

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08327

研究課題名(和文)モデルマウス呼吸鎖複合体の解析に基づく中間型CMT(CMTRID)発症機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mouse models of cytochrome c oxidase deficiency owing to mutations in COX6A1

研究代表者

牧野 悟士(Makino, Satoshi)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：30423403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性末梢神経障害であるCharcot-Marie-Tooth病(CMT)原因遺伝子COX6A1のノックアウトマウスが歩行障害を示し、神経伝導速度の低下、神経原性の筋萎縮、COX活性の低下を示した。一方で電子顕微鏡による神経繊維の観察では特別な所見がみられなかった。そこで、ミトコンドリアに存在する金属結合性タンパク質のミトコンドリアフェリチンに着目した。過酸化水素による酸化ストレスを与えたドパミン神経細胞において遺伝子発現量を調べたところ、ミトコンドリアフェリチンの発現量が増加し、神経細胞の保護機能をもつと考えられることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is the most common inherited neuropathy characterized by clinical and genetic heterogeneity. Whole-genome sequencing study in the probands, followed by mutation screening in the two families, revealed a disease-specific 5-bp deletion in a splicing element of intron 2 adjacent to the 3rd exon of COX6A1. Cox6a1 null mice showed significantly reduced COX activity and neurogenic muscular atrophy leading to a difficulty in walking. On the other hand, by electron microscope, no special findings were observed in nerve fibers. Therefore, we focused on the mitochondrial ferritin (FtMt) of metal binding protein present in mitochondria. Under oxidative stress conditions induced by hydrogen peroxide, the expression of FtMt were increased. This finding suggests that FtMt protects cells against oxidative stress by hydrogen peroxide.

研究分野：分子生物学

キーワード：人類遺伝学 ミトコンドリア 末梢神経

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性末梢神経障害である Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) のうち、中間型 CMT のひとつである CMTRID の日本人家系におけるゲノム解析の結果から、疾患に特異的な 5 塩基の欠失を見いだした。その欠失は、ミトコンドリア内膜にある呼吸鎖複合体のひとつ、シトクロム c オキシダーゼ (COX; 呼吸鎖複合体 IV) のサブユニット (図 1) をコードする遺伝子 *COX6A1* のスプライシング制御領域にあり、発症者の末梢血において *COX6A1* の発現量が低下していること、さらには発症者由来の不死化 B 細胞株における、COX 活性の低下を見いだした。また、*Cox6a1* ノックアウトマウスが歩行障害を示し、坐骨神経における神経伝導速度の低下や、神経原性の筋萎縮に加えて、肝組織ミトコンドリア画分における COX 活性の低下がみられることを報告した。これらの結果から、*COX6A1* の欠損が COX の活性低下につながり、ミトコンドリア呼吸鎖の機能不全を引き起こしている可能性が考えられるが、CMT の表現型との関係については不明のままであった。

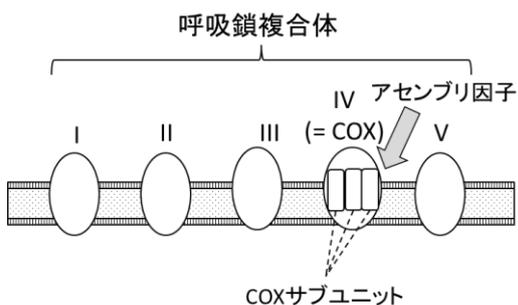


図 1. 呼吸鎖複合体と COX サブユニット

一方、COX 欠損を伴うミトコンドリア病について、これまでに複数の遺伝子における突然変異がその原因として報告されているが、そのほとんどは COX のサブユニットではなく、SURF1 や SCO2 などのアセンブリ因子をコードする遺伝子上に同定されたものであった。それらアセンブリ因子の異常は、Leigh 脳症を典型例として広範な組織にわたる重篤な症状を示す場合が多い。このことは、*COX6A1* が心臓および筋肉を除く幅広い組織で発現しているにもかかわらず、その遺伝子上に突然変異をもつ個体が末梢神経障害のみを示すことと対照的である。よって、CMTRID における分子病態や発症機序を解明することが、COX サブユニットの機能に関する理解へとつながり、また、COX の複合体形成と呼吸鎖の機能との関係、呼吸鎖の機能不全と細胞種特異性との関係を理解する助けになるものと考えられた。そこで本研究では、*COX6A1* が欠損したマウスの様々な組織を用いた解析を計画した。

