

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670038

研究課題名(和文) 神経細胞の機能制御におけるミトコンドリア融合阻害の意義

研究課題名(英文) Functional analyses of mitochondrial fusion inhibition in the regulation of neuronal cells

研究代表者

新谷 紀人 (SHINTANI, NORIHITO)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10335367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、神経変性疾患の新たな創薬標的として、ミトコンドリアの融合・分裂に注目が集まっている。本研究では、ミトコンドリアの融合を阻害する新規因子：mitochondrial fusion inhibitor(MIFI)の神経細胞の発達/細胞死制御における機能解析を実施した。本研究の結果、MIFIが神経発達の初期過程から機能する可能性や、酸化ストレスと深い関連を示すこと、また神経芽細胞腫SH-SY5Yの障害に対して促進的に働くことが示された。さらに、MIFI発現調節化合物やMIFIの遺伝子欠損マウスなど、MIFIの機能解明に必須となる研究ツールの開発が達成された。

研究成果の概要(英文)：Recently, much attention has been gathered on the mitochondrial fusion and division machinery as a novel drug targets for neurodegenerative diseases. In this study, we performed functional analyses of the novel factor MIFI (mitochondrial fusion inhibitor) in the neuronal development and cell death. The obtained results suggested that MIFI functions in the neuronal cells possibly from early development, is associated with oxidative stress status, and shows stimulatory effects in the insult-induced cell death of neuroblastoma SH-SY5Y cells. In addition, this study developed essential research tools for the further functional analyses of MIFI, such as chemical compounds regulating MIFI expression and mice lacking MIFI.

研究分野：分子薬理学

キーワード：ミトコンドリア 脳・神経 細胞死 酸化ストレス 細胞分化 発現制御 化合物スクリーニング ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの融合・分裂の生理病態的意義やその制御分子群に関する研究が急速に進む昨今、代表者らは、その融合を「阻害」する分子量 13kDa の新規因子を同定した(本報告書では p13 あるいは mitochondria fusion inhibitor (MIFI)と略称)。またごく最近、MIFI はその融合阻害作用を介してミトコンドリアを断片化させる作用や、機能低下したミトコンドリアの廃棄作用を持つ可能性を見出した。一方で、ミトコンドリアの断片化や機能低下したミトコンドリアで産生される活性酸素種は種々の神経変性疾患の分子病態と認識されており、これらの改善が新たな創薬標的になると期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、多様な研究アプローチによって神経系における MIFI の機能解析を迅速に推進し、神経細胞の発達/細胞死制御におけるミトコンドリアの融合阻害の意義を解明するとともに、神経変性疾患領域における MIFI の創薬標的化を目指して実施した。

3. 研究の方法

大阪大学組換え DNA 実験委員会・動物実験委員会で承認された計画に従って実施した。

(1)生細胞イメージング： MIFI の C 末端にアミノ酸 6 残基からなるテトラシステイン (TC) タグを融合させた蛋白 (MIFI-TC) を作成し、HeLa 細胞に過剰発現させた MIFI-TC を FIAsh 試薬で標識すると共に、膜電位依存的にミトコンドリアに取り込まれる蛍光指示薬 TMRE 等で共染色を行い、観察を行った。

(2)神経分化モデル： マトリゲルを用いた ES 細胞からの *in vitro* 神経分化モデル (Shimada et al. 2012) と胎生 8 日から生後 4 日までのマウス脳サンプルを用い、各種マーカーと MIFI の mRNA 発現変化を解析した。

(3)神経細胞死モデル： 主にドパミン神経由来の神経芽細胞株である SH-SY5Y 細胞を用い、ドパミン神経毒である rotenone の添加によって惹起される神経細胞死、ならびにミトコンドリア機能変化(膜電位の低下や活性酸素種(ROS)の蓄積)に対する MIFI の過剰発現とノックダウンの影響を解析した。

(4)化合物スクリーニング： ルシフェラーゼのレポーターシステムを用い、マウス/ヒト MIFI 遺伝子のプロモーター領域の解析と、MIFI 発現調節化合物のスクリーニング系の構築を行った。また The Spectrum Collection (MicroSource Discovery Systems) に収載された化合物が、ルシフェラーゼ発現、MIFI 等の mRNA 発現、細胞内の ROS 蓄積量に及ぼす効果を評価した。さらに MIFI の発現誘導機構についても若干の検討を加えた。

(5)遺伝子欠損マウスの作製： CRISPR-Cas9 システムを用いた。 *In vitro* でゲノム編集の効果を確認後、同オリゴ DNA を受精卵にインジェクションして作製した。

