

【奨励賞受賞者研究トピックス】

ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の生細胞イメージングと 筋肉抗老化・筋疾患治療への応用

竹岩 俊彦、井上 聡

東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム システム加齢医学

1. はじめに

超高齢化社会を迎えた本邦では、加齢や疾患に伴う筋肉量や筋力の低下を示すサルコペニアなどをはじめとして健康障害が増加しており、社会問題となっている。サルコペニアは、フレイルや要介護に至る重要な要因の一つと考えられており、その予防・治療法の開発は社会的急務であるが、その病態メカニズムはいまだ十分に解明されていない。

ミトコンドリアは好気呼吸によるエネルギー産生に重要な役割を担う細胞小器官であり、筋肉の有酸素運動・恒常性維持に関わることが報告されている^[1-3]。ミトコンドリアの内膜に存在しエネルギー産生に関わる呼吸鎖複合体は、より高次の呼吸鎖超複合体を形成することが知られているが^[4]、我々を含む最近の研究から、超複合体はエネルギー産生の亢進や筋肉の運動持久力の向上に重要な役割を担うことが明らかとなってきた^[5-8]。一方で、超複合体を生細胞で精密に観察・測定する手法がなく、その形成制御のメカニズムは十分に解明されていなかった。

我々は世界で初めて超複合体の生細胞イメージング・定量評価法を開発し、その筋肉抗老化やサルコペニア等の筋疾患の治療・予防への応用を目指し研究を進めている。本稿では、超複合体の生細胞イメージングと筋肉抗老化・筋疾患治療への応用に関する我々の最新の研究成果について紹介する。

2. ミトコンドリア呼吸鎖超複合体

真核細胞において、ミトコンドリアは酸化リン酸化と呼ばれる反応により ATP を産生する。酸化リン酸化反応には、ミトコンドリアの内膜に存在する呼吸鎖複合体 (I-IV) 及び ATP 合成酵素が関与する (図 1)^[4,9]。呼吸鎖複合体は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) または還元型フラビンアデニンジヌ

クレオチド (FADH₂) から酸素分子への電子伝達を担い、その過程で生じたプロトンの濃度勾配を利用して ATP 合成酵素が ATP を産生する。生化学的な解析及びクライオ電子顕微鏡を用いた解析から、呼吸鎖複合体 I、III、及び IV は会合し、呼吸鎖超複合体を形成することが報告されている^[4]。I/III₂、III₂/IV、及び I/III₂/IV といった組成の超複合体が知られており、I/III₂/IV の超複合体は特にレスピラソームと呼ばれている。

我々は性ホルモンであるエストロゲンの作用に関する研究から独自に同定したエストロゲンの標的のひとつである cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide (COX7RP) が超複合体の形成制御因子そのものであることを世界に先駆けて解明した。さらに、超複合体の形成促進によりエネルギー産生が亢進し、マウスでは筋肉の運動持久力が高まりマラソンランナー型になることを明らかにした^[5,6]。超複合体は筋肉の能力を向上させるキープレイヤーであり、筋肉の抗老化やサルコペニア等の筋疾患の予防・治療への応用が期待される。しかし、生細胞で超複合体を精密に測定する技術がなかったことから、超複合体の実態を観察することには困難が伴い、その形成制御のメカニズムについての研究は立ち遅れていた。そこで、我々は超複合体の生細胞イメージング及び定量評価法を開発を進めることとした。

3. ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の可視・定量手法の開発とハイスループットスクリーニングへの応用

超複合体を生細胞においてイメージング・定量評価するため、我々は蛍光タンパク質の間で起こる Förster 共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer: FRET)^[10] という現象を利用した (図 2)。まず、複合体 I と IV のサブユニットである NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B8 (NDUF8) と cytochrome c oxidase subunit 8A (COX8A) に蛍光タンパク質である AcGFP 及び DsRed-Monomer を融合し、マウス C2C12 筋芽細胞様細胞に安定発現させた。超複合体 (レスピラソーム) において蛍光標識した複合体が近接すると、AcGFP に対する励起光を照射した時に DsRed-Monomer が蛍光を発するという FRET 現象が起きる。この現象を共焦点蛍光顕微鏡や、イメージングサイト

