

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300134

研究課題名(和文) Necdinによるニューロン生存能の強化機構

研究課題名(英文) Strengthening mechanism of neuronal vitality by necdin

研究代表者

吉川 和明 (YOSHIKAWA, Kazuaki)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：30094452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：Necdinは、ニューロンにおいて転写コアクチベーターPGC-1 を安定化することにより、ミトコンドリアの生合成を促進した。この機構によって、Necdinは、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体の阻害剤によって誘発されるニューロンの変性死を抑制した。また、ミトコンドリア酵素複合体I阻害剤を用いたパーキンソン病モデルマウスでは、Necdin遺伝子を中脳黒質に導入すると、ドパミンニューロンの変性脱落が阻止された。以上の結果、Necdinはミトコンドリアの生合成と機能を促進して、ニューロンの生存能を強化することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Necdin promoted mitochondrial biogenesis via stabilization of transcriptional co-activator PGC-1 in neurons and suppressed their degeneration induced by mitochondrial electron transport chain enzyme complex inhibitors. Necdin gene transfer into the substantia nigra in vivo of adult mice prevented mitochondrial complex I inhibitor-induced degeneration of dopaminergic neurons. These results revealed that necdin promotes mitochondrial biogenesis and function in neurons to strengthen their vitality.

研究分野：分子神経細胞生物学

キーワード：Necdin ニューロン エネルギー代謝 生存能 ミトコンドリア 神経変性疾患

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

Necdin は多向性蛋白質であり、多くの蛋白質と結合する。したがって、Necdin によるニューロン生存の強化は、Necdin の結合蛋白質を介して起こる可能性がある。先行する研究によって、Necdin はニューロン死を促進する蛋白質に対しては抑制的に働き、ニューロンの生存を支持する蛋白質に対しては促進的に働くことが明らかになっている。たとえば、Necdin は、生体エネルギー代謝に関連する蛋白質 Sirt1 や FoxO1 と結合し、それらの蛋白質の脱アセチル化を促進する。また、Necdin は蛋白質と結合して、蛋白質の翻訳後修飾、たとえばユビキチン化や SUMO 化に影響を与える。一方、生体エネルギー通貨である ATP の産生に関わるミトコンドリアは、細胞の生存や死の制御にも重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。そこで、Necdin によってニューロン内のミトコンドリア機能が増強され、ニューロン生存力の強化や神経変性の防御効果をもつことが予想された。

2. 研究の目的

ニューロンの生存能を制御する機構は、脳神経系の発達や老化、さらには脳神経疾患の成因に関わる重要な研究課題である。Necdin は哺乳類に特有の蛋白質で、分化したニューロンに強く発現している。当研究室においてこれまでに行った研究によって、Necdin は細胞増殖、分化、生存に重要な役割を果たすことが知られる種々の蛋白質と相互作用をしてニューロンの分化や生存を促進し、細胞死を抑制することが明らかになってきた。一方、Necdin はエネルギー代謝に関わる蛋白質と相互作用をして、脳ニューロンのエネルギー利用を促進することで、ニューロンの生存を促進する可能性が高い。そこで、本研究では、先行研究を進展させ、Necdin がニューロンの生存能と密接に関わるミトコンドリア機能への影響と、その分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Necdin のニューロン内ミトコンドリア合成の制御機構

マウスは、当研究室で作製した Necdin 遺伝子変異マウス (遺伝的背景 ICR) を用いた。初代培養ニューロンは、胎生 14.5 日齢の大脳皮質から調製した。全 RNA を初代培養大脳皮質ニューロンから調製し、DNA マイクロアレイを用いて解析した。DNA マイクロアレイによって変化があった mRNA については、定量的 RT-PCR によって確認した。ミトコンドリア合成の指標として、D-loop RNA の RT-PCR による定量と MitoTracker Green FM を用いた。

また、蛋白質レベルでのミトコンドリア合成量は、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I~V のサブユニットに対する抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。また、MTT ホルマザンの細胞内蓄積量を測定することによりミトコンドリア活性を定量化した。ATP の定量は、ルシフェラーゼ化学発光法を用いて行った。PGC-1 の検出には、マウス PGC-1 cDNA から大腸菌内で合成した蛋白質でウサギを免疫して得られた抗血清を使用した。