4. 研究成果

(1)MIFI のミトコンドリアにおける機能

ミトコンドリアの動態： MIFI-TC 過剰発現細胞の短時間イメージングの結果、全ての細胞で、MIFI は一定量のミトコンドリアにクラスター状に局在することが示された。一方で一定数の細胞は、MIFI を過剰発現しているにも関わらず、ミトコンドリアは断片化していない像を示した。このことから、MIFI は同分子によるミトコンドリアの断片化作用に先立ち、まず糸状のミトコンドリア内でクラスタリング(集積)する可能性が示された。なお同細胞のリアルタイム観察から、MIFI 過剰発現細胞内のミトコンドリアは、MIFI が集積する部分で融合が阻害されることが確認された(学会発表)。また SH-SY5Y 細胞や初代培養アストログリア細胞を用いた検討から、MIFI の過剰発現はミトコンドリアの断片化を普遍的に誘導することも確認した。

ミトコンドリアの廃棄： MIFI-TC 過剰発現細胞の長時間イメージングの結果、MIFI と TMRE の共局在は、時間経過とともに低下していくことが明らかになった。しかし MIFI のシグナルは、どの時間においても他のミトコンドリアマーカーとは共局在を示した(細胞を固定した後の検討)。これらの結果から、ひとつの可能性として、MIFI は膜電位が低下したミトコンドリアに継時的かつ選択的に集積されていくことが示された。一方でミトコンドリアの廃棄と関連する LC3 蛋白の発現変化を評価したところ、ミトコンドリア電子伝達系の脱共役剤 CCCP による LC3 蛋白の変化が MIFI のノックダウンで阻害されることを見出した。このことから MIFI はミトコンドリアの廃棄に促進的に関与する可能性が示された(学会発表)。

(2) MIFI の神経機能制御における役割

神経分化： 今回用いた *in vitro* モデルでは、16 日の培養期間で神経幹細胞マーカー nestin と神経細胞マーカー MAP2 が順番に発現増加を示し、その増加(神経分化)が Noggin の添加で増強される。本系において、MIFI は nestin 誘導と同時期の培養 8 日目から増加し 16 日目まで高い発現を示したが、誘導の強度は Noggin の影響を受けなかった。一方マウス脳における検討では、やはり nestin と同じ胎生 10 日から増加を示したが、以降は MAP2 の発現変化と同様に胎生 18 日をピークとする緩やかな変化を示し、胎生 18 日以降生後 4 日まで増加し続けるグリア細胞マーカー GFAP とは異なる挙動を示した。本結果から、MIFI は神経分化(および個体発生)の初期過程から、主に神経細胞で機能を発現する可能性が示された。

神経細胞死： まず rotenone は SH-SY5Y 細胞の MIFI mRNA 発現は用量依存的に減少することを見出した。また rotenone によるミトコンドリア膜電位の低下は、MIFI の過剰発現で増強される一方、ノックダウンでは抑制されることも見出した。なお細胞死や ROS の蓄

積についても、MIFI の過剰発現で増強が認められるなど、同様の傾向を認めた。以上の結果から、少なくとも rotenone による本細胞の細胞障害/ミトコンドリア機能障害に関しては、MIFI は増悪的に関与することが示された(学会発表)。しかしこの成果と並行し、HeLa 細胞や *in vivo* の臍 細胞では、酸化ストレスに対して MIFI が保護的に働くことを示す知見を得た(論文、学会発表)。これらの違いが、細胞種や細胞が置かれる環境に依存するのかどうか等については、今後詳細な解析を進める必要があると考える。

(3) MIFI の分子薬理学的研究ツールの確立

本研究では MIFI mRNA の発現を調節する 16 種の化合物、および MIFI の発現増加に選択制を有する化合物 1 種を同定すると共に、MIFI の遺伝子欠損マウスを作製した(本研究の終了時点でヘテロ接合体, 5 週齢)。以下には前者の研究について詳細を記載する。

プロモーター領域の解析: MIFI 遺伝子について、ヒトとマウスとの間で高い相同性を示す領域(約 1kb)を単離し、まずその定常状態での活性を評価した。その結果、ヒト MIFI 遺伝子の -796 ~ 0 に相当する領域が、SH-SY5Y 細胞や HeLa 細胞で有意な転写活性を示すことや、ミトコンドリアを増殖させる PGC1 の共発現で転写活性が著しく亢進することを見出した。すなわち PGC1 を陽性対照とすることで、これらの細胞を用いて MIFI 発現の調節化合物がスクリーニングできることが示された(学会発表)。

化合物の選抜: 本系を用いて作用が既知の化合物 2,320 種を評価した結果、80 種がルシフェラーゼ活性(転写活性)を、そのうち 16 種が mRNA 発現を変化させることを見出した(学会発表)。また転写活性と mRNA 発現の両方を低下させる 5 種の化合物のうち 4 種は強心配糖体であり、いずれも細胞内の ROS 蓄積量を有意に増加させた。これらの結果から、MIFI の発現低下と心機能・酸化ストレスとの強い連関が示唆された。

