

[原著]

IMMT の欠乏が細胞内代謝に与える影響

加藤 佑成 西 窪 開
松 成 謙 介 矢 野 正 人

Influence of IMMT-depletion on intracellular metabolism

Yusei KATOH, Kai NISHIKUBO, Kensuke MATSUNARI, Masato YANO
(All authors equally contributed to this work.)

和文抄録（要旨）

近年、ミトコンドリアの内膜と外膜との接触部分を形成することでミトコンドリアの構造を維持する機能をもつ MICOS 複合体が同定された。MICOS 複合体には、コア成分タンパク質である IMMT が含まれており、IMMT の欠損によりミトコンドリアの構造に異常が生じることが報告されている。しかし、このとき、細胞内の代謝に与える影響については解析されていない。本研究では、最初に、IMMT の発現量を約30%に低下させても、細胞はアポトーシスを起こさないことを確認した。その上で、IMMT の発現量低下が細胞内の代謝に与える影響を探るため、ミトコンドリア内外の物質代謝に関わる酵素や輸送体について mRNA 発現量の解析を行った。その結果、IMMT の発現量を低下させると、ピルビン酸輸送体である MPC1、カルニチンにアシル CoA のアシル基を転移する酵素である CPT1A、ペルオキシソームでの β 酸化反応に関わる ACOX1、細胞質の脂肪酸結合タンパク質である FABP1 等の mRNA 発現量が有意に低下することがわかった。これらの結果から、IMMT の発現量低下は、ミトコンドリアにおけるピルビン酸や脂肪酸の代謝、細胞質における脂肪酸の輸送と貯蔵、ペルオキシソームにおける脂肪酸の代謝に影響を与えると考えられた。

キーワード：ミトコンドリア, IMMT, 代謝

I はじめに

ミトコンドリアは細胞内において酸化的リン酸化による ATP 合成を行う重要な役割を持った器官である。ミトコンドリアは外膜と内膜により区画されており、外膜と内膜の間は膜管腔、内膜の内側はマトリックスと呼ばれる。解糖系で生じたピルビン酸や、脂肪酸代謝系で生じたアシル CoA は、ミトコンドリア外膜を通過し、さらにミトコンドリア内膜の輸送体を介してミトコンドリア内に取り込まれる。

その後、ピルビン酸は、アセチル CoA を経てクエン酸回路に入り還元型の NADH や FADH₂ を産生する。また、アシル CoA は、 β 酸化により、NADH や FADH₂ を産生しつつ、複数のアセチル CoA を産生し、アセチル CoA はクエン酸回路に入って、同様に、NADH や FADH₂ を産生する。これらの過程で生じた NADH や FADH₂ は、ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系に電子を与える。電子伝達系に渡された電子が伝達されてゆく過程において、電位差エネルギー変化を利用して、水素イ

オンがマトリックス側から膜間腔側に排出される。排出された水素イオンは、水素イオン濃度勾配を解消するためにミトコンドリア内膜にある ATP 合成酵素を介してマトリックス内に戻る。その水素イオン流入により生じる力を利用して、ADP とリン酸から ATP が合成される。なお、ミトコンドリアの内膜は、外膜とは異なりクリステと呼ばれるヒダ状の構造をもつ。クリステ構造があることで、ミトコンドリア内膜は面積が広がっており、電子伝達系や ATP 合成酵素が多数存在できるようになっている。

近年、ミトコンドリアの構造形成に関わる複合体として MICOS 複合体が注目されている。MICOS 複合体はミトコンドリアのクリステ構造を維持する役割をもち、さらには、ミトコンドリア外膜と内膜との結合部位であるコンタクトサイトを形成する役割をもつ¹⁾。このように、MICOS 複合体はミトコンドリアの構造の維持において中心的役割を担っている。実際、MICOS 複合体のコア成分タンパク質の1つである IMMT (Mitofilin, Mic60) を欠失させるとミトコンドリアの構造に異常が生じることから、IMMT はミトコンドリアの構造を維持するのに不可欠であると考えられている^{2,3)}。しかし、このとき、ミトコンドリアを含めた細胞内の代謝がどのように変化するのかについては、未だ十分に明らかにされていない。

