

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700517

研究課題名（和文） MARCH-Vによるミトコンドリア形態制御の生理機能の解明

研究課題名（英文） Analysis of the physiology of mitochondrial morphology control by MARCH-V

## 研究代表者

後藤 栄治 (GOTO EIJI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：40435649

研究成果の概要（和文）：本研究では、MARCH-V欠損マウスを用いて、MARCH-Vによるミトコンドリア形態制御の高次機能維持における役割について検討を行った。その結果、MARCH-V欠損マウスは胎生致死であり、その原因が、胎生期における神経細胞死による脳組織の発達異常である可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, by using the MARCH-V knockout mice, I demonstrated that mice lacking MARCH-V die after embryonic day 10.5. Moreover, histological studies revealed that loss of MARCH-V led to proliferative abnormality of neuroepithelial cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ミトコンドリア、ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、新たな膜結合型 E3 ユビキチンリガーゼ群である MIR/MARCH ファミリーを世界に先駆けて見出してきた (Curr Opin Immunol 2009)。その中で、我々はミトコンドリアに特異的に局在する新規 E3 ユビキチンリガーゼ MARCH-V/MITOL を世界で初めて同定した (EMBO J 2006)。MARCH-V はミトコンドリアの分裂・融合関連分子 (Drp1, Fis1, Mfn1/2) をユビキチン化し、これら分子の分解あるいは局在変化を促す。また、RNAi による MARCH-V の発現抑制はミトコンドリアの形態異常を引き起こす。これらのことから、

MARCH-V はミトコンドリアの分裂・融合を制御している中心的な分子であることが示唆された。

ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返し、絶えずダイナミックに形態を変化させている。近年、このミトコンドリアのダイナミックな形態変化はアポトーシス制御、酸化ストレス制御、老化など、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。また、ミトコンドリアの機能異常は、がん、糖尿病、神経疾患など、高次機能の破綻から引き起こされる様々な疾患においてその関与が注目されている。したがって、

個々の組織におけるミトコンドリアの形態変化を含めた生理機能の解析は、様々な疾患の原因解明に向け、極めて重要な意味を持つと考えられた。

## 2. 研究の目的

我々を含めた研究グループにより、ミトコンドリアの分裂・融合制御に関与する新たな E3 ユビキチンリガーゼ (MARCH-V) の存在が明らかとなった。ミトコンドリアの分裂・融合は高次機能の維持に必須な現象であると考えられていることから、MARCH-V の生理機能の解析は生命現象の解明において極めて重要な意味を持つと考える。本研究では、MARCH-V 欠損マウスを作製し、MARCH-V によるミトコンドリア形態制御の高次機能維持における役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MARCH-V 欠損マウスの作製

MARCH-V 欠損マウスの作製は、Cre-LoxP システムを用いて、MARCH-V の E3 ユビキチンリガーゼ活性ドメインであるエキソン 2 を Cre-マウスと交配することにより欠損するように作成した。

### (2) 組織化学的解析

胎生 10.5 日目の MARCH-V 欠損胎仔マウスを子宮より取り出し、固定した後、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色により組織の形態を観察した。また、TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) 法により、胎児組織におけるアポトーシスの有無を検討した。

### (3) MARCH-V 欠損線維芽細胞を用いた解析

野生型および MARCH-V 欠損マウスの胎仔から胎仔由来線維芽細胞を調製し、カルシウムイオノフォア (A23187) およびアクチノマイシン D を用いて、ER ストレス刺激およびアポ

トーシス誘導の影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) MARCH-V 欠損マウスは胎生致死である。

我々は MARCH-V の生理機能を明らかにするため、MARCH-V 欠損マウスを作製し解析を試みた。その結果、MARCH-V 欠損マウスは全く生まれて来ず、胎生致死であることが明らかとなった。そこで、さらに詳細に致死となる時期を調べたところ、胎生 10.5 日目までは、メンデルの法則に従い、MARCH-V 欠損胎仔の生存が確認出来たが、これ以降の段階では徐々に MARCH-V 欠損胎仔の割合が減少していた (表 1)。また、胎生 10.5 日目の MARCH-V 欠損胎仔は生きているが、同腹子の野生型と比べると、顕著なサイズの減少が見られた (図 1)。従って、このことから、MARCH-V 欠損マウスは胎生 10.5 日目から死に始めることが明らかとなり、さらに原因として、組織の発達異常である可能性が考えられた。

表 1. 胎生期におけるジェノタイプング結果

Stage	No. of animals (%) of genotype				Total
	+/+	+/-	-/-		
P21	38 (40)	56 (60)	Alive 0 (0)	Dead -	94 (100)
E15.5	32 (28)	74 (64)	10 (8)	0 (0)	116 (100)
E12.5	29 (37)	42 (56)	5 (7)	0 (0)	75 (100)
E11.5	16 (28)	24 (43)	7 (12)	10 (18)	57 (100)
E10.5	29 (27)	50 (48)	25 (24)	1 (1)	105 (100)
E9.5	10 (37)	12 (44)	5 (16)	0 (0)	27 (100)

E, embryonic day; P, postnatal day.

