

令和元年6月21日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08062

研究課題名(和文)急性脳症解明のための細胞核とミトコンドリアにおける細胞死制御分子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of AIF in the nucleus and mitochondria to understand acute encephalopathy caused by mushroom poisoning

研究代表者

近藤 一成 (Kondo, Kazunari)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・部長

研究者番号：40270623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではAIFの核内での役割を明らかにする目的で、核移行できないミトコンドリア局在型AIFのみを持つ変異細胞株を樹立しAIFの未知の役割や細胞機能を明らかにするために、細胞増殖と細胞分化の過程を解析したところ、変異細胞では細胞増殖が顕著に減少するほか、神経様突起形成がMAPKリン酸化が野生型と同様に起きるにもかかわらずほぼ完全に阻害された。関与遺伝子の解明のため、DNAマイクロアレイ解析した結果、EG-R, EGR-1, c-fos, HSP70などの発現が著しく低下、AIFはこれまで知られている機能のほかに、細胞増殖や神経分化など多くの遺伝子発現制御に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、食中毒で急性脳症により19名の死者を出したスギヒラタケきのこの原因物質とその作用メカニズム、急性脳症との関りの解明を目指すものである。これまでに、細胞毒性成分として単離した脂肪酸が新規細胞死経路により細胞を死に至らしめることを明らかにし、その制御分子AIFはこれまで知られていない機構で細胞の維持に関わっていること、および関与する遺伝子群を推定した。本研究の成果は、食中毒原因解明だけではなく、AIFにより多様な遺伝子発現調節機構への関与の結果は今後神経難病の原因を考えるうえでも極めて重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of AIF in the nucleus and cytosol, we constructed an AIF mutant, which constantly resides in mitochondria using CRISPR/Cas9. Using the mitochondria resident non-releasable AIF, we examined cell viability, differentiation potential, gene expression profiles. The mutant AIF-carrying cells grew slowly and NGF-derived differentiation was completely blocked. The release of AIF may also be indispensable to cell proliferation and differentiation. DNA microarray analysis revealed that several genes involving in cell proliferation, differentiation, neurite out growth, such as S100 calcium-binding protein A, HSP70, early growth response-1, epidermal growth factor receptor, were significantly down-regulated. To summarize, AIF has a novel function to regulate gene expression related to cell proliferation and differentiation. The results also help understand refractory neurological disorders.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：スギヒラタケ 急性脳症 アポトーシス誘導因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AIFはNADH依存性オキシドリダクターゼ活性を有し、ミトコンドリア電子伝達系の維持、エネルギー代謝に必修である一方、細胞死刺激などにより核移行してアポトーシスを誘導するという2面的作用を有するタンパクであると考えられてきた。

2006年から2007年に東北地方を中心に発生したスギヒラタケきのこ中毒について、これまでに細胞毒性脂肪酸(α -eleostearic acid, β -eleostearic acid, 以下ESAとする)を単離同定し、その作用機構の研究を行ってきた。その過程で、細胞毒性脂肪酸であるESAはCaspase-3やPRAP-1、Bak/Baxなど一般的なアポトーシスにおいて活性化される分子群の活性化は起こらず、ミトコンドリアのクリステの構造的異常とAIFのみが関与する新規の細胞死を誘導することを見出して報告してきた(kondo *et al*, JBC2010, Cell Death Dis2013)。AIFのミトコンドリアにおける役割とそれ以外の細胞内器官における役割、特に後者は不明な点が多く、解明が待たれていた。

最近になり、条件付きAIFノックアウトマウス(AIF^{flox/y}R26CreER)を用いた研究において、アポトーシスに重要なBax/Bakを欠失させても細胞死が阻害されないこと、および酵母由来NADHデヒドロゲナーゼNdiの強制発現により回復することから、アポトーシスにはAIFは重要ではないと報告した(Milasta *et al*, *Immunity* 2016)。別の報告(Hangen *et al*, *Mol Cell* 2015)では、AIFは直接電子伝達系の中に取り込まれて必修の酸化還元反応に関わるというのではなく、AIF自身の発現量がCHCHD4と協調して電子伝達系のサブユニットの発現に影響することでミトコンドリア活性を調整しているとされた。上記の報告から、AIFは間接的に電子伝達系に関与することで生存に必修の役割を果たしていると考えられる。一方で、細胞死におけるAIFの役割は重要ではないか、あるいは限定的と考えられた。著者らの研究においても、PC12HS細胞を用いた実験から、発現後核移行をする変異型 Δ N102-AIF発現においても細胞は正常で、この細胞に対するCamptothecin追加刺激等においても細胞死を増強しないことから、AIFは普遍的には細胞死には重要な役割は果たしていないものと考えた。