### 2. 研究の目的

ミトコンドリア機能の障害に由来する疾

患のうち、シトクロム c オキシダーゼ (COX; 呼吸鎖複合体 IV) 欠損は、呼吸鎖の機能不全を伴う疾患のなかで最も多く観察される障害のひとつである。これは、COX の複合体形成やその安定化のために必要なアセンブリ因子が数多く存在する (酵母で 30、ヒトでは 6) ことや、いくつかのサブユニット (COX4, COX5, COX6A) には組織特異的アイソフォームが存在することから、アセンブリパスウェイが複雑なものとなっていることに起因するものと考えられる。

本研究においては、COX のサブユニットである *COX6A1* が欠損したマウス組織の解析を行うことにより、サブユニットの有無が COX の複合体の形成や安定性、さらには呼吸鎖にもたらす影響を調べることを目的とし、*COX6A1* ノックアウトマウスとコントロール間で坐骨神経の電子顕微鏡による観察を行う。また、神経繊維の観察では特別な所見がみられなかったことから、ミトコンドリアに存在する金属結合性タンパク質のミトコンドリアフェリチン (FtMt) に着目し、神経細胞における機能解析を行う。すなわち、過酸化水素による酸化ストレスを与えたドパミン神経細胞において FtMt の発現量の比較を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 作出した *Cox6a1* ノックアウトマウス (図 2) はいずれも低体重であり、歩行異常が認められた。得られたマウスについて、坐骨神経を摘出して電顕標本作製して観察を行い、軸索や軸索内小器官における組織学的所見を野生型マウスとノックアウトマウスの間で比較した。



図 2. 作出したノックアウトマウス  
左：野生型、右：ノックアウト

6 週齢の野生型マウス (WT: +/+) 2 個体、ノックアウトマウス (KO: -/-) 2 個体を灌流固定し、坐骨神経を摘出して電顕観察用に後固定した。樹指包埋超薄切片法による電顕観察条件の詳細は以下のとおり。

固定① : 2% PF A, 2% GA in 0.1 M cacodylate buffer

固定② : 2% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer

包埋 : Quetol-812

切片の厚さ：70 nm  
 電子染色：uranyl acetate・Leadstain solution  
 撮影機種：JEM-1200EX  
 加速電圧：80 kV

(2) ドパミン作動性の神経芽腫細胞株 SH-SY5Y を用いて、 $\alpha$ -シヌクレイン調節における FtMt の機能およびドパミン作動性細胞におけるその抗酸化作用を調べた。

- ① 培養した SH-SY5Y において、pEGFP-N1/FtMt コンストラクトを FuGENE HD 試薬によりトランスフェクション
- ② レチノイン酸と BDNF を使用して SH-SY5Y を分化
- ③ 過酸化水素水による処理
- ④ MTT アッセイ
- ⑤ RNAi による遺伝子ノックダウン
- ⑥ リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現定量
- ⑦ ウェスタンブロットによるタンパク質定量

#### 4. 研究成果

(1) 坐骨神経摘出の時点でも、ノックアウトマウスの坐骨神経束は幅が小さく、貧弱であった。光顕試料からの印象では、ノックアウトマウスの方が野生型マウスよりも全体の神経線維（軸索）数が少なく、不揃いのものが多く、また間質形成が悪く疎であった。一方、電顕観察結果では、ノックアウトマウスと野生型マウスの間で違いがあるのかどうかははっきりしておらず、特に軸索内小器官について意味のある差異はみられないようであった（図 3, 4）。