連絡先: 竹岩 俊彦

〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2

TEL: 03-3964-3241 FAX: 03-3579-4776

E-mail: ttakeiwa@tmig.or.jp

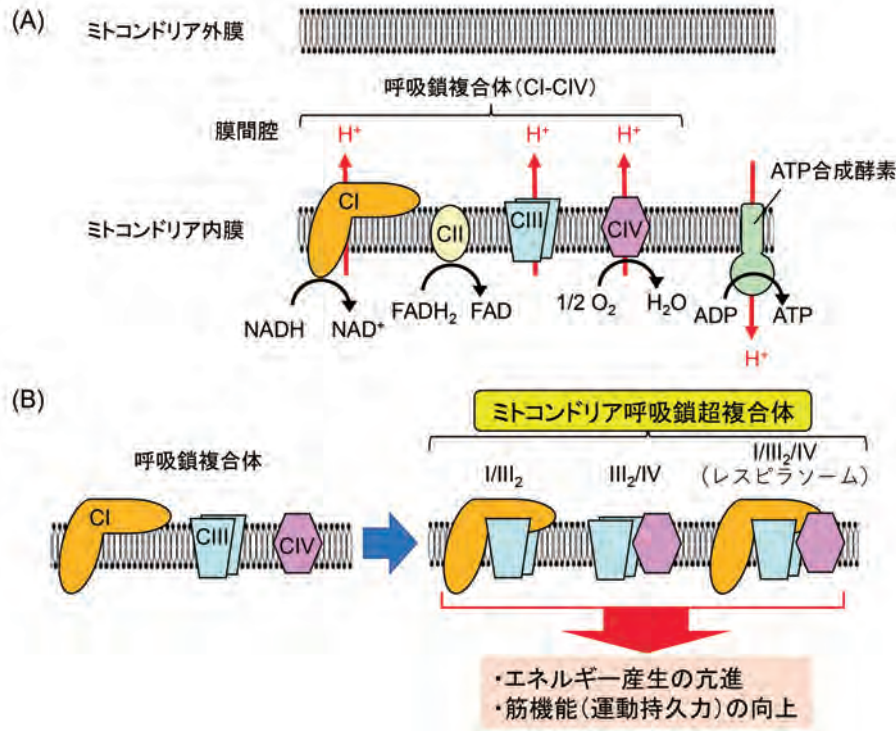


図1 ミトコンドリア呼吸鎖複合体および超複合体

(A)ミトコンドリア呼吸鎖複合体及びATP合成酵素によるATP産生。CI:複合体I、CII:複合体II、CIII:複合体III、CIV:複合体IV、NADH:還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、NAD⁺:酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、FADH₂:還元型フラビンアデニンジヌクレオチド、FAD⁺:酸化型フラビンアデニンジヌクレオチド[論文4より改変引用]。(B)複合体I、III、及びIVは、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体を形成することにより、エネルギー産生の亢進や運動持久力の向上に寄与する^[5, 6]。

メーターを用いて観察することにより、我々は世界に先駆けて、超複合体(レスピラソーム)形成の生細胞イメージングに成功した。また、FRETの効率を算出することにより超複合体の定量評価にも成功した。

次に、我々は本手法を活用し、超複合体の形成を促進する新しい化合物のスクリーニングを行った。1,000種類を超える化合物を対象としてハイスループットスクリーニングを行った結果、超複合体の形成を促進する複数の新たな候補化合物を同定した。候補化合物の中でも、

spleen tyrosine kinase (SYK) の阻害剤として作用する 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene (MNS) が超複合体の形成を最も促進したため、さらに2種類のSYK阻害剤(BAY61-3606及びGSK143)について解析したところ、双方とも超複合体の形成を促進することが確認された。これら3種類のSYK阻害剤による超複合体の形成促進は非変性電気泳動法であるblue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE)を利用した解析でも確認された。また、フラックス解析を行い、これらの

