化が関与していることが示唆されている。

ミトコンドリア呼吸鎖超複合体に着目し、老化と関連する疾患のメカニズム解明・治療薬開発には、呼吸鎖超複合体の構造変化を生体内に近い状態で簡便に検出する手法が必要とされる。本稿では、我々が確立したライブセル内で呼吸鎖超複合体の形成を可視化・定量化する手法と、それを応用させた著者の最新の研究成果を紹介する。

２．ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の可視化

従来のミトコンドリア呼吸鎖超複合体の検出方法は、細胞・組織から単離したミトコンドリア分画を用いたタンパク質電気泳動法の一つである Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis（BN-PAGE）やクライオ電子顕微鏡法によるタンパク質構造解析が主に用いられている。これらの手法は呼吸鎖超複合体の抽出効率や存在状態が容易に変化することが知られており、高度な技術の習熟を要する他、特殊な電子顕微鏡を要することから汎用性に欠ける。そこで、呼吸鎖超複合体の検出法にあたって、我々は Förster 共鳴エネルギー移動（Förster Resonance Energy Transfer; FRET）の原理に着目した。FRET 現象は、２つの蛍光分子が近接して存在する時に、一方の蛍光タンパク質の蛍光スペクトルともう一方の蛍光タンパク質の励起スペクトルに重なりがあり、両蛍光タンパク質の相対的向きが適切な方向関係にあると、一つの蛍光分子（donor）からもう一つの蛍

連絡先：小林　天美
60 Fenwood Rd, Boston, Massachusetts, USA, 02115
TEL：617-732-5500
E-mail： mikirespect@gmail.com
akobayashi1@bwh.harvard.edu

光分子（acceptor）へエネルギーが移行する現象である。その結果、acceptor が励起され蛍光（FRET シグナル）を発生する。会合状態を調べたい２分子それぞれを、励起スペクトルと蛍光スペクトルの重なりがある donor、acceptor 用の蛍光タンパク質との融合タンパク質として細胞内に発現させ、両蛍光タンパク質の方向関係が適切な条件下で、両分子が近接した時のみ FRET シグナルが観察される[15]。本研究では、呼吸鎖複合体同士が会合し、超複合体形成時に近接する呼吸鎖複合体のサブユニットにそれぞれ別々の donor および acceptor として使用可能な蛍光タンパク質 AcGFP と DsRed monomer を融合させた（図１）。共焦点レーザー顕微鏡で観察を行い、まずヒト胚性腎臓細胞である HEK293 細胞において呼吸鎖複合体Ⅰのサブユニットを標識した AcGFP の励起波長により呼吸鎖複合体Ⅳのサブユニットを標識した DsRed monomer の蛍光が検出された。顕微鏡に付随する FRET 解析用ソフトウェアを使用して補正を行い、FRET 効率を擬似カラーとして示すことができ（未発表データ）、上記の呼吸鎖複合体同士の近接が FRET シグナルとして検出されている可能性が示唆された。ここで、検出された蛍光シグナルが FRET 現象を反映しているかを検証するために我々は Acceptor Photobleaching を行った。Acceptor Photobleaching とは、acceptor の蛍光タンパク質である DsRed monomer を退色させ、donor の蛍光タンパク質から acceptor の蛍光タンパク質へのエネルギー移動を打ち消すことをいう。画像内に９ヶ所の ROI（Region of interest）を設定し、蛍光強度を記録した後にこれらの ROI に対して DsRed monomer の励起波長において最大出力で照射することにより Photobleaching を行った。Photobleaching の前後で ROI における DsRed monomer の蛍光強度は著明に低下し、AcGFP の蛍光強度は有意に上昇した（未発表データ）。この結果から、上記の蛍光融合タンパク質間で FRET 現象が起きていたことが確認された。次に、これら２種の融合タンパク質を安定的に発現する C2C12 細胞（マウスの筋衛星細胞由来の筋芽細胞）株の樹立を行い、また陰性コントロールとして呼吸鎖複合体同士が会合しない呼吸鎖複合体 III のサブユニットと ATP 合成酵素のサブユニットの、蛍光融合タンパク質を共発現する細胞株も樹立した。固定細胞、生細胞のいずれの場合も、呼吸鎖複合体Ⅰのサブユニットと呼吸鎖複合体 IV のサブユニットの組み合わせで donor の励起時に acceptor の蛍光波長のシグナルが検出された（未発表データ）。一方で、呼吸鎖複合体Ⅲのサブユニットと ATP 合成酵素のサブユニットの組み合わせでは、donor の励起時に acceptor の蛍光波長のシグナルが検出されなかった（未発表データ）。このことより、呼吸鎖複合体Ⅰと呼吸鎖複合体 IV のサブユニットの蛍光標識により検出された FRET シグナルがミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成を反映していることが示唆された。

