

# ミトコンドリア活性化による皮膚老化の抑制に関する研究

東京薬科大学生命科学部

柳 茂

We previously identified a mitochondrial ubiquitin ligase MITOL, whose dysfunction causes production of reactive oxygen species from mitochondria. Here, we generated keratinocyte-specific MITOL-deficient mice and examined the relationship between MITOL and ageing. Interestingly, MITOL-deficient mice revealed typical senescence-associated skin phenotypes. Our results provide novel insight into how mitochondrial function controls ageing.

## 1. 緒言

ミトコンドリアの主な生理的役割は脂肪酸のβ酸化や、電子伝達系による酸化的リン酸化によるエネルギー(ATP)産生である。このATPの産生の過程では、生体内酸素の90%以上を消費するが、その一方で消費酸素のうちの数%を活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)として漏出する。これらの活性酸素は種々の要因によりミトコンドリア自身にも影響を与え、細胞内に遊離して様々な生物現象(老化、がん、アポトーシスなど)を誘起している<sup>1)</sup>。またミトコンドリアは絶えず融合分裂を繰り返しながらその機能を維持している。ミトコンドリアの分裂には通常細胞質に存在している分裂因子であるDrp1がミトコンドリアにリクルートされることにより行われ<sup>2)</sup>、この過程においては、ミトコンドリアの外膜に局在するhFisやMffなどのDrp1結合分子が関与する<sup>3,4)</sup>。また、ミトコンドリアの融合にはミトコンドリア外膜に局在するMitofusin<sup>5)</sup>や、ミトコンドリア内膜に局在するOpal<sup>6)</sup>などの融合因子が関わっている。

MITOLはミトコンドリア外膜に局在するE3ユビキチンリガーゼであり、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<sup>7)</sup>。また、ミトコンドリアに蓄積する変性タンパク質を分解することで細胞内毒性を軽減し、ミトコンドリアの品質管理に関与する<sup>8,9)</sup>。さらに、我々はMITOLの基質として微小管関連タンパク質であるMAP1B-light chain 1(LC1)を同定し、MITOLが一酸化窒素(NO)によって修飾されたLC1を選択的にユビキチン化しその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た<sup>10)</sup>。今後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である。

皮膚は紫外線(UV)などの環境要因の影響により、皮膚細胞、色素細胞、真皮結合細胞、血管などにダメージが蓄積することで老化が進行する。紫外線(UV)は表皮細胞内において細胞老化の原因とされるROSのレベルを上昇させるため、皮膚老化現象とROSの関係性が注目されており、実際に表皮細胞増殖に関与する表皮ケラチノサイト成長因子がUVによって引き起こされる表皮ケラチノサイト内のROSのレベルの上昇を抑えていることが報告されている<sup>11)</sup>。ミトコンドリアは生体内の主要なROSの産生源であり、近年ではミトコンドリアダメージによるROSのレベルの上昇が皮膚老化を進行させるという報告がされている<sup>12)</sup>。今回、皮膚老化とミトコンドリア機能維持の関係性に着目し、MITOLがミトコンドリアダメージによる細胞内のROSのレベルの上昇を防ぐことで、皮膚老化を制御するという仮説を立て、表皮ケラチノサイトにおけるMITOLのコンディショナルノックアウトマウスを作製し、この仮説を検証した。

## 2. 実験(材料と実験方法)

### マウスを用いた実験

#### ▼動物

- ・C57BL/6N mouse (日本SLC)
- ・MITOL Flox mouse (理研)
- ・STOCK Tg (KRT14-cre) 1Amc/J (The Jackson Laboratory)

#### ▼ゲノムPCR/アガロースゲル電気泳動

- ・ゲノムサンプルはmouse tailを50mM NaOHで可溶化したものを使用
- ・DNA マーカー: ΦX174-Hinc II digest (TaKaRa)
- ・アガロースゲル: 2% Agarose (ニッポン・ジーン) in TAE

#### ▼ウェスタンブロット

- ・SDS-PAGEにより分離し、PDVEメンブレン(Millipore)に転写後、各抗体を用いてブロットした。



Role of mitochondria in skin senescence  
Shigeru Yanagi  
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

- ・〈抗体〉抗MITOL抗体(当研究室で作製)、 $\alpha$ -tubulin (SIGMA)
- ▼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)
  - ・DAB染色: (Dako)
- ▼サザンブロット (TRFs: Southern blots of terminal restriction fragments)
  - ・フェノール/クロロホルム処理によりゲノムを精製
  - ・制限酵素処理: Hinf I (TaKaRa)、Rsa I (TaKaRa)
  - ・プローブ telomere 5 repeat: (CCC TAA)<sup>5</sup>
  - ・プローブ合成キット: DIG Oligonucleotide 3' end Labeling Kit, 2nd generation (Roche)、ハイブリダイゼーション: Perfect Hyb (TOYOBO)
  - ・抗DIG抗体: Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche)
  - ・発色液: Amersham CDP-Star (GE Healthcare)

