

# ミトコンドリアのリン脂質恒常性に必要な新規輸送因子の骨格筋形成における役割

## A Role of a novel transport factor required for mitochondrial phospholipid homeostasis in the skeletal myogenesis

(日本脂質生化学会推薦)

代表研究者 獨協医科大学 堀端 康博 Dokkyo Medical University Yasuhiro HORIBATA

Phosphatidylcholine (PC) is the predominant phospholipid (40-50%) in mitochondrial membranes, and is essential for not only compartmentalization of the organelle but also ATP production, thermogenesis, and regulation of apoptosis. Mitochondria lack enzymes to synthesize PC and therefore the lipid must be imported from the endoplasmic reticulum, the site of PC synthesis. StarD7 is a PC-specific lipid transfer protein required for the maintenance of mitochondrial PC level, respiration, and morphogenesis. In this study, we assessed the role of the protein in skeletal myoblast differentiation using mouse myoblast C2C12 cells and human primary myoblasts. Immunofluorescence and immuno-electron microscopy demonstrated that StarD7 was distributed in the cytosol, inner mitochondria space, and outer leaflet of the outer mitochondrial membrane in C2C12 cells. The siRNA-mediated knockdown of StarD7 in C2C12 cells and human primary myoblasts significantly impaired myogenic differentiation and reduced the expression of myomaker, myomerger and PGC-1 $\alpha$ . The reduction in mitochondrial PC levels and oxygen consumption rates, decreased expression of myomaker, myomerger and PGC-1 $\alpha$ , as well as impaired myogenic differentiation, were completely restored when StarD7 was reintroduced into *StarD7*-knockout C2C12 cells. These results suggest that StarD7 is essential for the skeletal myogenesis in mammals.

### 研究目的

ミトコンドリアの膜構造は外部細胞質との仕分けに必要なだけでなく、ATP 産生、熱産生、アポトーシスの制御など、ミトコンドリアの多様な機能にも必須である。ミトコンドリアは内膜も外膜もリン脂質二重層で構成されており、総リン脂質の 40-50% をホスファチジルコリン (PC) が占めている。ところが、ミトコンドリアには PC を合成する酵素が欠失している。従ってミトコンドリアが必要とする PC は脂質合成器官である小胞体 (ER) から供給されていると考えられている。これまで、この ER-ミトコンドリア間の脂質の輸送/移動は、両オルガネラの近接によって形成される膜接触部位を経て行われると考えられているが、関与する因子や分子機構の全容は未だ多くが不明である。

Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) ドメインは、約 210 のアミノ酸で構成され、生体膜を構成するリン脂質、コレステロール、セラミドなどの脂質分子と結合し、引き抜き、輸送する活性を有する機能ドメインである。これまで申請者は、このドメインを有するタンパク質の一つである StarD7 に注目して解析してきた。本タンパク質は N 末端にミトコンドリア移行配列 (MTS) を、C 末端側に PC 特異的な輸送活性を有する START ドメインを持つ (Horibata, Y. and Sugimoto, H. *J. Biol. Chem.* **285**, 7358-7365, 2010)。申請者らはこれまでの解析で、StarD7 は細胞質、ミトコンドリアの内部および外膜外葉に局在していることを明らかにした (Horibata, Y. *et al. Sci. Rep.* **7**, 8793, 2017)。さらに StarD7 を欠失したマウス肝癌由来細胞株 HEPA-1 では、ミ

トコンドリアの PC 量が減少するだけでなく、呼吸機能の低下、ミトコンドリア ATP 生産能の低下、クリステ構造の異常、細胞増殖の低下などが生じることを見出した (Horibata, Y. *et al. J. Biol. Chem.* **291**, 24880-24891, 2016)。以上から StarD7 はミトコンドリアの機能維持に不可欠な因子だと考えられた。

ところで、脳、骨格筋、心筋などの組織は他と比べてエネルギー需要が大きく、その多くをミトコンドリアで合成される ATP に依存している。つまり、これらの組織でミトコンドリアの機能が低下すると、強い障害を受けてミトコンドリア関連疾患のような病態が現れると考えられる。今回は骨格筋における StarD7 の役割を解明することを目的とし、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞およびヒト初代筋芽細胞の StarD7 を欠失すると筋分化がどのような影響を受けるかを解析した。