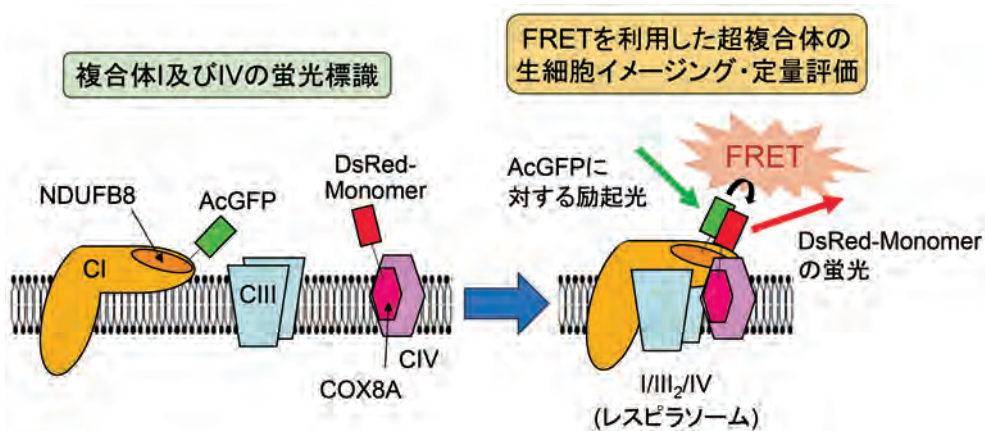


図2 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の生細胞イメージング及び定量評価法の開発

蛍光蛋白質で標識した呼吸鎖複合体I及びIVが、超複合体中で近接する際に起こるFRET現象を測定することにより、超複合体(レスピラソーム)の生細胞イメージングと定量評価に成功した。CI:複合体I、CIII:複合体III、CIV:複合体IV、NDUFB8:NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B8、COX8A:cytochrome c oxidase subunit 8A、FRET:Förster resonance energy transfer [論文7より改変引用]。

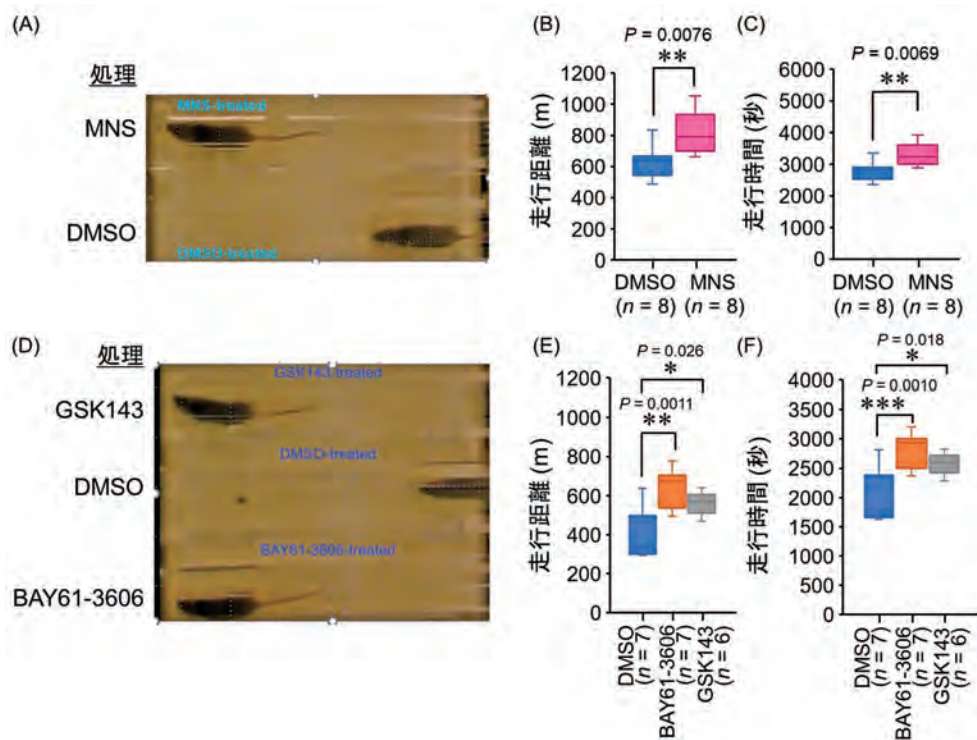


図3 Spleen tyrosine kinase (SYK) 阻害剤の処理によりマウスの運動持久力は向上した

8週齢の雌のDBA/2マウスに3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene (MNS) (4mg/kg) または dimethyl sulfoxide (DMSO) を腹腔内投与し、トレッドミル試験 (A) を行ったところ、MNS 投与マウスは、DMSO 投与マウスと比較して、有意に長時間・長距離走り続けることが示された (B, C)。また、BAY61-3606 (2mg/kg) 及び GSK143 (2mg/kg) を腹腔内投与したマウスでもトレッドミル試験 (D) を行った結果、DMSO 投与マウスと比較して有意に長時間・長距離走り続けることが示された (E, F) [論文7より改変引用]。