本研究においては、初めに、siRNA を用いて IMMT をノックダウンすることで、IMMT タンパク質の発現量がどの程度低下するか調べた。その結果、IMMT タンパク質の発現量は約30%に低下することがわかった。次に、その場合に想定される細胞への影響を調べた。その結果、IMMT ノックダウン細胞では、予想どおりミトコンドリアの形態に異常が生じていることがわかった。しかし、IMMT ノックダウン細胞はアポトーシスを起こさずに生きることがわかった。また、活性酸素種 (ROS) の産生が有意に増加していることもわかった。これらの観察結果を前提に、IMMT のノックダウンが細胞内の代謝に与える影響を探るため、ミトコンドリア内外の物質代謝に関わる酵素や輸送体などについて、リアルタイム PCR 法を用いて mRNA 発現量の解析を行った。

II 方法

1. 細胞の培養と siRNA を用いた IMMT のノックダウン

HepG2細胞の培養は、10%のFatal bovine serum (FBS) を添加した DMEM 培地中、37°C、5% CO₂ 条件下で行った。HepG2 細胞中の IMMT のノックダウンには、IMMT siRNA duplex (5'-GGAUUAAAACACAUUUAAAAdTdT-3' および 5'-UUUAAAUGUGUUUUAUAUCCdTdT-3') を用いた。コントロール用には、universal negative control siRNA duplex (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUD TdT-3' および 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA dTdT-3') を用いた。細胞内への siRNA 導入には、Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen 社) を用いた。IMMT ノックダウン細胞の解析は、ノックダウンを開始してから72時間後に行った。

2. 細胞からのタンパク質の回収およびウエスタンブロット法による解析

培養用ディッシュからの HepG2 細胞の剥離は、1mM EDTA を含む PBS を用いて行った。回収された細胞を PBS で 2 回洗浄した後、1% Triton X-100 を含む PBS 溶液で細胞を溶解した。その後、15000xg で遠心して上澄み液をタンパク質抽出液として回収した。ウエスタンブロット用サンプルの調製に際しては、タンパク質抽出液を (x2) SDS-PAGE 用サンプル溶液と等量混合し、95°C で 5 分間処理した。SDS-PAGE 法でタンパク質の分離を行った後、PVDF メンブレンにタンパク質を転写した。そのメンブレンを 5% スキムミルク溶液でブロッキングした後、1 次抗体および 2 次抗体 (Horse radish peroxidase が架橋されたもの) で処理した。抗体による目的タンパク質の検出には、ECL キット (GE Healthcare 社) および化学発光撮影装置である AE-9300 Ez-Capture MG (ATTO 社) を用いた。検出されたタンパク質の定量は、ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

3. 細胞のミトコンドリアの染色

IMMT ノックダウン細胞内のミトコンドリアの染色には、Mito Tracker Red (ThermoFisher 社) を用いた。具体的には、カバーガラス上で培養した

HepG2 細胞において IMMT のノックダウンを行い、72時間後に Mito Tracker Red 入りの培地に交換し30分間インキュベートした。その後、HBSS でカバーガラス上の HepG2 細胞を洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。固定した細胞を PBS で洗浄した後、Fluorescent mounting medium (DAKO 社) を封入剤として用い、スライドグラスに乗せて、蛍光顕微鏡下で赤色の蛍光を観察した。

4. アポトーシスの検出および ROS の検出

IMMT ノックダウン細胞がアポトーシスを起こしているか否かの判定には、蛍光試薬である JC-1 を用いた。具体的には、細胞培養用プレートのウェル内で培養した HepG2 細胞から培養液を取り除き、代わりに JC-1 入りの培地を加えて30分間培養を継続した。その後、細胞を HBSS で2回洗浄してから、蛍光プレートリーダー Infiniti F200 Pro (TECAN 社) を用いて、緑色の蛍光 (アポトーシスを起こした細胞の蛍光) と赤色の蛍光 (生細胞の蛍光) の強度を測定した。