３．ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成変化の検出と定量化

我々の研究チーム並びに他の複数の研究室は、ミトコンドリアタンパク質の COX7RP（Cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide）/SCAF1/COX7A2L が、呼吸鎖超複合体形成を促進する assembly factor であり、そのＬ字型構造により複合体 III と複合体 IV および複合体Ⅰと複合体 IV の結合に寄与していることを見出した[12, 16-18]。これを踏まえ本研究では、siRNA を用いて COX7RP の発現を抑制し、その際の FRET シグナルが呼吸鎖超複合体形成の変化を反映しているか検証した。まず、siRNA を用いて *Cox7rp* の発現を抑制した C2C12 細胞より抽出したミトコンドリア分画を用いて BN-PAGE による呼吸鎖超複合体形成の比較を行った。Control と比較して si*Cox7rp* 処理

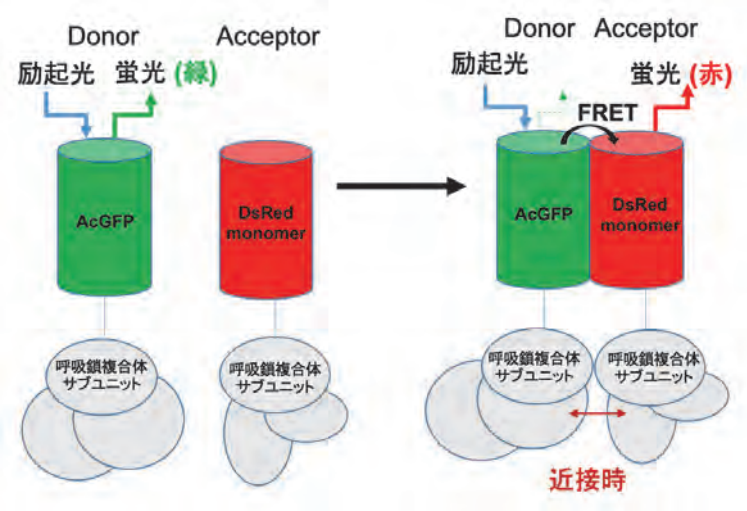

図１． Förster 共鳴エネルギー移動（Förster Resonance Energy Transfer; FRET）のメカニズム
本研究で利用した、FRET のメカニズムを示す。Donor と acceptor となる蛍光タンパク質同士が近接したときに FRET 現象が起き、donor を励起させると acceptor の蛍光が見られる。本研究では、AcGFP と DsRedmonomer の２種類の蛍光標識を異なる呼吸鎖複合体サブユニットに融合したタンパク質をそれぞれ donor、acceptor として使用した。

時では呼吸鎖超複合体の形成が低下した（未発表データ）。次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、呼吸鎖複合体Ⅰのサブユニットと AcGFP、呼吸鎖複合体Ⅳのサブユニットと DsRed monomer の蛍光融合タンパク質を安定的に発現する C2C12 細胞内における COX7RP 発現抑制時の FRET シグナルを定性的に評価したところ、si*Cox7rp* 処理時では Control と比較して FRET 効率が減少した（未発表データ）。さらに、同様の安定発現細胞を用いて、si*Cox7rp* 処理後 48 時間経過してからこの細胞を IN Cell Analyzer 6000（GE Healthcare, Chicago, USA）で撮像し、補正した corrected FRET（cFRET）の値を求めた。Control と比較して si*Cox7rp* 処理時では Donor 1 分子あたりの FRET 効率を表す cFRET/Donor ratio は有意に減少した（図２）。なお、同時に測定した Donor である AcGFP の蛍光シグナル値と Acceptor である DsRed monomer の蛍光シグナル値は siControl と si*Cox7rp* 処理時では差は認められなかった。これらの結果より、COX7RP の発現抑制に伴う呼吸鎖超複合体の形成変化を FRET シグナルが反映することが強く示唆され、超複合体形成を FRET シグナルとして定量化することを可能にした。