メカニズムの解析: MIFI 発現を増加させる化合物 11 種のうち 5 種は、DRP1, FIs1, Opa1, Mfn1, Mfn2 など他のミトコンドリア動態制御因子の mRNA 発現も増加させること、またこのような協調的発現変化は心病態のモデル動物の心臓においても認められることを見出し(学会発表)、MIFI の発現調節が他の因子と類似の機構で制御される可能性を示した。なお MIFI 選択的な発現増加作用を示す化合物を 1 種同定し、他の化合物を用いた検討から、その機構に dual specificity tyrosine-phosphorylated-regulated kinase 1a (DYRK1a) が関与する可能性を見出した。

(4)その他

本研究の実施期間中、研究代表者は日本学術振興会 頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラム(2014年9月~)の援助により、イタリア・パドヴァ大学に滞在する機会を得た(論文)。本研究は同プロ

グラムの研究テーマと並行して日本で実施したものであり、一部の成果はパドヴァ大学との国際共同研究として得たものである。

[総括と展望]

本研究により、MIFI は神経分化の初期過程から主に神経細胞で機能する可能性や、酸化ストレスと深い関連を示すこと、また少なくとも SH-SY5Y 細胞の障害に対しては促進的に働くことが明らかになった。さらに、これらのメカニズム解明に重要な分子薬理学的ツールの構築が達成された。以上の成果を基盤とし、今後、神経変性疾患領域における MIFI の創薬標的化研究が大きく加速するものと考えている。

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2件)

Higashi S*, Katagi K*, Shintani N*, Ikeda K, Sugimoto Y, Tsuchiya S, Inoue N, Tanaka S, Koumoto M, Kasai A, Nakazawa T, Hayata-Takano A, Hamagami K, Tomimoto S, Yoshida T, Ohkubo T, Nagayasu K, Ago Y, Onaka Y, Hashimoto R, Ichikawa A, Baba A, Hashimoto H. p13 overexpression in pancreatic β -cells ameliorates type 2 diabetes in high-fat-fed mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 2015; 461(4):612-617. (*Equally contributed to this work)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.074.

新谷 紀人, イタリアへのミトコンドリア留学, 神経化学, 査読無, 2015, 54: 29-32.

[学会発表](計11件)

新谷 紀人 他, ミトコンドリアの断片化促進因子 p13 による神経機能制御, 第 46 回日本神経精神薬理学会年会, 2015 年 7 月 2-3 日(発表確定), ソウル(韓国)

Inoue, N. et al., Functional role of a novel protein inhibiting mitochondrial fusion, 第 89 回日本薬理学会年会(シンポジウム), 2016 年 3 月 27-30 日, 熊本大学(熊本県)

Shintani, N. et al., Protective role of p13, a protein stimulating mitochondrial fragmentation, in pancreatic β -cells under type 2 diabetes. FASEB Science Research Conferences, 2015 年 5 月 17-22 日, パームビーチ(アメリカ)

新谷 紀人 他, 糖尿病臍島で発現減少する新規遺伝子 ミトコンドリア研究への招待, 日本薬学会第 135 年会(シンポジウム), 2015 年 3 月 27 日, 神戸学院大学(兵庫県)

Shintani, N. et al., Mitophagy and inhibition of mitochondrial fusion, Venetian Institute of Molecular Medicine

13th Annual Retreat, 2015年6月6-7日, トレビソ(イタリア)

Inoue, N. et al., Mitochondrial inner-membrane fusion inhibitor (MIFI) stimulates CCCP-induced mitophagy, 第134年回日本薬学会年会, 2014年3月27-30日, 熊本大学(熊本県)

田中 翔大 他, ミトコンドリア融合阻害因子 MIFI による心病態の増悪機序に関する解析 : 遺伝子発現プロファイル解析, 第125回日本薬理学会近畿部会, 2014年6月20日, 岡山コンベンションセンター(岡山県)

廣内 大成 他, ミトコンドリア融合抑制因子 MIFI の転写を調節する化合物の探索, 学会等名次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2014, 2014年8月30日, 近畿大学(大阪府)

Inoue N. et al. Live-imaging analysis on the intramitochondrial dynamics of mitochondrial inner-membrane fusion inhibitor (MIFI), ISCOMS 2014, 2014年6月20日, グローニンゲン(オランダ)

ライブイメージングによるミトコンドリア形態制御因子 MIFI の作用機序解析
著者名/発表者名井上 直紀 他, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2013, 熊本大学(熊本県)

東 信太郎 他, 新規ミトコンドリア融合阻害因子 MIFI の腓 細胞特異的過剰発現マウスを用いた生理・病態機能解析, 第123回日本薬理学会近畿部会, 2013年7月12日, ウィンク愛知(愛知県)

〔その他〕

ホームページ等(関連する研究、頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラムに関する内容)

<http://molpharm.umin.jp/program.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 紀人 (SHINTANI NORIHITO)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号 : 10335367

(2) 研究分担者

笠井 淳司 (KASAI ATSUSHI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号 : 40454649

馬場 明道 (BABA AKEMICHI)
兵庫医療大学・学長
研究者番号 : 70107100