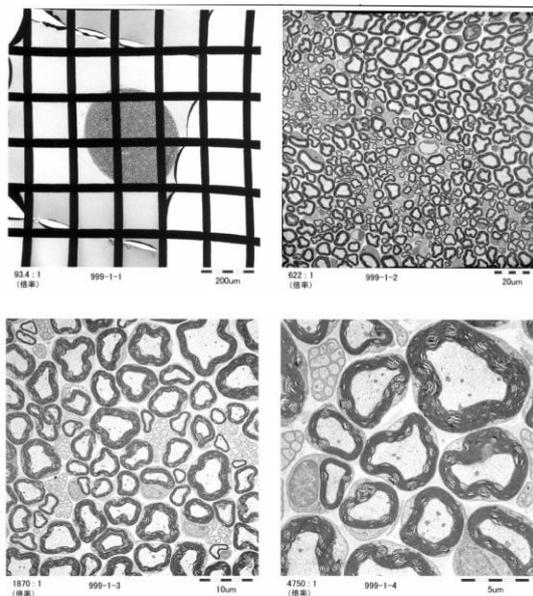


図 3. 野生型マウス坐骨神経の観察結果

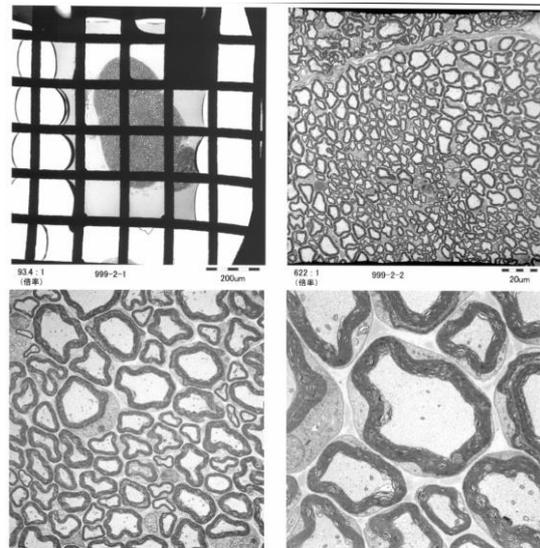


図 4. ノックアウトマウス坐骨神経の観察結果

(2) FtMt ノックダウンによって、タンパク質レベルで  $\alpha$ -シヌクレイン発現の上昇がみられたが、mRNA レベルでは発現上昇はみられなかった。一方、FtMt 過剰発現の条件下において、タンパク質レベルで  $\alpha$ -シヌクレイン発現量は減少したが、mRNA レベルでは低下がみられなかった（図 5）。

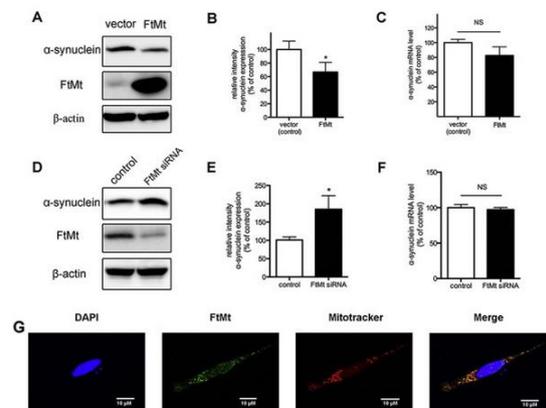


図 5. FtMt と  $\alpha$ -シヌクレイン発現量との関連

また、過酸化水素によって誘導される酸化ストレス条件下において、過酸化水素処理が mRNA およびタンパク質レベルの両方で FtMt および  $\alpha$ -シヌクレイン発現を量依存的に誘導することが見出された。

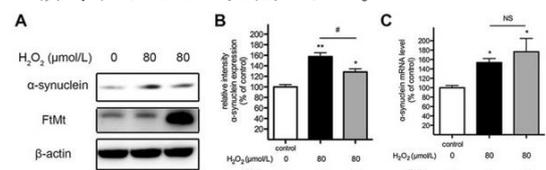


図 6. 過酸化水素処理条件下における FtMt と  $\alpha$ -シヌクレイン発現量との関連

FtMt の過剰発現は細胞を酸化ストレスから保護し、転写後のレベルで過酸化水素によ

て誘導される $\alpha$ -シヌクレインの発現の増加を緩和すると考えられた(図6)。これらの結果より FtMt 発現は酸化ストレス条件下で強化され、FtMt は酸化ストレスから細胞を保護し、 $\alpha$ -シヌクレインレベルを維持する上で重要な役割を果たすものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Guan H, Yang H, Yang M, Yanagisawa D, Bellier JP, Mori M, Takahata S, Nonaka T, Zhao S, Tooyama I. Mitochondrial ferritin protects SH-SY5Y cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and modulates  $\alpha$ -synuclein expression. *Exp Neurol*. 査読有, 2017, 291: 51-61.  
doi: 10.1016/j.expneurol.2017.02.001
- ② Ogino D, Hashimoto T, Hattori M, Sugawara N, Akioka Y, Tamiya G, Makino S, Toyota K, Mitsui T, Hayasaka K. Analysis of the genes responsible for steroid-resistant nephrotic syndrome and/or focal segmental glomerulosclerosis in Japanese patients by whole exome sequencing analysis. *J Hum Genet*. 査読有, 2016, 61(2):137-41.  
doi: 10.1038/jhg.2015.122
- ③ Okamura K, Oiso N, Tamiya G, Makino S, Tsujioka D, Abe Y, Kawaguchi M, Hozumi Y, Shimomura Y, Suzuki T. Waardenburg syndrome type IIE in a Japanese patient caused by a novel missense mutation in the SOX10 gene. *J Dermatol*. 査読有, 2015, 42(12):1211-2.  
doi: 10.1111/1346-8138.13095

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

牧野 悟士 (MAKINO, Satoshi)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：30423403

### (2)研究分担者

田宮 元 (TAMIYA, Gen)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：10317745

遠山 育夫 (TOOYAMA, Ikuo)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・教授

研究者番号：20207533