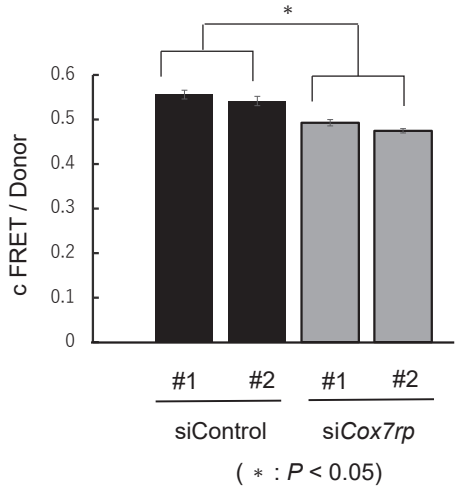

図２．呼吸鎖超複合体形成阻害時の FRET シグナル値

呼吸鎖複合体Ⅰ-AcGFP および呼吸鎖複合体Ⅳ-DsRed monomer を共に安定発現する C2C12 細胞を２種類（#1 と #2）の si*Cox7rp* および２種類（#1 と #2）の si*Control*（10 nM）にて処理し、生細胞の蛍光を IN Cell Analyzer 6000 を用いて測定した（N = 12）。補正値 cFRET/Donor の比を示す。Error Bars: 平均値 ± 標準誤差。* P < 0.05（Two-way ANOVA）。

４．Beta-lapachone のミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成促進作用

FRET シグナルによるミトコンドリア呼吸鎖超複合体の可視化・定量化をきっかけとして、我々はこの手法を応用したハイスループットスクリーニングを 1200 以上の種類の薬理活性化合物ライブラリーを用いて行った。その結果、ノウゼンカズラ科植物パウダルコの木（*Tabebuia avellanedea*）の樹皮から抽出された化合物である Beta-lapachone を添加した条件下での C2C12 の生細胞において呼吸鎖複合体Ⅰ とⅣのサブユニット蛍光融合タンパク質間の FRET 効率を表す cFRET/Donor ratio が有意に上昇していた（図３）。共焦点レーザー顕微鏡を用いた FRET シグナルの定性評価でも同様の結果が得られ、Beta-lapachone を添加した C2C12 細胞より抽出したミトコンドリア分画を用いて行った BN-PAGE では呼吸鎖超複合体の形成促進が確認された（未発表データ）。また、XFp Extracellular Flux Analyzer を用いて C2C12 細胞に Beta-lapachone を添加した際の酸素消費量を計測したところ、溶媒の DMSO のみの添加条件下のコントロールと比較して Beta-lapachone 1 μM 添加下の細胞のミトコンドリアでは、基礎呼吸および最大呼吸において有意な上昇を認め、ATP 産生量も増加傾向を示した（未発表データ）。Beta-lapachone については、過去の論文で加齢マウスの骨格筋におけるミトコンドリアの構造異常、ミトコンドリアの数の減少を緩和し、ミトコンドリアタンパク質の発現量を増加させ、マウスの筋力・運動耐用能の上昇とエネルギー代謝量を増加させる化合物として報告されているが[19]、呼吸鎖超複合体に直接影響を与えるという報告はない。本研究において、新規に Beta-lapachone のミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成促進作用を明らかにし、筋肉細胞におけるミトコンドリアの機能を亢進させることを示した。

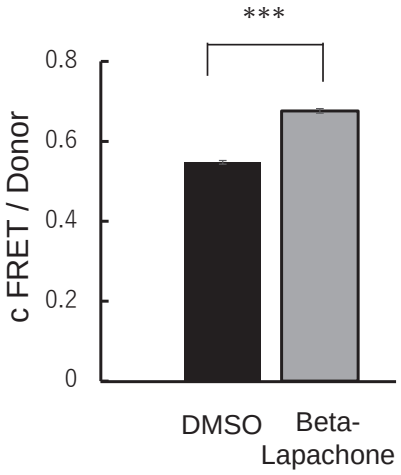

図３．Beta-lapachone 添加時の FRET シグナル値

呼吸鎖複合体Ⅰ-AcGFP および呼吸鎖複合体Ⅳ-DsRed monomer を共に安定発現する C2C12 細胞を Beta-lapachone（1 μM）もしくは溶媒（DMSO）にて処理し、生細胞の蛍光を IN Cell Analyzer 6000 を用いて測定した（N = 12）。Beta-lapachone もしくは溶媒（DMSO）を添加し、24 時間後に観察した。補正値 cFRET/Donor を示す。Error Bars: 平均値 ± 標準誤差。*** P < 0.001（t-test）

５．おわりに

ミトコンドリア呼吸鎖超複合体を FRET の原理を利用して可視化・定量化する手法を確立した。簡便に効率

よく、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体をライブセル内で測定することが可能であり、汎用性が高いと考える。本研究では、筋管化させたC2C12細胞では呼吸鎖超複合体の評価を行なっていないが、今後は速筋型と遅筋型へ分化させた場合の呼吸鎖超複合体形成の違いについても本手法を利用して検証することが期待される。若齢と老齢マウスでの速筋と遅筋における各呼吸鎖複合体の呼吸能、呼吸効率や発現量を比較する報告[20, 21]や、ヒトの若齢者と高齢者から採取したType Ⅰ繊維（遅筋繊維）とType Ⅱa繊維（速筋繊維）における各呼吸鎖複合体とOPA1の発現量の違い[22]からは、呼吸鎖超複合体形成も筋繊維のタイプによって異なることが予想される。特に骨格筋の老化メカニズムの解明という観点ではこれらの筋繊維の違いが重要となるであろう。