(2) 培養細胞を用いたミトコンドリア障害に対する Necdin の保護作用

Necdin が PGC-1 の安定化を介してミトコンドリア障害によって誘発されるニューロン死を抑制するかを調べるため、大脳皮質ニューロンとヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y を用いて検討した。初代培養ニューロンは、野生型と KO マウス (ICR) の胎生 14.5 日齢の大脳皮質から調製した。大脳皮質ニューロンのミトコンドリア呼吸鎖抑制剤として ATP 合成酵素 (ミトコンドリア呼吸鎖複合体 V) の阻害剤であるオリゴマイシン、SH-SY5Y 細胞には、ミトコンドリア呼吸酵素 I 抑制剤 MPP⁺ を用いた。Necdin のニューロン変性の抑制を調べるため、Necdin 遺伝子 (cDNA) をレンチウイルスベクターによって、これらの細胞に導入した。レンチウイルスベクターの作製は、安田らの方法 (J Neuropathol Exp Neurol, 70: 686-697, 2011) にしたがって行った。培養細胞の毒性の評価には、Hoechst332 による核染色を行った後、アポトーシス様の核形態の変化、または、培養液中に放出された LDH を測定した。

(3) パーキンソン病モデルマウスを用いた Necdin の神経保護作用

パーキンソン病 in vivo モデル作製と遺伝子導入法は、上記安田らの方法にしたがって行った。ミトコンドリア毒性をもつ in vivo においてミトコンドリア呼吸酵素 I 抑制剤 MPP⁺ に代謝される MPTP によってパーキンソンモデルを作製した。マウスは、MPTP 感受性をもつ遺伝的背景 C57BL/6J のマウスを用いた。Necdin の in vivo の遺伝子導入は、ヒト Necdin cDNA をアデノ随伴性ウイルスベクター (AAV) に挿入し、13 週齢マウスの中脳黒質内にマイクロインジェクションを行った。実験開始後 42 日目に、MPTP を 5 日間連続して腹腔内投与を行った後、67 日目に解析を行った。黒質におけるドパミンニューロンの変性は、黒質を含む組織をパラフィン抱埋して、連続組織切片を作製し、ドパミンニューロン

のマーカであるチロシンキナーゼを免疫組織化学法で検出した。蛋白質の定量には、黒質を含む組織から抽出した蛋白質のウエスタンブロットを行い、ImageJによって定量化した。

4. 研究成果

(1) Necdin のニューロン内ミトコンドリア生合成の制御機構

Necdin 遺伝子を欠損するマウス胎仔の脳皮質ニューロンにおける遺伝子発現を DNA マイクロアレイで調べたところ、61 種類のミトコンドリア関連遺伝子の発現量が有意に減少していた。これらの中では、ミトコンドリアの輸送受容体である Tomm20, Tomm22, Tomm40, Timm9, Timm50 と電子伝達系酵素の構成要素である Ndufs3 や Atp5c1 の発現量が有意に低下していた。ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I ~V の構成タンパク質を 1 種類ずつ選択して、蛋白質レベルでの発現をウエスタンブロット法で解析したところ、全ての蛋白質が、Necdin KO マウス由来のニューロンで有意に減少していた。Necdin KO ニューロンでは、同時に、ミトコンドリアのマーカ蛋白質の発現やミトコンドリアで合成される ATP の量も有意に減少していた。また、ミトコンドリア DNA によってコードされる D-loop RNA の発現量と MitoTracker Green FM によって標識されるミトコンドリア量が減少し、MTT アッセイではミトコンドリア活性も低下していた。これらの結果、Necdin KO ニューロンでは、ミトコンドリアの生合成が減少していることが示唆された。