細胞内の ROS の定量には、CM-H₂DCFDA を用いた。具体的には、細胞培養用プレートのウェル内で培養した HepG2 細胞から培養液を取り除き、代わりに CM-H₂DCFDA 入りの HBSS を加え、37°C、5% CO₂ 条件下で30分間インキュベートした。その後、細胞を HBSS で2回洗浄してから、蛍光プレートリーダーを用いて、緑色の蛍光 (CM-H₂DCFDA と ROS が反応することで生じる蛍光) の強度を測定した。

5. 細胞からの Total RNA の回収, cDNA の合成, および定量的リアルタイム PCR (qPCR)

HepG2 細胞からの Total RNA の回収には、TRIzol reagent (Invitrogen 社) を用いた。

回収された Total RNA を template とし、PrimeScript RT-PCR kit (TaKaRa 社) を用いて、逆転写酵素による cDNA の合成を行った。定量的リアルタイム PCR (qPCR) は、cDNA を template とし、LightCycler Nano (Roche 社) および FastStart Essential DNA GreenMaster (Roche 社) を用いて行った。本研究で用いた qPCR 用の各種ヒト用のプライマー DNA セット (Forward プライマーと Reverse プライマー) を表 1 に示す。内

表 1 本研究で用いた定量的 PCR 用プライマー

遺伝子	Forward プライマー (5'→3')	Reverse プライマー (5'→3')
GAPDH	TGACAACAGCCTCAAGAT	GAGTCTTCCAGGATACC
IMMT	GTCTCTCCGTCCATTCGCGAC	GGACCAAGAACCATCTCGAAG
MPC1	AAATGAAGTGACACCCAATAACAGG	CATCCGCCACTGATAATCTCT
CPT1A	TCCAGTTGGCTTATCGTGGTG	TCCAGAGTCCGATTGATTTTTCG
ACAA2	AAGTCTCACCTGAAACAGTTGAC	CACGCAAACCAACATGCCT
ACO1	ACTCGCAGCCAGCGTTATG	AGGGTCAGCGATGCCAAC
CD36	TGCCAGTTGGAGACCTGCTTATC	AACTGAATGTTGCTGCTGTTTCATC
SLC27A1	ACCGAGTGCACACTGCAGCAT	CGGCTGTTGAAACACAGGA
SLC27A4	ACTGGCAACTGTGACCTGGAG	CTTTCACAATAGCCGGGTCAA
FABP1	CAGTGGTTCAGTTGGAAGGTGA	TCTTGAAGACAATGTCAACCAATGT

部コントロールとして GAPDH のデータを使用した。

6. 統計分析

取得されたデータについては、t 検定による解析を行い、平均±標準偏差 (SD) を図中に示した。p 値が0.05未満の場合のみ、有意差があるとみなし、図中にその数値を示した。

III 結果

最初に、IMMT ノックダウン細胞における IMMT の mRNA 発現量を qPCR 法で解析した (図 1A)。その結果、IMMT ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べ、IMMT の mRNA 発現量