SYK 阻害剤を処理した C2C12 細胞でミトコンドリア呼吸が亢進することを示した。さらに、siRNA を用いた SYK の発現抑制実験でも、SYK の減少により超複合体の形成促進及びミトコンドリア呼吸の亢進が誘導された。これらの結果は、SYK の適度な抑制は超複合体の形成を促進し、ミトコンドリア代謝を活性化することを示唆している^[7]。

4. SYK 阻害剤の処理によりマウスの運動持久力は向上する

次に、SYK 阻害剤が運動能に及ぼす効果を検証するため、3種類のSYK阻害剤を腹腔内投与したDBA/2マウスの運動能をトレッドミル試験及びワイヤーハンク試験で評価した。その結果、3種類のSYK阻害剤を投与したマウスはいずれもトレッドミル試験において走行距離・時間が有意に延長し(マラソンランナー型となる)(図3)、ワイヤーハンク試験の成績も有意に向上したことから、運動持久力が向上したことが示された。また、BN-PAGE等を用いた生化学的な解析により、SYK阻害剤を投与したマウスの大腿四頭筋で超複合体の形成が促進されることが示された。一方で、マウスの体重や骨格筋の重量に影響は見られなかった。これらの結果より、SYK阻害剤は筋肉のミトコンドリアにおいて超複合体の形成を促進し、筋肉の量でなく質を高めることにより、運動持久力を向上させることが示唆された^[7]。

5. おわりに

本稿では、我々が開発した超複合体の生細胞イメージング・定量評価法と、それに基づくケミカルスクリーニングから見出した超複合体の形成を促進し筋肉の運動持久力を向上させる新規の化合物について紹介した。本成果は筋肉の抗老化やサルコペニア等の筋肉疾患の予防・治療への応用が期待される。最近になり、COX7RPがマウスに加えて^[5, 11]、ヒトの高齢者の運動・心肺機能と関連することが報告され^[11]、ミトコンドリア超複合体と老化・加齢性疾患の関連が注目されている。今後は、超複合体の生細胞イメージング・定量評価法を活用し、超複合体の実態や役割を解明することにより、老化や加齢性疾患の分子基盤を詳細に理解し、治療・予防法の開発等へ応用につなげることを目指して研究を進めていきたい。

引用文献

1. Coen PM, Musci RV, Hinkley JM, et al. Mitochondria as a Target for Mitigating Sarcopenia. *Front. Physiol.* 9:1883, 2019.
2. Joseph AM, Adhihetty PJ, Buford TW, et al. The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals. *Aging Cell* 1:801-809, 2012.
3. Gousspillou G, Sgarioto N, Kapchinsky S, et al.

- Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans. *FASEB J.* 28 : 1621–33, 2014.
4. 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.
 5. Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K. et al. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat. Commun.* 4 : 2147, 2013.
 6. Ikeda K, Horie-Inoue K, Suzuki T, et al. Mitochondrial supercomplex assembly promotes breast and endometrial tumorigenesis by metabolic alterations and enhanced hypoxia tolerance. *Nat. Commun.* 10 : 4108, 2019.
 7. Kobayashi A, Azuma K, Takeiwa T, et al. A FRET-based respirasome assembly screen identifies spleen tyrosine kinase as a target to improve muscle mitochondrial respiration and exercise performance in mice. *Nat. Commun.* 14 : 312, 2023.
 8. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340 : 1567–1570, 2013.
 9. Kobayashi A, Takeiwa T, Ikeda K, et al. Roles of Noncoding RNAs in Regulation of Mitochondrial Electron Transport Chain and Oxidative Phosphorylation. *Int. J. Mol. Sci.* 24 : 9414, 2023.
 10. Zadran S, Standley S, Wong K, et al. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors : visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 : 895–902, 2012.
 11. Benegiamo G, Bou Sleiman M, Wohlwend M, et al. COX7A2L genetic variants determine cardiorespiratory fitness in mice and human. *Nat. Metab.* 4 : 1336–1351, 2022.