ミトコンドリア機能に関与する遺伝子の発現は、PGC-1 によって制御されていることが知られているため、Necdin KO ニューロンにおける PGC-1 の発現を、mRNA レベルと蛋白質レベルで調べたところ、mRNA レベルの変化はなかったが、蛋白質レベルでは顕著な減少が認められた。Necdin は、PGC-1 に直接結合することにより、PGC-1 の蛋白質分解を抑制して PGC-1 量を増加させた。さらに、Necdin は、PGC-1 コヒキチンリガーゼ Rnf34 や Fbxw7 と結合して、PGC-1 のコヒキチン化を抑制することが明らかになった。

(2) 培養細胞を用いたミトコンドリア障害に対する Necdin の保護作用

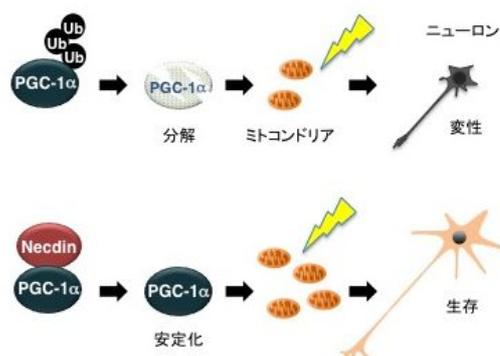
培養細胞を用いてミトコンドリアの機能阻害剤によって誘発される神経変性(死)に及ぼす Necdin の作用について検討した。細胞内ミトコンドリア量の指標として、PGC-1 とミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 IV の構成成分である MTCO1 を用いた。オリゴマイシンによってミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 V(ATP 合成酵素)を阻害すると、初代培

養大脳皮質ニューロンでは活性酸素種が増加し、ニューロン変性が促進された。レンチウイルスベクターを用いて Necdin 遺伝子を初代培養大脳皮質ニューロンに導入すると、PGC-1 と MTCO1 が増加し、オリゴマイシンによる細胞死を有意に抑制した。このことは、Necdin がミトコンドリア機能を増強して ROS 誘発性ニューロン変性を抑制する可能性が示唆された。ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害剤 MPP⁺ で処理することによりパーキンソン病培養細胞モデル系として使用されている。そこでこの細胞系を用いて Necdin の作用を検討した。神経分化させた SH-SY5Y 細胞を MPP⁺ で処理をすると細胞死が起こった。レンチウイルスベクターを用いて Necdin を過剰発現させると、SH-SY5Y 細胞内のミトコンドリア量が増加し、MPP⁺ によって誘発される SH-SY5Y 細胞の変性も有意に抑制された。これらの結果、Necdin は、初代培養大脳皮質ニューロンまたは SH-SY5Y 細胞において、ミトコンドリア障害によるニューロン死を抑制することが分かった。

(3) パーキンソン病モデルマウスを用いた Necdin の神経保護作用

MPP⁺ の前駆体である MPTP は、個体レベルでの実験的パーキンソン病モデルの作成に用いられる。MPTP は、脳組織では MPP⁺ に代謝された後に、ドパミンニューロンのシナプス終末から取り込まれ、ミトコンドリア機能を阻害することによってニューロンの変性を起こすことが知られている。そこで、この実験系を用いて、Necdin のマウスの黒質ドパミンニューロンの変性抑制効果を調べた。Necdin KO マウスでは、大脳皮質の PGC-1 とミトコンドリア特異蛋白質 MTCO1 の有意な低下が見られた。また、加齢が進んだ Necdin KO マウスでは、中脳黒質のドパミン作動性ニューロン数の有意な減少が見られた。これらのマウスに、アデノ随伴性ウイルスベクター(AAV)を用いて中脳黒質領域に Necdin を遺伝子導入すると、PGC-1 レベルとミトコンドリア量が増加した。次に、パーキンソン病モデルマウスを用いて Necdin のニューロン変性抑制効果を検討した。AAV を用いて Necdin 遺伝子をマウス中脳黒質領域に予め投与すると、ミトコンドリア量が増加した。Necdin 遺伝子を投与したマウスでは、MPTP による黒質ドパミン作動性ニューロンの変性死がほぼ完全に阻止された。これらの結果から、Necdin は *in vivo* 条件においても脳ニューロンにおける PGC-1 の安定化を介してミトコンドリア生合成を促進し、ミトコンドリア障害によるニューロンの変性死を阻止することが明らかになった(下図参照)。