そこで、新たな疑問点は、AIFの核移行は重要ではなくミトコンドリア内でAIFが機能できなくなることが細胞死へのシグナルなのか、あるいはそれ以外の細胞内器官などで重要な役割を果たしてその破綻が細胞死へつながるのか、である。前述したスギヒラタケきのこによる急性脳症では摂取から発症(一部は死に至る)まで数週間経過していることから特異な機構と考えられる。AIFの真の役割を解明することは、スギヒラタケきのこ由来の細胞毒性物質ESAと脳症発症との因果関係や発症機構の解明に極めて重要であると考えて、AIFの機能解析を分子生物学的視点から行う必要があると考えられた。

さらに、AIF遺伝子変異がシャルコー・マリー・トゥース病やカウチョック症候群など多くの複雑な神経系疾患に関与していることが報告されており、電子伝達系に関わらない部位の変異も含まれることからAIF分子と病態との関係は不明であるが、ミトコンドリア以外の細胞内でのAIFの役割に非常に興味を持たれる。以上の背景のもと、ミトコンドリア以外の細胞内器官でのAIFの役割を明らかにすることで、先のスギヒラタケきのこによる急性脳症との関りを解明できるものと考えた。

2. 研究の目的

食中毒事例としては異例で、一般的な食中毒症状(下痢・嘔吐・腹痛)もなく19名が死亡したスギヒラタケきのこが原因と考えられる急性脳症の発症との因果関係、および作用メカニズムを解明する。本解明は、今後の食中毒を考えるうえで重要な知見となる。AIFは、ミトコンドリア内ではエネルギー代謝に関わることで細胞の維持に必修の役割を果たす一方で、細胞死も誘導すると考えられているが、後者の役割が最近の報告で明確でなくなった。近年のゲノム解析の普及によりAIF遺伝子変異がシャルコー・マリー・トゥース病やカウチョック症候群など多くの複雑な神経系疾患に関与していることが報告されたことから、AIFのこれまでに知られていない機能や役割を明らかにすることは重要になってきた。そのため、AIFの機能解析を分子生物学的に行う。

3. 研究の方法

最初に、ラット神経様細胞PC12HSのRosa26領域へ膜貫通領域近傍のアミノ酸を置換することで、ミトコンドリアから遊離しないAIF変異体(L101G/L103G)を内在性AIFに追加して発現する細胞を構築した(中間変異体)。次に、内在性AIFを破壊して変異型AIFのみを有する目的の変異細胞株(AIFdel7とする)を構築した。すなわち、PC12HSを用いて、CRISPR/Cas9およびドナーベクター共存下で相同組換えによりRosa26領域にL101G/L103G置換変異体AIFを1コピー/アレル導入した細胞を構築した(中間変異体)。次に、内在性AIFを破壊するためにCRISPR/Cas9およびhygromycin耐性遺伝子を含むドナーベクターを用いて相同組換えによって、AIF遺伝子のexon7をhygromycin耐性遺伝子で置換してAIF機能ドメインを破壊して目的の変異細胞株AIFdel7を作製した。構築したAIFdel7細胞を用いて、細胞増殖や神経突起誘導能のほか、各種遺伝子発現変化をAgilent製DNAマイクロアレイで網羅的に調べた。また、細胞内シグナル伝達経路としてMAPK経路について野生型、中間変異体、変異体AIFdel7細胞で比較解析した。細胞周期は、7-AAD

と BrdU を用いて解析した。

4. 研究成果

樹立した変異細胞株 AIFdel7 を用いてキャラクタライゼーションを行った。L101G/L103G 置換変異体 AIF が発現し、かつ細胞死刺激によりミトコンドリアにおいて切断とそれに続くミトコンドリアからの遊離が起きないことを確かめた後に、細胞増殖、細胞内還元能力と神経成長因子 NGF による神経様突起形成能を調べた。その結果、変異細胞 AIFdel7 と中間変異細胞は野生型と比べて細胞増殖速度が半分程度と遅く、細胞周期の S 期の割合が小さかった。このことは、L101G/L103G 置換変異体 AIF 自身がドミナントとして作用することが示唆された。さらに、興味深いことに NGF 刺激で誘導される神経様突起の形成が変異細胞株 AIFdel7 において完全に阻害されていた (図 1)。この結果は、正常な野生型 AIF がミトコンドリア以外でも何らかの役割を果たしていることを示唆する重要な結果である。また、NGF 誘導性の神経様突起形成の過程において MAPK (ERK, JNK, p38) リン酸化が、変異細胞株 AIFdel7 でも野生型と同様に起きるにもかかわらず突起形成が完全に阻害されていたことから、MAPK 下流においてシグナルが阻害されていることが示唆された。次に、カスパーゼ依存性の細胞死誘導 (camptothecin) において変異細胞株 AIFdel7 が細胞死を抑制するかどうか検討したところ、野生型同様に camptothecin 刺激によるアポトーシスに影響しなかった。このことは、ミトコンドリアから遊離した AIF は細胞死には重要な役割を果たしていないことを示唆している