## 研究経過

### ① 免疫染色法を用いたトポロジー解析

StarD7 の C 末端に myc タグを付加した発現ベクターを C2C12 細胞に発現し、固定後、ジギトニンまたは Triton X-100 で膜透過処理を行った。前者は細胞膜のみ透過し、後者はミトコンドリアを含めすべての生体膜を透過する。ミトコンドリア膜に対する透過効果は、内在性の TOM70 (ミトコンドリア外膜)、YME1L1 (ミトコンドリア膜間腔)、SDHA (マトリクス) の染色によって評価した。その結果、StarD7 は細胞質、ミトコンドリア内部および外膜外葉に局在することがわかった。さらに岡山大学・坂本浩隆先生との共同研究で金コロイド標識 2 次抗体を用いた免疫電顕を行い、ミトコンドリアにおける局在を詳しく調べた。その結果、StarD7 はミトコンドリア内部と外膜外葉に局在することが免疫電顕による解析でも確認された。

### ② StarD7 の欠失細胞の樹立とレスキュー実験

CRISPR/Cas9 の変異酵素を用いた DOUBLE NICKASE DESIGN 法を使用し、StarD7 をノックアウト (KO) した C2C12 細胞 (StarD7-KO) を樹立した。レスキュー実験は、StarD7-KO 細胞にヒト StarD7 をトランスフェクトし、G418 薬剤耐性セレクションにより安定的に StarD7 を再発現する細胞 (KO+StarD7) を単離した。ヒト初代筋芽細胞を用いた実験では、siRNA を用いて StarD7 をノックダウンする系を確立

した。

### ③ 酸素消費速度 (OCR) の測定

細胞外フラックスアナライザー XFp とミトコンドリアストレスキットを用い、ミトコンドリアにおける OCR を測定した。その結果、StarD7-KO の C2C12 細胞ではミトコンドリアの OCR が顕著に低下していた。OCR の低下は StarD7 をレスキューした KO+StarD7 細胞では完全に回復していた。

### ④ ミトコンドリアのリン脂質組成の解析

パーコール/ナイコデントの密度勾配法によりミトコンドリアを単離した。リン脂質を Bligh and Dyer 法で抽出後、QTRAP5500 を用いた液体クロマトグラフィータンデムマススペクトリー (LC-MS/MS) で定量した。その結果、StarD7-KO 細胞では野生型細胞と比べ有意に PC 量が低下していた。ミトコンドリアの PC 量の低下は KO+StarD7 細胞では野生型細胞と同じ量にまで回復していた。

### ⑤ 骨格筋分化誘導と筋分化の評価

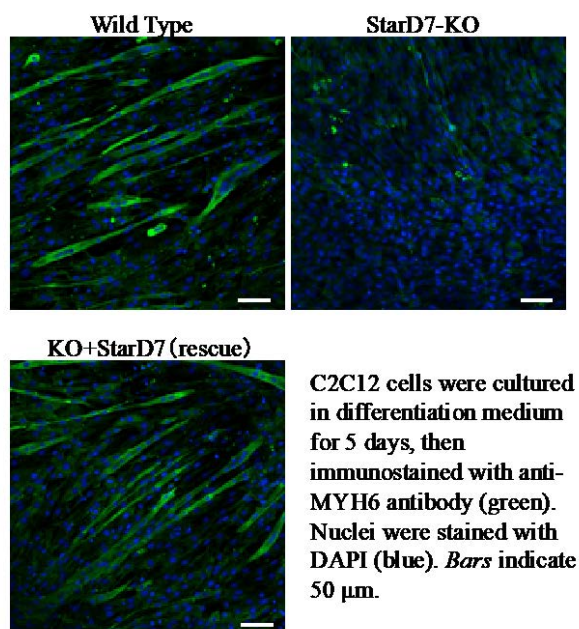
C2C12 細胞あるいは初代ヒト筋芽細胞を、2%ウマ血清を含む DMEM 培地で 2~10 日間培養することで筋分化を誘導した。筋分化の評価は、分化マーカーである Myogenin や MHC6 (Myosin Heavy Chain6) の発現量をウェスタンブロット、定量的 PCR、および免疫細胞染色法で解析することで行った。さらに細胞融合の活性化因子である Myomaker や Myomerger、ミトコンドリアの合成を促進する PGC-1 $\alpha$  の mRNA の発現量を定量的 PCR によって解析した。