以上の結果から、NecdinはPGC-1を安定化してミトコンドリアの生合成を促進することにより、ミトコンドリア障害によるニューロン死を阻止することが示唆される。これらの研究成果は、脳の発達障害やパーキンソン病などのミトコンドリア障害によって起きる神経変性疾患の病因を明らかにすると共に、これらの疾患の予防や治療のための戦略を図る上で、意義があ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9件)

Hasegawa K, Yasuda T, Shiraishi C, Fujiwara K, Przedborski S, Mochizuki H, Yoshikawa K: Promotion of mitochondrial biogenesis by necdin protects neurons against mitochondrial insults. 査読有 Nature Communications 7:10943 (2016) DOI: 10.1038/ncomms10943

Fujimoto I, Hasegawa K, Fujiwara K, Yamada M, Yoshikawa K: Necdin controls EGFR signaling linked to astrocyte differentiation in primary cortical progenitor cells. 査読有 Cellular Signalling 28:94-107(2016) DOI: 10.1016/j.cellsig.2015.11.016

Minamide R, Fujiwara K, Hasegawa K, Yoshikawa K: Antagonistic interplay between necdin and Bmi1 controls proliferation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex. 査読有 PLoS One 9:e84460 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0084460

Gur I, Fujiwara K, Hasegawa K, Yoshikawa K: Necdin promotes ubiquitin-dependent degradation of PIA1 SUMO E3 ligase. 査読有 PLoS One 9:e99503 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0099503

Huang Z, Fujiwara K, Minamide R, Hasegawa K, Yoshikawa K: Necdin controls proliferation and apoptosis of embryonic neural stem cells in an oxygen tension-dependent manner. 査読有 Journal of Neuroscience 33:10362-10373 (2013) DOI:10.1523/JNEUROSCI.5682-12.2013

Hansen DV, Lui JH, Flandin P, Yoshikawa K, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Kriegstein AR: Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. 査読有 Nature Neuroscience 16:1576-1587 (2013) DOI: 10.1038/nn.3541

[学会発表](計16件)

Hasegawa K, Yasuda T, Shiraishi C, Fujiwara K, Mochizuki H, Yoshikawa K: Necdin promotes mitochondrial biogenesis to prevent neurodegeneration in experimental Parkinson's disease, Neuroscience 2015, 2015年10月21日, McCormick Place (Chicago, USA)

吉川 和明, 長谷川 孝一, 安田 徹, 望月 秀樹: Promotion of neuronal mitochondrial biogenesis by necdin: Neuroprotection in experimental parkinsonism シンポジウム; Cutting-edge research of Parkinson's disease, 第38回日本神経科学学会大会, 2015年7月29日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

長谷川 孝一, 安田 徹, 白石 千夏, 藤原 一志郎, 望月 秀樹, 吉川 和明: Necdinによるニューロン内ミトコンドリア機能の促進: パーキンソン病モデルにおける神経保護作用, 第57回日本神経化学学会大会, 2014年9月30日, 奈良県文化会館(奈良県奈良市)

長谷川 孝一, 白石 千夏, 藤原 一志郎, 吉川 和明: NecdinによるPGC-1を介したニューロン内ミトコンドリア機能の促進, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

長谷川 孝一, 白石 千夏, 藤原 一志郎,
吉川 和明: Necdin による PGC-1 の安定化を
介したニューロン内ミトコンドリア生合成の
促進, 第 56 回日本神経化学会大会 2013 年 6
月 22 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉川 和明 (YOSHIKAWA, Kazuaki)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号 : 30094452

(2)研究分担者

長谷川 孝一 (HASEGAWA, Koichi)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号 : 20546783

藤原 一志郎 (FUJIWARA, Kazushiro)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号 : 80638495
(平成 25 年度から分担者として参画)

(3)連携研究者

中村 春木 (NAKAMURA, Haruki)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号 : 80134485

望月 秀樹 (MOCHIZUKI, Hideki)
大阪大学・医学部・教授
研究者番号 : 90230044