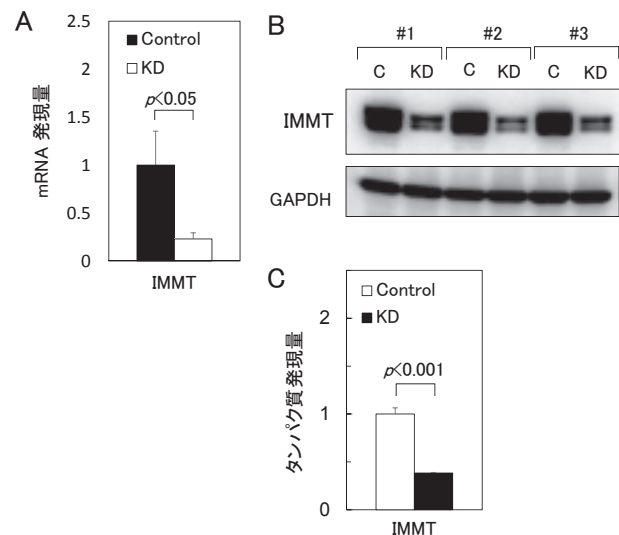


図 1) A: コントロール (Control) および IMMT ノックダウン (KD) 細胞における IMMT の遺伝子発現量。Control 細胞における mRNA 発現量を 1 とした場合の KD 細胞における相対発現量を示した。n=4。B: ウェスタンブロット法による IMMT および GAPDH タンパク質の発現量解析。C: IMMT 発現量の解析。Control 細胞における IMMT タンパク質の発現量を 1 とした場合の KD 細胞における相対発現量を示した。n=3。

が有意に低下していた。さらに、ウエスタンブロット法により IMMT タンパク質の発現量を確認した (図1B および1C)。その結果, mRNA 発現量と同様に, IMMT のタンパク質発現量も有意に低下していた (コントロールの約30%に低下していた)。これらのことから, IMMT のノックダウンは効率よく行われていることが確認された。

次に, IMMT のノックダウンによりミトコンドリアの構造に異常が生じていることを確認するために, 細胞をミトコンドリアの蛍光標識試薬である Mito Tracker Red で染色し, 蛍光顕微鏡下でミトコンドリアの形態を観察した (図2)。その結果, コントロール細胞 (図2a) では糸状の正常な形態のミトコンドリアが観察されたのに対し, IMMT ノックダウン細胞 (図2b および2c) では一部が顆粒状となったミトコンドリア (図2b) や全てが顆粒状となったミトコンドリア (図2c) が観察された。この結果は, 先行研究論文で示された結果とほぼ一致していた^{2,3)}。このことから, IMMT がミトコンドリアの構造維持に必要であることが確認された。

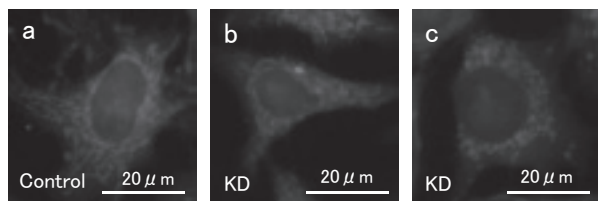


図2) コントロール (Control) および IMMT ノックダウン (KD) 細胞内のミトコンドリアの形態。ミトコンドリアの染色には Mito Tracker Red を用いた。a: Control 細胞。b および c: KD 細胞。スケールバー: 20 μm 。

次に, 上記の IMMT のノックダウンによりアポトーシスが起きているか否かを確認するためにアポトーシス判別用の蛍光標識試薬である JC-1 で細胞を染色し, 赤色の蛍光 (生細胞の蛍光) と緑色の蛍光 (アポトーシスを起こした細胞の蛍光) を蛍光プレートリーダーで測定し, その蛍光強度比 (Green / Red) を算出した (図3)。その結果, IMMT をノックダウンしても蛍光強度比にほとんど変化が生じなかった。このことから, 本研究の実験条件 (ノックダウン効率約30%) では, 細胞はアポトーシスを起こしていないことがわかった。

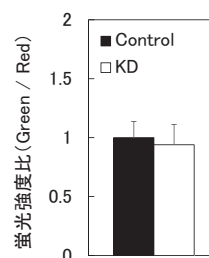


図3) コントロール (Control) および IMMT ノックダウン (KD) 細胞におけるアポトーシス陽性細胞の検出。JC-1 を用いて, 生細胞 (Red 蛍光) とアポトーシスを起こした細胞 (Green 蛍光) を蛍光プレートリーダーで検出し, その蛍光強度比 (Green / Red) を算出した。Control 細胞の蛍光強度比を1とした場合の KD 細胞における相対蛍光強度比を示した。n=48。

しかし, ミトコンドリアの構造に異常が生じているならば, 何らかの異常が生じているであろうと考えられた。そこで, 次に, 活性酸素種 (ROS) を検出するための蛍光試薬である CM-H₂DCFDA で染色し, 緑色の蛍光 (CM-H₂DCFDA と ROS との反応によって生じる蛍光) を蛍光プレートリーダーで測定した (図4)。その結果, IMMT ノックダウン細胞では, 緑色の蛍光がコントロール細胞の場合に比べて有意に増加していた。このことから, IMMT のノックダウンにより ROS の産生量が有意に上昇することがわかった。