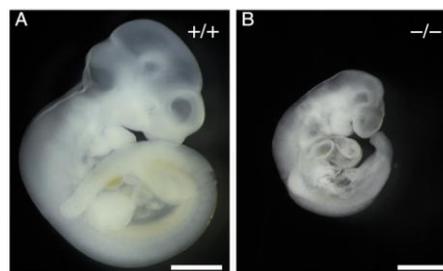


図 1. MARCH-V 欠損胎仔マウス

胎生 10.5 日の胎仔。MARCH-V 欠損マウスの胎仔 (B) は野生型 (A) に比べ、体のサイズが小さい (Bar: 1mm)。

### (2) MARCH-V は胎生期の脳神経細胞の発達

に重要である。

MARCH-V 欠損マウスが胎生致死となる詳細な原因を明らかにするため、胎生 10.5 日目の MARCH-V 欠損マウスの組織切片を作成し、HE 染色および TUNEL 染色にて組織化学的解析を行った。その結果、MARCH-V 欠損マウスの胎生期脳において、神経上皮細胞層が未発達であること、さらに、野生型に比べ TUNEL 染色陽性細胞が有意に存在することが明らかとなった。このことから、MARCH-V 欠損胎仔の脳の神経細胞ではアポトーシスが亢進しており、このことが組織の発達不良および胎生致死の原因ではないかと考えられた。

(3) MARCH-V 欠損線維芽細胞はストレス誘導に対して感受性が強い。

野生型および MARCH-V 欠損マウスの胎仔から胎仔由来線維芽細胞を調製し、カルシウムイオノフォア (A23187) およびアクチノマイシン D を用いて、ER ストレス刺激およびアポトーシス誘導の影響を検討した。その結果、いずれの場合においても野生型に比べ有意に細胞生存率の低下が認められた。

以上の結果から、MARCH-V は胎生期の脳の発生段階において、ストレス誘導性のアポトーシスに対する防御機構としての役割を担っているのではないかと考えられた。今後、さらに詳細な検討を行うことで、ミトコンドリアの分裂・融合が関与する様々な細胞調節機構の新たな原理の解明に大きく貢献出来るだけでなく、幅広い研究分野において、ミトコンドリアの分裂・融合の重要性という新たな視点をもたらす事が出来るものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani,

R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., and Nureki, O. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- $\kappa$ B regulation.

EMBO J. 2012, (19):3856-3870.

DOI: 10.1038/emboj.2012.241.

査読有り

2. Kensche, T., Tokunaga, F., Ikeda, F., Goto, E., Iwai, K., and Dikic, I. Analysis of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) essential modulator (NEMO) binding to linear and lysine-linked ubiquitin chains and its role in the activation of NF- $\kappa$ B.

J. Biol. Chem. 2012, (28):23626-23634.

DOI: 10.1074/jbc.M112.347195.

査読有り

3. Kajikawa, M., Li, PC., Goto, E., Miyashita, N., Aoki-Kawasumi, M., Mito-Yoshida, M., Ikegaya, M., Sugita, Y., and Ishido, S. The intertransmembrane region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus modulator of immune recognition 2 contributes to B7-2 downregulation.

J. Virol. 2012, 86(9):5288-5296.

DOI: 10.1128/JVI.00219-12.

査読有り

4. Tanno, H., Yamaguchi, T., Goto, E., Ishido, S., and Komada, M. The Ankrd 13 family of UIM-bearing proteins regulates EGF receptor endocytosis from the plasma membrane.

Mol. Biol. Cell. 2012, 3(7):1343-1353.

DOI: 10.1091/mbc.E11-09-0817.

査読有り

〔学会発表〕（計1件）

丹野秀崇、山口鉄平、後藤栄治、石戸聡、駒田雅之 「新規ユビキチン結合因子 Ankrd13によるエンドサイトーシス制御」

第84回 日本生化学会大会・シンポジウム－拡大するユビキチンバイオロジー

2011年9月23日、国立京都国際会館（京都府）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 栄治 (GOTO EIJI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：40435649

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし