

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860252

研究課題名(和文) 神経変性疾患における小胞体・ミトコンドリア膜間領域の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Disruption of mitochondria-associated membrane in neurodegenerative disease

研究代表者

渡邊 征爾(Watanabe, Seiji)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：70633577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たに若年発症型の家族性ALSの原因となるL95fsの変異を 1受容体(Sig1R)に見出した。変異Sig1Rは細胞内で極めて不安定で、本来の結合相手であるイノシトール3リン酸受容体3型(IP3R3)とも結合できなかった。Sig1Rを欠損した変異SOD1-ALSモデルマウスを作製したところ、このマウスでは顕著な発症時期の早期化を認めた。さらに、変異SOD1の発現、Sig1Rの欠損のどちらにおいてもMAMは構造的に破綻し、Ca²⁺恒常性の破綻を介して神経細胞死を引き起こしていた。以上の結果から、MAMの破綻は孤発性も含めた幅広いALSに関して普遍的な現象であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified a homozygous p.L95fs mutation of Sigma 1 receptor (Sig1R) as a novel cause of ALS16. ALS linked Sig1R variants were unstable and incapable of binding to inositol 1,4,5 triphosphate receptor type 3 (IP3R3). The onset of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mediated ALS disease in mice was accelerated when Sig1R was deficient. Moreover, either deficiency of Sig1R or accumulation of mutant SOD1 induced MAM disruption, resulting in mislocalization of IP3R3 from the MAM, calpain activation, and mitochondrial dysfunction. Our findings indicate that a loss of Sig1R function is causative for ALS16, and collapse of the MAM is a common pathomechanism in both Sig1R and SOD1 linked ALS. Furthermore, our discovery of the selective enrichment of IP3R3 in motor neurons suggests that integrity of the MAM is crucial for the selective vulnerability in ALS.

研究分野：病態神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 小胞体・ミトコンドリア膜間領域 SOD1 1受容体

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動神経細胞が選択的に変性する神経難病である。運動神経細胞の変性には、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官(オルガネラ)の不調が関与することが報告されてきたが、その詳しいメカニズムについては不明であった。そこで本研究では、ALSにおけるオルガネラ不調の原因として、小胞体・ミトコンドリア膜間領域(MAM)と呼ばれる、小胞体とミトコンドリアの膜が近接する領域に着目した。近年の研究から、MAMには脂質やイオンの受け渡しやタンパク質分解などに関わるオルガネラの恒常性を維持するために重要な分子が集積していることが報告されており、MAMの不調は則ち小胞体とミトコンドリア、両者の機能不全を同時に引き起こすことが想定された。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究ではALSにおけるMAMの機能不全の全容を明らかにし、神経変性疾患におけるMAMの破綻の意義について検討を行った。

3. 研究の方法

まず、MAM特異的タンパク質であり、家族性ALS原因遺伝子の産物でもある1受容体(Sig1R)について、同定された患者由来の変異をもつSig1Rを発現するプラスミドをマウス神経系培養細胞Neuro2aに導入し、細胞内における変異型タンパク質の安定性と機能について評価した。また、ALSモデルマウスとして確立している変異SOD1マウス(SOD1^{G85R}tgマウス)とSig1R欠損マウス(Sigmar1-KOマウス)を交配して、Sig1Rを欠損した変異SOD1マウス(SOD1^{G85R}tg/Sigmar1-KOマウス)を作製して、生存期間、運動機能の経時的な変化を観察した。更に、それらマウスの脊髄や脳について、免疫組織化学染色や生化学的なMAMの単離によってMAM特異的タンパク質の局在を観察したほか、電子顕微鏡によりMAMの直接的な観察も実施してALS病態におけるMAMの変化を総合的に検討した。

4. 研究成果

国際共同研究により、若年発症型家族性ALS(ALS16)の原因となるSIGMAR1遺伝子上の新規変異c.259dupC/p.L95fsを同定した(図1A)。これまでに報告のあった変異p.E102Qと同様、常染色体劣性の遺伝様式を示し、患者は緩徐進行性の運動機能障害を示した。このALS16の発症機序を明らかにするため、Neuro2a細胞に野生型あるいは変異型(L95fs, E102Q)のSig1Rを発現させたと