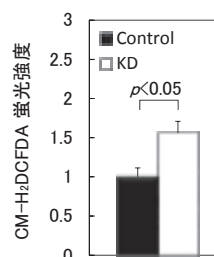


図4) コントロール (Control) および IMMT ノックダウン (KD) 細胞内の ROS の定量。CM-H₂DCFDA を用いて ROS を検出し, その蛍光強度 (Green 蛍光) を蛍光プレートリーダーで測定した。Control 細胞における蛍光強度を1とした場合の KD 細胞における相対蛍光強度を示した。n=48。

以上のことから, ノックダウン法により IMMT タンパク質の発現量を約30%にすると, 先行研究^{2,3)}と同様にミトコンドリアの形態に異常が生じることがわかった。また, ROS の産生量が増加するが, 細胞は生きていたことがわかった。我々は「このとき, 細胞内での代謝はどのように変化しているの

か？」という疑問をもち、以下、ミトコンドリアを含めた細胞内の代謝がどのように変化するか調べた。

グルコースはサイトソルの解糖系でピルビン酸に代謝され、クエン酸回路で代謝される場合には、まず、ミトコンドリア内膜に存在するピルビン酸輸送体 (MPC1) を介してマトリックス内に取り込まれる⁴⁾。このことから、コントロールおよび IMMT のノックダウン細胞における MPC1 の発現量を調べることで、IMMT のノックダウンによりピルビン酸のミトコンドリア内への取り込みがどのような影響を受けるか推定できると考え、まず、MPC1 の mRNA 発現量を調べた。その結果、コントロール細胞の場合に比べ、IMMT をノックダウンした細胞では、MPC1 の mRNA 発現量が有意に低下していた (図 5)。このことから、IMMT が欠乏すると MPC1 の発現量が低下し、ピルビン酸のミトコンドリアマトリックス内への取り込みが低下するのではないかと推定された。

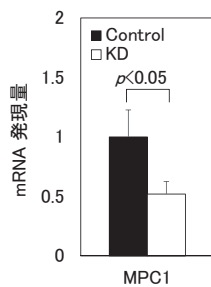


図 5) コントロール (Control) および IMMT ノックダウン (KD) 細胞における MPC1 の遺伝子発現量。Control 細胞における発現量を 1 とした場合の KD 細胞における相対発現量を示した。n=4。MPC1; Mitochondrial Pyruvate Carrier 1。

次に、脂肪酸の代謝酵素類に着目して mRNA 発現量解析を行った。脂肪酸は、極長鎖の場合にはペルオキシソームにおいて β 酸化を受けるのに対し、長鎖、中鎖、あるいは短鎖の場合には、ミトコンドリアのマトリックスにおいて β 酸化により代謝されてアセチル CoA となる。なお、脂肪酸がミトコンドリアのマトリックスに入るためには、予め、CoA と反応してアシル CoA となった後に、さらにカルニチンにアシル基を転移する酵素の作用によりアシルカルニチンになる必要がある。以上の過程に関わる酵素の例として、CPT1A⁵⁾ (カルニチンにアシル CoA のアシル基を転移する酵素)、ACAA2 (ミト

コンドリアのマトリックスにける β 酸化の最終段階を触媒する酵素)、ACOX1 (ペルオキシソームにおける β 酸化反応を触媒する酵素) がある。これらの酵素の mRNA 発現量を調べた結果、コントロール細胞の場合に比べ、IMMT をノックダウンした細胞では、CPT1A の発現量が有意に低下していた (図 6)。このことから、IMMT が欠乏すると、CPT1A によるアシルカルニチンの合成が低下し、それに伴い、ミトコンドリアのマトリックス内に取り込まれるアシルカルニチン量も減少することで、 β 酸化が進まなくなると推定された。実際、ミトコンドリアのマトリックスで β 酸化に関わる酵素である ACAA2 の発現量も、有意差はつかなかったものの、IMMT ノックダウン細胞で減少する傾向がみられた (図 6)。また、興味深いことに、ペルオキシソームにおける β 酸化反応に関わる ACOX1 の発現量も、IMMT ノックダウン細胞で有意に減少していた (図 6)。