まず、野生型 C2C12 細胞の筋分化を 2~10 日間誘導し、StarD7 の発現の経時変化を調べた。分化マーカーである Myogenin や MHC6 は分化誘導の日数に従って発現量が増加したが、StarD7 は誘導前後でほぼ一定のままであることがウェスタンブロットと定量的 PCR により明らかになった。

続いて C2C12 細胞を 5 日間分化誘導し、筋分化の程度を MHC6 の免疫細胞染色で評価した。野生型細胞では MHC6 で染色される多核の筋管繊維が観察された。一方、StarD7-KO 細胞は MHC6 でほとんど染色されず、筋管繊維の形成も著しく阻害されていた。KO+StarD7 細胞では筋管繊維の形成が野生型細胞と同程度にまで回復していた (Fig.1)。また StarD7-KO

細胞では Myogenin、MHC4、MHC6 がほとんど発現しておらず、Myomaker や Myomerger および PGC-1 $\alpha$  の発現も野生型細胞と比べて顕著に低下していた。

**Fig. 1 Reintroduction of StarD7 into the StarD7-KO C2C12 cells restored myogenic differentiation.**



次に、ヒト初代筋芽細胞の内在性 StarD7 を siRNA を用いて発現抑制し、筋分化を誘導した。その結果、ノックダウンした細胞ではコントロールと比較して MHC6 で染色される筋管繊維の形成が顕著に阻害された。また C2C12 細胞の結果と同様に MHC4、MHC6、Myomaker、Myomerger および PGC-1 $\alpha$  の発現量が顕著に低下していた。

以上の結果から、StarD7 は筋芽細胞のミトコンドリア PC の保持ならびにミトコンドリアの機能に重要で、本タンパク質が欠失すると筋分化が著しく阻害されることが明らかになった。

## 考察

ミトコンドリアは PC を自足できないため、必要な PC は脂質合成器官である ER からの供給に完全に依存している。申請者はこれまでの研究から、StarD7 は ER-ミトコンドリア間において PC を輸送する因子であると考えている。今回、筋芽細胞の StarD7 を欠失させると、ミトコンドリアの PC 量が低下したことから、この仮説は支持されたと思われる。またこの細胞ではミトコンドリアの酸素消費が顕著に低下し、ミトコンドリアの機能障害が生じ

ていた。さらに、StarD7 が欠失した筋芽細胞ではマウスでもヒトでも筋分化が顕著に阻害されたことから、本タンパク質は正常な筋形成に必須であることが実証された。

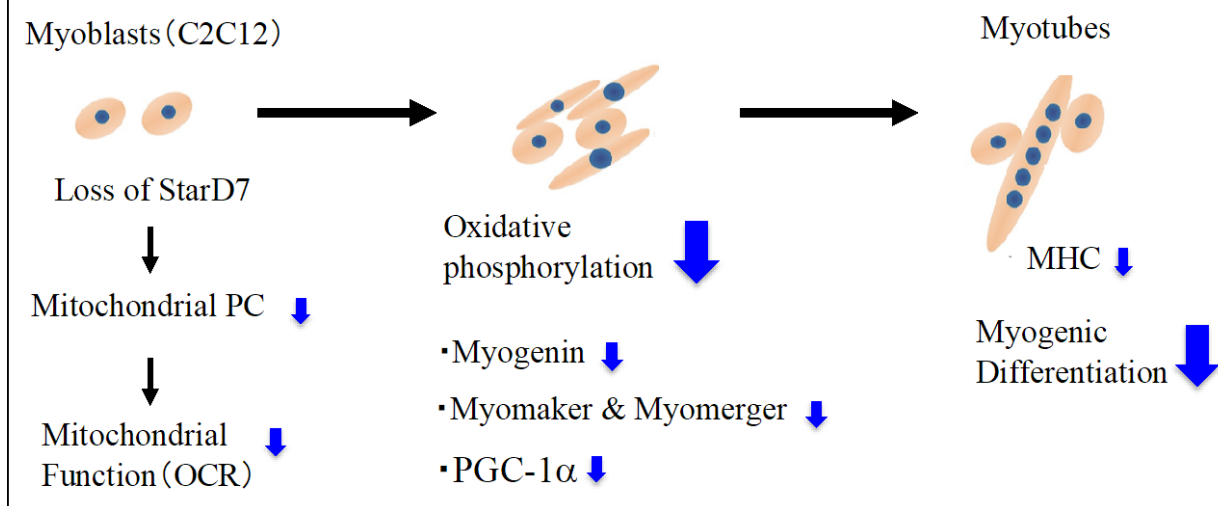
ミトコンドリアの機能が低下すると、なぜ筋分化が阻害されるのであろうか？その理由については以下のように考えられる。増殖期にある未分化の筋芽細胞では、活動に必要な ATP は主に解糖系によって賄われていると考えられている。しかし、筋管細胞に分化する際、エネルギー需要が増大し、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化による ATP 生産へと代謝系がシフトされる。今回、StarD7 の欠失によりミトコンドリアの機能が低下することがわかったが、これにより代謝シフトが阻害されていると考えられる。その結果、筋特異的遺伝子の転写因子である Myogenin の低下、細胞融合を促進する Myomaker や Myomerger の低下、さらにミトコンドリア新生を促す転写コアクチベーター PGC-1 $\alpha$  の発現抑制が生じ、筋分化が強く阻害されたと思われる (Fig.2)。この考察は、例えばクロラムフェニコール、CCCP、ロテノンなどのミトコンドリア機能阻害剤で筋芽細胞を処理すると筋分化が強く阻害されるという過去の報告からも支持されると思われる。