る、変異型はいずれも極めて不安定でプロテアソームにより恒常的に分解されることが判明した(図1B)。更に、変異型のSig1Rは細胞内のカルシウムイオン(Ca²⁺)チャネルであるイノシトール三リン酸受容体3型(IP₃R3)との結合能を喪失しており、実際にCa²⁺のミトコンドリアへの流量を制御できなかった。以上のことから、ALS16はSig1Rの機能喪失が原因でALSを発症することが明らかとなった。

次にALS病態にSig1Rの機能喪失が与える影響を解析するため、SOD1^{G85R}tg/Sigmar1-KOマウスを作製したところ、このマウスでは発症時期が野生型と比較して20%以上、早期化し、これに伴って生存期間も短縮した(図2)。このことから、MAMにおけるSig1Rの機能不全はALS16以外のALSにも関与していることが示唆された。

そこで、ALSモデルとして確立している変異SOD1マウスの脊髄および脳からMAMを生化学的に分画したところ、疾患の進行に伴って変異SOD1のMAMへの蓄積が見られた。興味深いことに、肝臓もしくは初代培養アストロサイトでは、ほとんど変異SOD1のMAMへの蓄積を認めなかったことから、この現象は病巣の神経細胞に特異的であることが考えられた。更に、変異SOD1マウス、Sig1R-KOマウスの脊髄運動神経細胞を学内共同研究により電子顕微鏡で観察した結果、両者で共通してMAMの構造が崩壊しており(図3)、それに伴って本来はMAM特異的であるIP₃R3の局在異常が生じることが明らかとなった。IP₃R3の局在異常は細胞質への無秩序なCa²⁺放出とミトコンドリアのATP合成能の低下を伴って、神経細胞傷害性に作用したことから、MAMの崩壊に伴うCa²⁺恒常性の破綻が2つのマウスに共通した病態であると考えられた。

本研究から、変異SOD1に伴うALSおよびSig1Rの機能喪失に伴うALSで共通してMAMの崩壊が見出されたことから、MAMの機能破綻はALS病態において普遍的な現象であることが示唆された。今後、引き続き、他のALS原因遺伝子がMAMに与える影響の検討やMAMの維持を標的とした薬剤の探索を進めることで孤発性も含めた幅広いALSに対する治療法の開発が可能になると期待される。

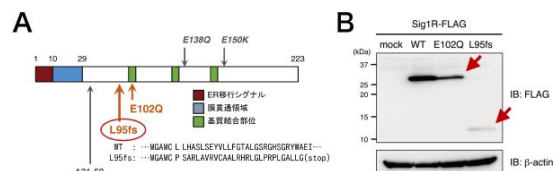


図1 ALS関連Sig1R変異体の解析. (A)本研究で新規に疾患関連変異として同定したc.259dupC/p.L95fs変異. 先行研究におけるE102Q変異と、黒字は遠位性遺伝性運動ニューロパチーの既報告変異を示す. (B) ALS関連Sig1R変異体は細胞内で極めて不安定で易

分解性である。野生型または変異型 Sig1R をそれぞれ強制発現させた Neuro2a 細胞の破砕物をウエスタンブロッティングで検討した。

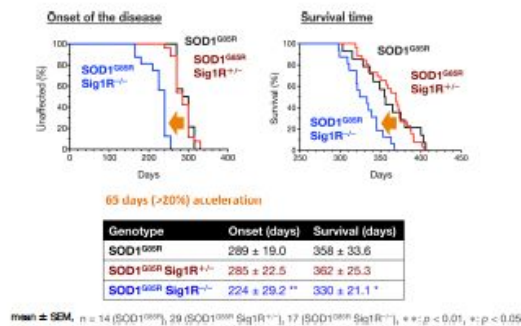


図 2 SOD1G85Rtg/Sigmar1-KO マウスの生存解析。 発症時期（体重が減り始めた時点）と生存期間について、各遺伝子型間で比較した。Sig1R 欠損に関して、ALS16 の常染色体劣性遺伝様式と一致して、ヘテロ欠損では影響が無く、ホモ欠損でのみ顕著な発症時期の早期化が観察された。