また、本手法を利用したアッセイ系を構築し、新規に特定の化合物のミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成促進作用を明らかにした。今後は、本手法を呼吸鎖超複合体形成ならびにミトコンドリア機能を促進させる各種因子・刺激の特定に活用し、加齢性変化を伴う細胞・組織の機能を向上させるメカニズムの基礎研究から加齢性疾患応用研究まで幅広く適用されることが期待される。

6．謝辞

本研究は、東京都健康長寿医療センター研究所システム加齢医学研究チーム研究部長の井上聡先生、同研究員の竹岩俊彦先生、東京大学医学部附属病院老年病科の東浩太郎先生、埼玉医科大学医学部ゲノム応用医学の池田和博先生のご指導のもと行われました。東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座の先生方にも多大な御助言をいただきました。実験材料の提供・先行実験において多大なるご尽力を賜わりました、東京都健康長寿医療センター研究所生体調節機能研究副部長の大澤郁朗先生、理化学研究所生命医科学研究センターの北見俊守先生に深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Burr, D. B. Muscle strength, bone mass, and age-related bone loss. *J. Bone Miner. Res*. **12**, 1547–1551 (1997).
2. Calvani, R. *et al*. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol. Chem*. **394**, 393–414 (2013).
3. Rygiel, K. A., Picard, M. & Turnbull, D. M. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *J. Physiol*. **594**, 4499–4512 (2016).
4. Alway, S. E., Mohamed, J. S. & Myers, M. J. Mitochondria initiate and regulate sarcopenia. *Exerc. Sport Sci. Rev*. **45**, 58–69 (2017).
5. Bua, E. A., McKiernan, S. H., Wanagat, J., McKenzie, D. & Aiken, J. M. Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia. *J. Appl. Physiol*. **92**, 2617–2624 (2002).
6. Short, K. R. *et al*. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **102**, 5618–5623 (2005).
7. Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Inoue, S. Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. **191**, 105375 (2019).
8. Azuma, K., Ikeda, K., Inoue, S. Functional Mechanisms of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplex Assembly Factors and Their Involvement in Muscle Quality. *Int. J. Mol. Sci*. **21**, 3182 (2020).
9. Kobayashi, A., Azuma, K., Ikeda, K., Inoue, S. Mechanisms Underlying the Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes by Nuclear Steroid Receptors. *Int J Mol Sci*. **21**, 6683 (2020).
10. Kadoguchi, T. *et al*. Angiotensin II can directly induce mitochondrial dysfunction, decrease oxidative fibre number and induce atrophy in mouse hindlimb skeletal muscle. *Exp. Physiol*. **100**, 312–322 (2015).
11. Schägger, H. & Pfeiffer, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*. **19**, 1777–1783 (2000).
12. Ikeda, K., Shiba, S., Horie-Inoue, K., Shimokata, K. & Inoue, S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat. Commun*. **4**, 1–9 (2013).
13. Lombardi, A. *et al*. Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach. *J. Proteomics* **72**, 708–721 (2009).
14. Tezze, C. *et al*. Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell Metab*. **25**, 1374–1389 (2017).
15. Mitra, R. D., Silva, C. M. & Youvan, D. C. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* **173**, 13–17 (1996).
16. Letts, J. A., Fiedorczuk, K. & Sazanov, L. A. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* **537**, 644–648 (2016).
17. Williams, E. G. *et al*. Systems proteomics of liver mitochondria function. *Science* **352**, aad0189 (2016).

18. Milenkovic, D., Blaza, J. N., Larsson, N. G. & Hirst, J. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. *Cell Metab*. **25**, 765–776 (2017).
19. Lee, J. S. *et al*. Beta-Lapachone, a modulator of NAD metabolism, prevents health declines in aged mice. *PLoS One* **7**, e47122 (2012).
20. Kruse, S. E. *et al*. Age modifies respiratory complex I and protein homeostasis in a muscle type-specific manner. *Aging Cell* **15**, (2016).
21. Fukunaga, T. *et al*. Muscle fiber type specific alterations of mitochondrial respiratory function and morphology in aged female mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **540**, 116–122 (2021).
22. Murgia, M. *et al*. Single Muscle Fiber Proteomics Reveals Fiber-Type-Specific Features of Human Muscle Aging. *Cell Rep*. **19**, (2017).