

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870921

研究課題名(和文) 神経変性疾患におけるシナプスのミトコンドリアタンパク質低下の新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mismetabolism of mitochondrial proteins in a Drosophila model of neurodegenerative disorder.

研究代表者

関谷 倫子 (SEKIYA, Michiko)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・アルツハイマー病研究部・研究員

研究者番号：40367412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シナプスでのミトコンドリア機能障害は、アルツハイマー病(AD)を含む多くの神経変性疾患において、神経失調・変性の引き金になると考えられている。ADモデルショウジョウバエでは、モデルタンパク質として発現させたミトコンドリア移行GFPタンパク質(mito-GFP)が、神経細胞体では凝集体様構造として観察され、シナプスでは量の低下が認められる。これと同じ現象は、成虫の神経細胞でオートファジーを亢進した場合にのみ観察された。このことから、ADモデルショウジョウバエのミトコンドリアで、初期に認められるシナプスのミトコンドリアタンパク質の減少には、オートファジーの亢進が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using a Drosophila model of Alzheimer's disease (AD), I found that the reductions in mito-GFP signals in the synapses were not due to either morphological alterations, damages, or altered number of mitochondria. Rather, the results indicate that reduced mito-GFP signals in the synapses is due to reductions in the stability of mitochondrial proteins and/or the delivery of mitochondrial proteins to mitochondria in the cell body. I further demonstrate that that autophagy is upregulated in AD fly neurons, and forced induction of autophagy is sufficient to reduce mito-GFP signals in the synapses similar to that observed in the AD fly model. This study reveals a potential mechanism initiating mitochondrial abnormality in the synapses in the neurodegenerative conditions such as AD and sustained induction of autophagy is involved in this process.

研究分野：神経科学，薬効薬理学

キーワード：アルツハイマー病 ミトコンドリア ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

シグナル伝達などの神経活動の要であるシナプスのミトコンドリアは、神経活動の維持に必須であり、その異常は神経変性疾患の発症に深く関与している。アルツハイマー病 (AD) を始めとする種々の神経変性疾患では、シナプスのミトコンドリアの機能低下が報告されており、それが神経失調や神経変性の原因になると考えられる。従って、シナプスのミトコンドリアの機能が低下するメカニズムの詳細を明らかにし、それと神経変性とのつながりを明らかにすることは、神経変性疾患発症メカニズムの解明ならびに治療薬ターゲットの同定に貢献すると考えられる。

申請者の所属する飯島研究室では、アルツハイマー病の病因に関係する、ヒトアミロイド 842 タンパク質 (A β 42) を発現させたショウジョウバエを AD モデルとして確立し (Iijima K et al., PNAS, 2004), A β 42 によって引き起こされる神経変性の分子メカニズムについて精力的に研究を進めてきた。申請者は、神経変性疾患におけるシナプスのミトコンドリア機能に関する研究を行っており、シナプスのミトコンドリア機能低下が神経変性に寄与することを報告している (Sekiya M et al., PLoS Genetics, 2012)。また、AD モデルショウジョウバエの神経細胞において、モデルタンパク質としてミトコンドリア標的 GFP タンパク質 (mito-GFP) を発現させたところ、神経失調や神経変性が起こる前に、シナプスでの mito-GFP の蛍光強度が有意に低下することも報告している (Iijima-Ando et al., PLoS ONE, 2009)。申請者はこの原因として、1) シナプスにおけるミトコンドリア数の減少、ダメージ、また、2) mito-GFP のタンパク質量の低下、の 2 つの可能性を考えた。

まず、この時期にミトコンドリア数の減少や形態の変化が見られるかを検証するため、シナプスのミトコンドリアの変化を電顕により観察し定量・解析を行った。その結果、シナプスのミトコンドリアに顕著なダメージは認められず、数、サイズともに減少は認められなかった。従って、これらの変化が mito-GFP 蛍光強度低下の原因では無いと考えられた。

次に、2) の可能性を検討するために、ミトコンドリアタンパク質量の低下をウエスタンブロット法により検証したところ、AD モデルショウジョウバエでは、mito-GFP が有意に減少していることを見いだした。さらに、内在性のミトコンドリアタンパク質、hsp60, Mn-SOD, VDAC 全てが有意に減少していることを見いだした。従って、シナプスでの mito-GFP の蛍光強度が低下する原因として、ミトコンドリアタンパク質量の低

下が考えられた。一方で、興味深いことに、細胞体においては、mito-GFP のシグナルが凝集体様の構造を形成することを見いだした。電顕解析の結果、この凝集体様構造はミトコンドリアの凝集や形態の変化によるものではないことから、mito-GFP タンパク質の凝集によるものと考えられた。この mito-GFP の凝集体様構造の生理学的意義は明らかでなく、シナプスでの mito-GFP シグナルの低下、またミトコンドリアタンパク質量の低下にどのように関与しているのかも不明である。