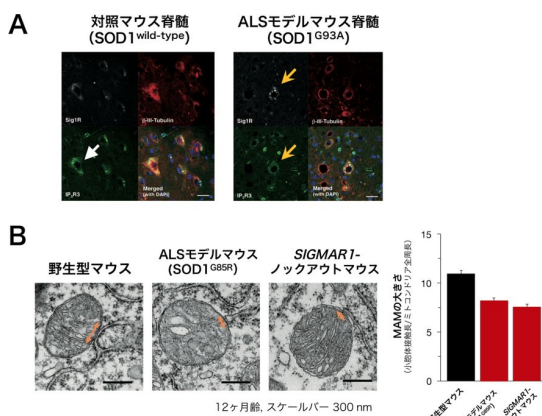


図 3 MAM の構造的破綻が SOD1, SIGMAR1 の各家族性 ALS で共通した病態である。 (A) 免疫組織化学染色により、MAM 特異的タンパク質である Sig1R と IP₃R3 の局在を解析した。矢印で示すように ALS 病態では Sig1R の凝集と IP₃R3 の局在異常が見られた。(B) 電子顕微鏡による MAM の構造観察。ALS モデルである SOD1^{G85R}tg マウスでも、Sigmar1-KO マウスでも共通して MAM の領域（両端矢印）が減少していた。

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)

Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, Nomura H, Komine O, Endo F, Jin S, Mancias P, Kiyama H, Yamanaka K "Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS." *EMBO Molecular*

Medicine 査読有 8 2016 1421. doi:10.15252/emmm.201606403

Tokuda E, Anzai I, Nomura T, Toichi K, Watanabe M, Ohara S, Watanabe S, Yamanaka K, Morisaki Y, Misawa H, Furukawa Y "Immunological characterization on pathological oligomers of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis." *Molecular Neurodegeneration* 査読有 12 2017 2. doi:10.1186/s13024-016-0145-9

Lasiene J, Komine O, Fujimori-Tonou N, Powers B, Endo F, Watanabe S, Shijie J, Ravits J, Horner P, Misawa H, Yamanaka K "Neuregulin-1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons." *Acta Neuropathologica Communications* 査読有 4 2016 15. doi:10.1186/240478-016-0286-7

Chhangani D, Endo F, Amanullah A, Upadhyay A, Watanabe S, Mishra R, Yamanaka K, Mishra A "Mahogunin ring finger 1 confers cytoprotection against mutant SOD1 aggregates and is defective in an ALS mouse model." *Neurobiology of Disease* 査読有 86 2015 16. doi:10.1016/j.nbd.2015.11.017

Endo F, Komine O, Fujimori-Tonou N, Katsuno M, Jin S, Watanabe S, Sobue G, Dezawa M, Wyss-Coray T, Yamanaka K "Astrocyte-derived TGF-1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T-cells." *Cell Reports* 査読有 11 2015 592-604. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.053

Watanabe S, Hayakawa T, Wakasugi K, Yamanaka K "Cystatin C protects neuronal cells against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity." *Cell Death & Disease* 査読有 5 2014 e1497. doi:10.1038/cddis.2014.459

Watanabe S, Ageta-Ishihara N, Nagatsu S, Takao K, Komine O, Endo F, Miyakawa T, Misawa H, Takahashi R, Kinoshita M, Yamanaka K "SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis." *Molecular Brain* 査読有 7 2014 62. doi:10.1186/s13041-014-0062-1

Austin JA, Wright GS, Watanabe S, Grossmann JG, Antonyuk SV, Yamanaka K, Hasnain SS "Disease causing mutants of

TDP-43 nucleic acid binding proteins are resistant to aggregation and have increased stability and half-life." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 査読有 111 2014 4309-4314. doi:10.1073/pnas.1317317111

Takahashi N, Watanabe S, Wakasugi K "Crucial roles of glu60 in human neuroglobin as a guanine nucleotide dissociation inhibitor and neuroprotective agent." *PLOS ONE* 査読有 8 2013 e83698

[学会発表](計 15 件)