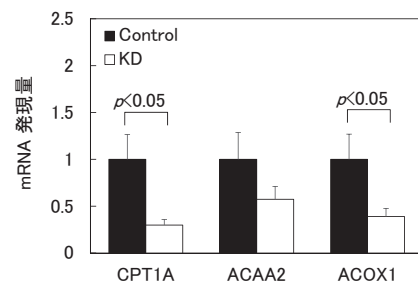


図 6) コントロール (Control) および IMMT ノックダウン (KD) 細胞における CPT1A, ACAA2, ACOX1 の遺伝子発現量。Control 細胞における発現量を 1 とした場合の KD 細胞における相対発現量を示した。n=4。CPT1A; carnitine palmitoyltransferase 1A, ACAA2; acetyl-CoA acyltransferase 2, ACOX1; acyl-CoA oxidase 1。

次に、脂肪酸の細胞内への取り込みと細胞内貯蔵・輸送に着目して mRNA 発現量解析を行った。一般に、細胞外から供給された脂肪酸は、細胞膜に存在する脂肪酸輸送体を介して細胞質に輸送される。脂肪酸輸送体の例としては、CD36 (比較的短い脂肪酸を取り込む輸送体) や、SLC27A1 および SLC27A4 (いずれも比較的長い脂肪酸を取り込む輸送体) などがある。これらの発現量を調べた結果、IMMT をノックダウンしても有意差はなかった (図 7)。このことから、細胞外から脂肪酸を取り込む機能は、IMMT 欠乏細胞においても正常に働いていると推定された。一方で、脂肪酸結合タンパク質

である FABP1⁶⁾ (細胞内に取り込まれた脂肪酸に結合することで脂肪酸を細胞質中で可溶性に保ち、細胞内での脂肪酸の輸送に関わるタンパク質) の発現量は、IMMT ノックダウン細胞において有意に低下していた (図7)。以上のことから、IMMT 欠乏細胞においては、脂肪酸の取り込みは正常に行われるが、細胞内における脂肪酸の保持や輸送が十分に行えない状態になっている可能性が示された。

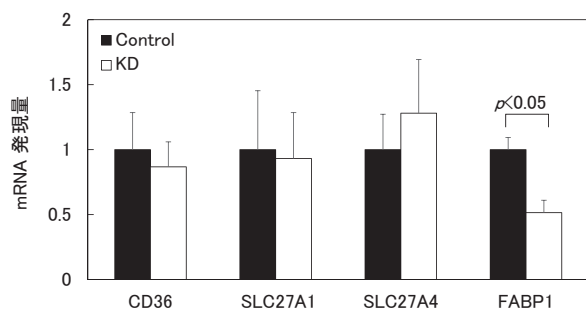


図7) コントロール (Control) および IMMT ノックダウン (KD) 細胞における CD36, SLC27A1, SLC27A4, FABP1 の遺伝子発現量。Control 細胞における発現量を 1 とした場合の KD 細胞における相対発現量を示した。n=4。CD36 ; CD36 molecule, SLC27A1 ; solute carrier family 27 member 1, SLC27A4 ; solute carrier family 27 member 4, FABP1 ; fatty acid binding protein 1。