AIF が細胞増殖や細胞分化に関与していることが示唆されたが、野生型と変異細胞株 AIFdel7 においてどのような機構で細胞増殖や細胞分化を制御しているかは不明であった。そこで、次に野生型、中間変異細胞、変異細胞株 AIFdel7 の遺伝子発現について、DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、変異細胞株 AIFdel7 においては、EGF receptor, early growth response-1, c-fos のほか neurexin-1, HSP70 などの発現が著しく低下しており、正常な野生型 AIF は細胞増殖や神経分化など多くの遺伝子発現制御に関与していることが強く示唆された。

Fig.1 Cell differentiation ability after 3day-NGF treatment

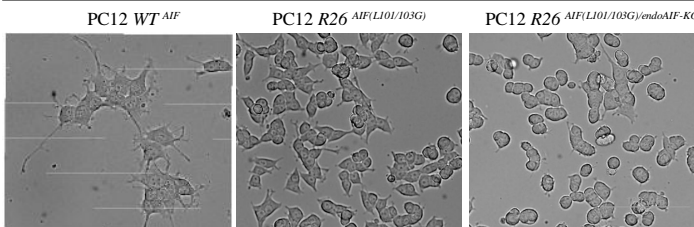
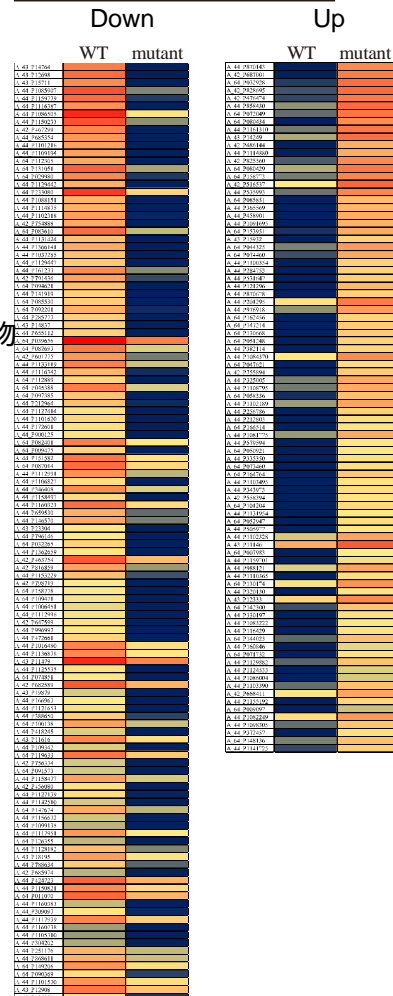


Fig.2 gene expression



現在、個別に細胞増殖や分化に関わる遺伝子とその産物であるタンパク発現について解析を行っている。引き続き検討を行い、スギヒラタケ脳症に AIF 分子がどう発症関わっているか、そのメカニズムについて考察できるようにする予定である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 菅野陽平, 青塚圭二, 坂田こずえ, 中村公亮, 鈴木智宏, **近藤一成**: LAMP 法を用いた有毒キノコ迅速判別法の構築-ツキヨタケとクサウラベニタケの同時検出に関する検討. 日本食品化学学会 第24回 総会・学術大会(2018.7.5)
- (2) 加藤怜子, 坂田こずえ, **近藤一成**: Apoptosis-inducing factor の L101/103G 変異体は細胞増殖と神経突起形成を阻害する. 第41回日本分子生物学会年会(2018.12.4)
- (3) **Kondo K**, Kato R, Sakata K, Nakamura K: Mitochondria-resident non-releasable AIF mutant may regulate gene expressions related to cell differentiation and proliferation. 2018 ASCB EMBO Meeting (2018.12.9)
- (4) 菅野陽平, 青塚圭二, 坂田こずえ, 中村公亮, 鈴木智宏, **近藤一成**: LAMP 法を用いた有毒キノコの迅速判別法の構築 - 国内産クサウラベニタケ判別法の開発について. 2017年度 分子生物学会・生命科学系学会合同年次大会(2017.12.7)
- (5) **近藤一成**, 加藤怜子, 中村公亮, 坂田こずえ: Apoptosis inducing factor (AIF) 核内作用解明のためのミトコンドリア局在性 AIF 変異体細胞の構築. 2017年度 分子生物学会・生命科学系学会合同年次大会(2017.12.6)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 中村公亮、加藤怜子、坂田こずえ

ローマ字氏名：Nakamura Kosuke, Kato Reiko, Sakata Kozue

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。