渡邊征爾 "ALSにおける小胞体・ミトコンドリア膜間領域の破綻" 第39回日本史系科学大会 2016.07.20 パシフィコ横浜

Watanabe S, Yamanaka K "Disruption of mitochondria-associated membrane in amyotrophic lateral sclerosis." 第6回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科合同シンポジウム 2016.09.24 名古屋大学鶴舞キャンパス

Komine O, Lasienne J, Fujimori-Tonou N, Powers B, Endo F, Watanabe S, Shijie J, Ravits J, Horner P, Misawa H, Yamanaka K "Neuregulin-1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons." 27th International Symposium on ALS/MND 2016.12.07-2016.12.09 アイルランド, ダブリン

Watanabe S, Yamanaka K "Disruption of mitochondria-associated membrane is a common pathomechanism both in SOD1- and SIGMAR1-linked ALS." 27th International Symposium on ALS/MND 2016.12.07-2016.12.09 アイルランド, ダブリン

Tokuda E, Anzai I, Nomura T, Ohara S, Watanabe S, Yamanaka K, Morisaki Y, Misawa H, Furukawa Y "In vivo and in vitro characterization of SOD1 in early stages of ALS as a precursor to insoluble aggregates." 27th International Symposium on ALS/MND 2016.12.07-2016.12.09 アイルランド, ダブリン

Watanabe S, Yamanaka K "Calcium deregulation at mitochondria-associated membrane is important for motor neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis." BMB2015 2015.12.01-2015.12.04 神戸ポートアイラ

ンド

遠藤史人, 小峯起, 金世杰, 渡邊征爾, 山中宏二 "アストロサイト由来 TGF- β 1はALSの疾患進行を促進する." 第27回神経免疫学会学術集会 2015.09.15-2015.09.16 長良川国際会議場

渡邊征爾, 山中宏二 "Sigma 1 receptor deficiency is involved in motor neuronal degeneration through calcium deregulation at mitochondria-associated membrane." 第58回神経化学学会大会 2015.09.11-2015.09.13 大宮ソニックシティ

山中宏二, 遠藤史人, 小峯起, 金世杰, 渡邊征爾 "Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T-cells." 第58回神経化学学会大会 2015.09.11-2015.09.13 大宮ソニックシティ

Chhangani D, Endo F, Amanullah A, Upadhyay A, Watanabe S, Mishra R, Yamanaka K, Mishra A "Mahogunin ring finger 1 confers cytoprotection against mutant SOD1 aggregates and is defective in an ALS mice." 26th International Symposium on ALS/MND 2015.12.11-2015.12.13 アメリカ, オランダ

小峯起, 山下博史, 藤森典子, 森脇康博, 遠藤史人, 渡邊征爾, 金世杰, 三澤日出巳, 山中宏二 "The role of innate immune TRIF pathway in amyotrophic lateral sclerosis." 第5回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム 2015.09.19 生理学研究所

Watanabe S, Wakasugi K, Yamanaka K "Coordinated activation of autophagy and cathepsin-mediated proteolysis inhibition is essential for neuroprotection by cystatin C against mutant SOD1-mediated toxicity." 25th International Symposium on ALS/MND 2014.12.05-2014.12.07 ベルギー, ブリュッセル

渡邊征爾, 若杉桂輔, 山中宏二 "変異 SOD1由来の毒性に対するシスタチンCの神経保護機構の解明" 第37回日本神経科学大会 2014.09.11-2014.09.13 パシフィコ横浜

Watanabe S, Wakasugi K, Yamanaka K "Cystatin C protected neuronal cells against copper-zinc superoxide

dismutase-mediated toxicity *in vitro*.” 24th International Symposium on ALS/MND 2013.12.06-2013.12.08 イタリア, ミラノ

渡邊征爾, 山中宏二 “変異スーパーオキシドジスムターゼ 1(SOD1)は SOD1^{G93A} マウスにおいて小胞体・ミトコンドリア膜間領域に蓄積する” Neuro2013 2013.06.20-2013.06.23 京都国際会館

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
名古屋大学プレスリリース「小胞体とミトコンドリア接触部の崩壊が神経難病 ALS の発症の鍵となる」2016.11.8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 征爾 (WATANABE, Seiji)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号：70633577

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山中 宏二 (YAMANAKA, Koji)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号：80446533

(4) 研究協力者

()