IV 考察

本研究の実験結果から、MICOS 複合体の構成因子である IMMT の発現量をノックダウンにより約 30% に低下させた場合、先行研究論文^{2,3)} で示されているように、ミトコンドリアの形態に異常が生じることが確認された。このとき、細胞は生きており、アポトーシスは起こらないことがわかった。一方で、ROS の産生が増加することがわかった。我々は、このような状態の細胞内で代謝がどのように変化しているか興味を持ち、各種代謝酵素等の mRNA 発現量解析を行った。その結果、ピルビン酸をミトコンドリア内に取り込む働きを担う輸送体である MPC1 の発現量が低下することがわかった。このことから、IMMT が欠乏すると、ピルビン酸を取り込めず、クエン酸回路が働かなくなり、ATP 合成が低下する可能性が示された。なお、MPC1 遺伝子のプロモーター領域には COUPTFII (別名: NR2F2) という転写制御因子の結合配列が存在し、そこに COUPTFII が結合することで、MPC1 の

mRNA 発現量が低下することが報告されている⁷⁾。また、IMMT をノックダウンするとアシルカルニチン合成酵素である CPT1A の発現量が有意に低下することがわかった。このことから、IMMT を欠乏させると、CPT1A によるアシルカルニチンの合成が低下し、それに伴いミトコンドリアのマトリックス内に取り込まれるアシルカルニチン量も減少することで、 β 酸化が進まなくなる可能性が示された。以上のことから、IMMT を含む MICOS 複合体によるミトコンドリアのコンタクトサイトやクリステ構造の形成は、ピルビン酸や脂肪酸がマトリックスに正常に輸送されるために必要であると推察された。また、IMMT をノックダウンすると、ペルオキシソームの β 酸化酵素である ACOX1 の発現量も有意に減少することがわかった。このことから、IMMT の欠乏により生じる影響は、ミトコンドリアだけでなく、ペルオキシソームの機能にも及ぶ可能性が示された。さらに、解析を進めた結果、細胞質の脂肪酸結合タンパク質である FABP1 の発現量が IMMT のノックダウンにより低下することがわかった。このことから、IMMT が欠乏すると、細胞内における脂肪酸の保持や輸送も不十分になる可能性が示された。

以上のように、IMMT を欠乏させると、ミトコンドリアの構造に異常が生じるだけでなく、酸化ストレスが亢進するとともに、代謝酵素や輸送体の発現量も大きく変化することが示された。生体内の ROS の多くはミトコンドリア内膜にある電子伝達系で発生することから、ミトコンドリアの構造異常により電子伝達系がダメージを受け ROS が発生しやすくなった可能性は高いと考えられる。しかし、ミトコンドリアの構造異常が直接的に代謝酵素や輸送体の mRNA 発現量を低下させるとは考えにくい。我々は、ミトコンドリアの構造異常に起因するミトコンドリア機能異常の情報が、ミトコンドリアから核に伝わり、その結果として代謝酵素や輸送体の mRNA 発現量が調節されているのではないかと推定している。先に述べたように、COUPTFII は MPC1 の mRNA 発現量を低下させることが報告されている⁷⁾。また、最近、パーキンソン病患者のニューロンにおいて COUPTFII の発現量が上昇していること、および、COUPTFII を過剰発現するとミトコンドリアが機能不全に陥ることが報告された⁸⁾。これらの報告を単純に関連付けて解釈すると、

COUPTFII の発現量増加により MPC1 の発現量が低下してミトコンドリアが機能不全に陥るのであると解釈できる。しかし、発想を転換すると、COUPTFII の発現量が増加して MPC1 の発現量を低下させることで、ミトコンドリアの電子伝達系での ROS の発生を低下させてミトコンドリアを保護しているとも考えられる。今後、本研究において mRNA 発現量の低下が見出された MPC1 以外の代謝酵素や輸送体について、COUPTFII などが mRNA 発現量調節に関与しているか検討するなど、ミトコンドリアの構造と代謝的機能との相関関係の解析を進めてゆきたいと考えている。

V おわりに

IMMT のノックダウンにより、実際にミトコンドリアの形態に異常が生じ、ミトコンドリアにおけるピルビン酸や脂肪酸の代謝が低下すること、細胞質における脂肪酸の輸送と貯蔵が低下すること、ペルオキシソームにおける脂肪酸の代謝が低下することが示された。これらのことから、IMMT のノックダウンにより誘導されるミトコンドリアの形態に異常は、ミトコンドリアのみならず、細胞内の様々な代謝に影響を与えると推察された。この可能性を検証するためには、将来的にメタボローム解析などを行い、細胞内代謝の全体像を明らかにする必要がある。