2. 研究の目的

本研究では、AD モデルショウジョウバエと遺伝学的手法を駆使し、神経変性疾患において、シナプスでのミトコンドリア内のタンパク質量が減少する原因を明らかにする。

具体的には、1) AD モデルショウジョウバエの神経細胞体において形成される mito-GFP の凝集体様構造と、ミトコンドリアタンパク質低下との関係性を明らかにする。2) AD を始めとした神経変性疾患で報告されている、オートファジーの亢進、小胞体ストレスの亢進、シャペロンタンパク質の発現変化に着目し、これらが mito-GFP の凝集体様構造の形成とシナプスのミトコンドリアタンパク質低下に与える影響について明らかにする。

3. 研究の方法

神経細胞で mito-GFP を発現するショウジョウバエと、AD モデルショウジョウバエ、各種 RNAi 系統や過剰発現系統を交配し、Gene-Switch システムにより神経細胞で成虫期特異的にタンパク発現あるいは RNAi 発現を誘導した。タンパク誘導後、経時的にショウジョウバエ脳を採取し、共焦点レーザー顕微鏡にて mito-GFP の観察を行った。

4. 研究成果

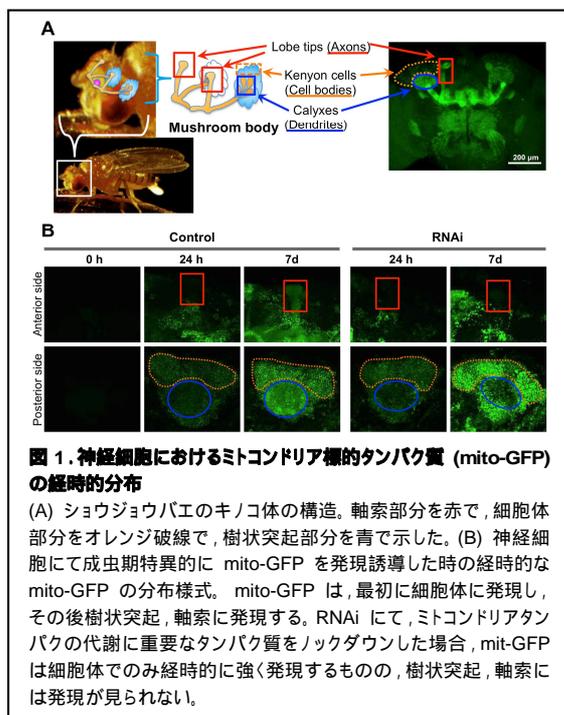
1) ショウジョウバエのキノコ体は、約 5,000 の神経細胞が束状にまとまった構造をしているため、神経細胞体、軸索、突起部分をキノコ体的一部分として容易に見分ける事が出来る (図 1. A)。この構造を利用し、ショウジョウバエ脳の神経細胞におけるミトコンドリアタンパク質の動態を観察した。ミトコンドリアタンパク質のモデルタンパクとして、ミトコンドリア標的 GFP (mito-GFP) を利用した。

アルツハイマー病モデルショウジョウバエ (AD モデル) では、コントロールのショウジョウバエと比べて、神経の細胞体部分で mito-GFP の蛍光強度が増加し、軸索や突起 (シナプス) 部分では蛍光強度が低下する。し

かしながら、軸索や突起部分におけるミトコンドリアの数には減少が見られないことから、ミトコンドリアに標的されたミトコンドリアタンパク質が、シナプス部分で減少していると考えられた。

図 1. B に示すように、ミトコンドリア標的タンパク質の経時的な観察を行うと、mito-GFP はまず細胞体で発現し、その後突起や軸索で発現が認められる。一般的に、ミトコンドリア標的タンパク質は、細胞体でミトコンドリアへ移行し、そのミトコンドリアが軸索や突起へ輸送されると考えられている。今回の結果は、最初に細胞体部分で mito-GFP が発現誘導され、時間の経過とともにミトコンドリアに移行した mito-GFP がミトコンドリアとともに軸索や突起に輸送される様子を示していると考えられる。