### 細胞を用いた実験

- ▼細胞HaCaT (ヒト表皮角化細胞由来)
- ▼細胞培養・遺伝子導入
  - ・5% CO<sub>2</sub>, 37℃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。遺伝子導入は lipofectoamine 2000 を用いて行った。
- ▼qRT-PCR
  - ・RNAの抽出にはRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を使用した。
  - ・cDNA合成にはReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit (TOYOBO) を使用した。
- ▼ROS generatin detection assay
  - ・CM-H<sub>2</sub>DCFDA (invitrogen) 蛍光プローブで処理し、flow cytometry を用いて検出した。

## 3. 結果

### 表皮特異的MITOL欠損マウス(MITOL cKOマウス)の作製

MITOL Flox マウスにKRT14-cre 遺伝子をもつマウスを掛け合わせ、表皮特異的なMITOLノックアウトマウスを作製した。今回用いたMITOL Flox マウスはExon2がlox Pに挟まれるように設計をした。MITOL 遺伝子がノックアウトされていることは、ゲノムPCR法、ウエスタンブロッティング法で確認を行った。マウスの表皮サンプルからゲノムを抽出し、ゲノムPCRを行った。作製したマウスのサンプルからは欠損バンドである約600bpにバンドが確認できたため、このマウスではターゲットとするExon2が欠損していることがわかった。また、表皮タン

パク質をサンプルとし、ウエスタンブロットを行った結果、作製したマウスのサンプルからはMITOLのバンドは確認できなかった。以上の結果より、表皮特異的MITOLノックアウトマウスの作出に成功した。

### MITOL cKOマウスの表現系

出生後1~6ヶ月ではMITOL cKOマウスでは顕著な表現型を示さなかったが、7ヶ月の時点において、オスのMITOL cKOマウスでは白髪が増加が観察された。この白髪増加は背中や両足を中心に起こっており、白髪は体全体の毛の1/3程を占めていた。また、白髪だけではなく、脱毛および皮膚異常が観察された。その後、このMITOL cKOマウスを1ヶ月毎に観察した。その結果、時間経過とともに白髪が進行した。この白髪の進行は尾部から頭部に向かって行われており、白髪は体全体の毛の2/3程を占めた。また、それと同時に脱毛、皮膚の異常も進行しており、皮膚の一部ははがれ落ちた。メスのMITOL cKOマウスでは出生後7ヶ月の時点において、雄のMITOL cKOマウスのような特徴は観察されなかったが、出生後12ヶ月の時点において、白髪や脱毛が観察された。

### MITOL cKOマウスの表皮構造に異常が観察される

オスのMITOL cKOマウスでは7ヶ月齢から脱毛および皮膚の脱落などの表現型が観察された。そこで、皮膚組織切片を作成し、MITOL cKOマウスの表皮構造を観察することにした。コントロールマウスおよびMITOL cKOマウスから皮膚を採取し、皮膚切片を作成し、組織標本の一般的な手法であるHE染色法を行い双方のマウスの表皮構造を観察した。その結果、表皮層において、MITOL cKOマウスではコントロールマウスに比べ、有棘層の肥厚(表皮過形成)が観察された。さらに、毛胞に着目すると、コントロールマウスに比べ、MITOL cKOマウスでは毛胞ひとつに対して肥大化した皮脂腺が増加していることがわかった。MITOL cKOマウスでは表皮過形成および肥大化した皮脂腺の数の増加など、表皮構造形成の異常が起きていることがわかった。

### MITOL cKOマウスでは細胞死が進行する

皮膚組織切片を作成し、TUNEL assay を行うことで細胞死の検定を行った。その結果、MITOL cKOマウスではコントロールマウスに比べ、顕著にTUNEL positiveな細胞が多く観察されており、これらTUNEL ポジティブな細胞は表皮層の中でも特に有棘層に集中していた。また、このようなTUNEL ポジティブな細胞はMITOL cKOマウスの毛包内にも多く観察された。