<謝辞>

本研究の実施にあたり、御助力頂いた熊本保健科学大学卒業生の飯田千遥氏、井上愛梨氏、金子紗世氏に厚く御礼申し上げます。

<利益相反>

本研究における利益相反は存在しない。

<文献>

- 1) Rampelt H, Zerbes RM, van der Laan M, et al: Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864: 737-746, 2017.
- 2) Li H, Ruan Y, Zhang K, et al: Mic60/Mitofilin determines MICOS assembly essential for mitochondrial dynamics and mtDNA nucleoid organization. *Cell Death Differ*, 23: 380-392, 2016.
- 3) Tarasenko D, Barbot M, Jans DC, et al: The MICOS component Mic60 displays a conserved membrane-bending activity that is necessary for normal cristae morphology. *J Cell Biol*, 216: 889-899, 2017.
- 4) Bender T, Martinou JC: The mitochondrial pyruvate carrier in health and disease: To carry or not to carry? *Biochim Biophys Acta*, 1863: 2436-2442, 2016.
- 5) van der Leij FR, Huijkman NC, Boomsma C, et al: Genomics of the human carnitine acyltransferase genes. *Mol Genet Metab*, 71: 139-153, 2000.
- 6) Wang G, Bonkovsky H, de Lemos A, et al: Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J Lipid Res*, 56: 2238-2247, 2015.
- 7) Wang L, Xu M, Qin J, et al: MPC1, a key gene in cancer metabolism, is regulated by COUPTFII in human prostate cancer. *Oncotarget*, 7: 14673-14683, 2016.
- 8) Kao CY, Xu M, Wang L, et al: Elevated COUPTFII expression in dopaminergic neurons accelerates the progression of Parkinson's disease through mitochondrial dysfunction. *PLoS Genet*, 16: e1008868, 2020.

(令和2年12月8日受理)

Influence of IMMT-depletion on intracellular metabolism

Yusei KATOH, Kai NISHIKUBO, Kensuke MATSUNARI, Masato YANO
(All authors equally contributed to this work.)

The mitochondrial inner-membrane contains a group of enzymes involved in ATP production, and the mitochondrial matrix contains a group of enzymes involved in the citric acid cycle and β -oxidation pathway. Pyruvic acid, a glucose metabolite, passes through the inner membrane *via* the pyruvate transporter and is metabolized in the citric acid cycle in the matrix. In addition, fatty acids in the cytosol pass through the inner membrane *via* the acylcarnitine transporter and are utilized in the β -oxidation pathway in the matrix. Recently, a MICOS complex, which maintains the structure of mitochondria by forming a contact site between the inner and outer mitochondria membranes, has been identified. The MICOS complex contains IMMT, a core component protein. It has been shown that IMMT deficiency causes abnormalities in the mitochondrial structure. However, the influence of IMMT-depletion on intracellular metabolism has not been analyzed. In this study, we first confirmed that structural abnormalities of mitochondria occurred when the IMMT expression level was reduced to about 30% by knockdown using siRNA. We also found that the cells survived (without causing apoptosis) even when IMMT expression decreased. Additionally, we found that reactive oxygen species significantly increased when IMMT was decreased. To investigate the effect of IMMT-reduction on intracellular metabolism, we analyzed the mRNA expression levels of enzymes and transporters involved in metabolism inside and outside of mitochondria using real-time PCR. As a result, when the IMMT expression was reduced, the mRNA expression levels of MPC1 (a pyruvate transporter present in the inner membrane of mitochondria), CPT1A (an enzyme that transfers the acyl group of acyl-CoA to carnitine in mitochondria), ACOX1 (an enzyme involved in β -oxidation in peroxisomes), and FABP1 (a protein that binds to fatty acids in the cytoplasm), were significantly reduced. These results suggest that reduced IMMT expression results in decreased pyruvate and fatty acid metabolism in mitochondria, decreased fatty acid transport and storage in the cytoplasm, and decreased fatty acids metabolism in peroxisomes.