ミトコンドリアの PC 量の維持と筋形成阻害との関係については、以前に興味深い報告がなされている。骨格筋における PC の新規合成は、主に CDP-コリン経路によって行われる。この経路ではコリンキナーゼによるコリンリン酸の合成によって開始される。ヒトやマウスの骨格筋では、主にコリンキナーゼ $\beta$ が発現しているが、この酵素に遺伝的な変異があると、先天性筋ジストロフィーが発症することが知られている。興味深いことに、このマウスの骨格筋ではミトコンドリアの PC 量が顕著に低下し、ミトコンドリアの機能低下や形態異常が見られる。つまり、ミトコンドリアの PC 量の減少と筋形成不全についての結果は、この報告と今回の研究で一致している。

ミトコンドリアミオパシーはミトコンドリア関連疾患の一つで、筋力低下や心機能の喪失などの症状を特徴とし、ミトコンドリア恒常性に必須な遺伝子の変異によって引き起こされる。近年、ミトコンドリアミオパシーの原因となる遺伝子変異についての報告数は増加しているものの、未だ多くは不明のままである。また現在、ミトコンドリアミオパシーに

対する治療法はなく、対症療法で緩和するしかない。これまでのところ、StarD7 の遺伝子変異によって発症するミトコンドリアミオパシーの症例報告はまだないが、本研究は StarD7 の変異が筋分化を阻害し、ミオパシーの病因になりうることを初めて実証した。本研究は骨格筋形成のさらなる理解やミトコンドリアミオパシーの診断と治療の開発に貢献出来ると考えられる。

**Fig. 2 Loss of StarD7 impairs the mitochondrial function and skeletal myogenesis**



## 研究の発表

### 誌上発表

1. **Horibata, Y.**, Mitsuhashi, S., Shimizu, H., Maejima, S., Sakamoto, H., Aoyama, C., Ando, H., and Sugimoto, H. : The phosphatidylcholine transfer protein StarD7 is important for myogenic differentiation in mouse myoblast C2C12 cells and human primary skeletal myoblasts. *Sci. Rep.* **10**, 2845 (2020)

### 口頭発表

1. **堀端康博**, 杉本博之 ; 「リン脂質輸送タンパク質 StarD7 がミトコンドリアにおいて果たす役割」第 62 回日本脂質生化学会プレシンポジウム, (東京) 2020.5.
2. **堀端康博**, 三橋里美, 青山智英子, 清水裕晶, 杉本博之 ; 「筋分化におけるホスファチジルコリン輸送タンパク質 STARD7 の役割の解析」第 61 回日本脂質生化学会, (札幌) 2019.7.

### ポスター発表

1. **Horibata, Y.** and Sugimoto, H.: Identification, characterization, and functional analysis of a novel phospholipid carrier protein to mitochondria in mammalian cells. *[Best Poster Prize]* 27th FAOBMB & 44th MSBMB Conference IUBMB Special Symposia (Kuala Lumpur, Malaysia) 2019.8.
2. **堀端康博**, 三橋里美, 清水裕晶, 青山智英子, 杉本博之 ; 「ミトコンドリアのリン脂質恒常性に関わる輸送タンパク質 STARD7 は骨格筋分化に必須である」第 9 2 回日本生化学会大会, (横浜) 2019.9.