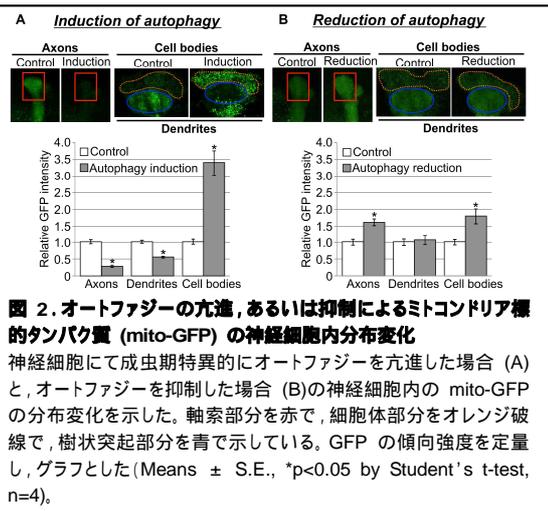
それに対して、ミトコンドリアの恒常性維持に重要なタンパク質を RNAi にてノックダウンすると、mito-GFP は細胞体で発現誘導されるものの、その後、軸索、突起での mito-GFP の発現は認められなかった (図 1. B, RNAi)。



mito-GFP の挙動は、AD モデルで観察される “神経細胞体部分での mito-GFP の蛍光強度増加および軸索や突起部分での蛍光強度低下” と大変類似している。AD モデルでは、軸索や突起部分においてミトコンドリアの数の減少が認められないことから、ミトコンドリア標的タンパク質のミトコンドリアへの移行が低下していると考察した。

次に、何がこの現象の引き金になるのか、その原因について検討を行った。AD を始めとした変性タンパク質の蓄積を伴う神経変性疾患では、小胞体ストレスの亢進、シャペロンタンパク質の発現増加、オートファジー

の亢進が認められる。そこで、これらの状態をショウジョウバエで再現し、いずれの状態がミトコンドリアタンパク質の挙動異常を示すか実験を行った。その結果、オートファゴソームの形成に必要な Atg を操作し、オートファジーを亢進した場合にのみ、AD モデルで生じる “神経細胞体部分での mito-GFP の蛍光強度増加および軸索や突起部分での蛍光強度低下” を観察する事が出来た。また、逆にオートファジーを抑制すると、軸索や突起部分での蛍光強度の増加が認められた (図 2)。



そこで次に、AD モデルで認められる “神経細胞体部分での mito-GFP の蛍光強度増加および軸索や突起部分での蛍光強度低下” が、オートファジーの抑制により回復するかどうかを検討した。実際には AD モデルで Atg5 をノックダウンし、その影響を観察したが、mito-GFP の挙動異常は回復しなかった。

以上の結果から、AD モデルショウジョウバエの神経細胞では、神経失調や神経変性が起こる前に、ミトコンドリア標的タンパク質のミトコンドリアへの移行異常が起きる可能性が示唆された。またこの異常を引き起こす 1 つの原因に、オートファジーの亢進が関与していると考えられた。

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 4 件)

1) K. Ando, S. Hearn, E. Suzuki, A. Maruko-Otake, M. Sekiya & K. M. Iijima, Electron microscopy of the brains of *Drosophila* Models of Alzheimer's disease, *Neuromethods*, Part of the series Neuromethods pp 1-19, Springer, Humana Press, 10.1007/7657_2015_75, 2016.

2) 関谷 倫子, 飯島 浩一, システム生物学を用いてアルツハイマー病を遺伝子ネットワークから読み解く, *ファルマシア* 52 巻 2 号, 121-125, 2016.

3) K. Ando, A. Maruko-Otake, Y. Otake, M. Sekiya & K. M. Iijima, Stabilization of microtubule-unbound tau via tau phosphorylation at Ser262/356 by Par-1/MARK contributes to augmentation of AD-related phosphorylation and Aβ42-induced tau toxicity, *PLoS Genetics*, DOI:10.1371/journal.pgen.1005917 March 29, 2016.

4) 関谷 倫子, 飯島 浩一, 統合生物学的手法を用いて遺伝子ネットワークの変化からアルツハイマー病発症機序に迫る, *Dementia Japan*, 30 巻 2 号, 2016, (in press).

〔学会発表〕(計 3 件)

1) M. Sekiya, A. Maruko-Otake, E. Suzuki, K. Ando & K.M. Iijima, Altered proteostasis environment causes mistreatment of mitochondrial proteins in a *Drosophila* Model of Alzheimer's disease, AD/PD 2015 (Nice, France).

2) Y. Sakakibara, M. Sekiya, N. Fujisaki & K.M. Iijima, The mechanism underlying neurodegeneration in a *Drosophila* model of Wolfram syndrome, 第38回日本神経科学大会 (平成 27 年 7 月, 神戸).

3) Y. Sakakibara, M. Sekiya, N. Fujisaki & K.M. Iijima, The mechanism underlying neurodegeneration in a *Drosophila* model of Wolfram syndrome, 第 8 回 Nagoya グローバルリトリート (平成 28 年 2 月, 大府).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/alz/Iijima.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関谷 倫子 (SEKIYA, Michiko)

国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・アルツハイマー病研究部・発症機序解析研究室・博士研究員
研究者番号：40367412

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：