#### 4. 考 察

本研究の結果から、MITOL cKOマウスでは、白髪を増加や脱毛、皮膚異常など老化モデルマウスに近似した表現型を示すことがわかった。また、MITOL cKOマウスで観察された、表皮の肥厚や皮脂腺の肥大化などの炎症症状の進行、表皮および毛胞における細胞死の増加、テロメア鎖の短縮は、MITOL cKOマウスの表皮において老化が進行していることをサポートする結果である<sup>13,14)</sup>。さらに、HaCaT細胞にMITOL siRNAを遺伝子導入した実験結果から、MITOL cKOマウスの示した表現型の原因が、表皮ケラチノサイト内のROSのレベルの上昇、および分化マーカーであるインボルクリンの減少であることを示唆する結果も得ることができた。老化分野におけるミトコンドリア研究としては、加齢によるミトコンドリア遺伝子の変異の蓄積が細胞機能に悪影響を与える『ミトコンドリア遺伝子変異説』が提唱されており、表皮細胞においては、ROSによってミトコンドリア遺伝子の変異が起こることが証明されている<sup>15)</sup>。また、実際にミトコンドリアDNA修復機能不全マウス(Polg<sup>D257A/D257A</sup>)では脱毛や白髪化、また、細胞死の増加などの老化現象が進行することが明らかにされており、このマウスは早老症のモデルマウスとして確立されている<sup>16)</sup>。今回、MITOL cKOマウスで観察された白髪を増加や脱毛、皮膚異常、細胞死の増加などの老化を示す表現型は、表皮ケラチノサイト内のミトコンドリアダメージによって引き起こされたものであり、細胞内においてMITOLが老化に関与することが示唆された。

今回、メスのMITOL cKOマウスでは、脱毛、白髪を増加、表皮異常、および表皮の肥厚や皮脂腺の肥大化の増加などの炎症反応の進行がオスで観察された時期よりも遅れて観察され、かつその程度が軽度であることがわかった。生体内での活性酸素の除去にエストロゲンが関わるということが報告されている<sup>17)</sup>。メスのMITOL cKOマウスの表現型の遅れは、エストロゲンの活性酸素の除去機能に起因していることが推測される。

MITOL cKOマウスでは表皮肥厚が観察され、さらに、HaCaT細胞を用いたMITOLノックダウンの実験結果より、表皮分化マーカーであるインボルクリンのmRNAの発現量の低下が観察されている。インボルクリンは表皮分化の過程において、有棘層から角層にかけて発現が強くなる分化マーカーであり、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度依存的なCキナーゼの活性化により、その発現が促進されることが知られている。MITOL cKOマウスで観察された表皮の肥厚は、ケラチノサイト内のROSのレベルの上昇による細胞ダメージだけではなく、Ca<sup>2+</sup>の濃度調節異常による分化異常の可能性も考えられる。結論としてミトコンドリア機能低下は老化に直結しており、今回作成されたMITOL cKOマウ

スは老化の分子機構を解析する良い解析モデルになるだろう。

#### (参考文献)

- 1) Marchi S, Giorgi C, : Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging, *J. Signal Transduct.*, **2012**, 329635, 2012.
- 2) Otsuga D, Keegan BR, : The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast, *J. Cell Biol.* **143**, 333-349, 1998.
- 3) James D, Parone PA, : hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery, *J. Biol. Chem.* **278**, 36373-36379, 2003.
- 4) Otera H, Wang C, : Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells, *J. Cell Biol.* **191**, 1141-1158, 2010.
- 5) Huang P, Galloway CA, : Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins, *PLoS One*, **6**, e20655, 2011.
- 6) Alexander C, Votruba M, : OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28, *Nat. Genet.*, **26**, 211-215, 2000.
- 7) Yonashiro R, Ishido S, : A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics, *EMBO J.*, **25**, 3618-3626, 2006.
- 8) Yonashiro R, Sugiura A, : Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation, *Mol. Biol. Cell.*, **20**, 4524-4530, 2009.
- 9) Sugiura A, Yonashiro R, : A mitochondrial ubiquitin ligase MITOL controls cell toxicity of polyglutamine-expanded protein, *Mitochondrion*, **11**, 139-146, 2011.
- 10) Yonashiro R, Kimijima Y, : Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL blocks S-nitrosylated MAP1B-light chain 1-mediated mitochondrial dysfunction and neuronal cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2382-2387, 2012.
- 11) Kovacs D, Raffa S, : Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB, *J. Dermatol. Sci.*, **54**, 106-113, 2009.
- 12) Velarde MC, Flynn JM, : Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin, *Aging (Albany NY)*, **4**, 3-12, 2012.

- 13) Pillai S, Oresajo C, : Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **27**, 17-34, 2005.
- 14) Kuhn A, Herrmann M, : Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after ultraviolet irradiation, *Arthritis Rheum.*, **54**, 939-950, 2006.
- 15) Birch-Machin MA, Swalwell H, : How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue, *Mutagenesis*, **25**, 101-107, 2010.
- 16) Kujoth GC, Hiona A, : Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging, *Science*, **309**, 481-484, 2005.
- 17) Yang XP, Reckelhoff JF, : Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **20**, 133-138, 2011.