

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21261

研究課題名(和文)ミトコンドリア活性酸素種に起因する神経変性モデルの構築と新規疾患分子の同定

研究課題名(英文)Creation of neurodegenerative model due to mitochondrial reactive oxygen species and identification of novel disease molecules

研究代表者

小椋 正人(OGURA, MASATO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10548978

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)：神経細胞群特異的SDHAY215F変異体発現トランスジェニック(Tg)マウスを用いて、ミトコンドリア活性酸素種(ROS)に起因する神経変性モデルを構築し、疾患発症に関与する新規分子の同定および機能解析を行うことを目的とした。Tgマウスの黒質神経細胞において、ROSの増加とともにカスパー3活性化、TUNEL反応性、JNKリン酸化の増加が観察された。この領域のタンパク質を回収し、プロテオーム解析を行ったところ、複数の新規疾患関連分子を同定した。現在、これらの分子をクローニングし、レンチウイルスに組み込み初代培養神経細胞およびマウス個体を用いて、機能解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) are implicated in the modulation of diverse processes including neuronal death. To evaluate the effects of metabolic ROS produced by mitochondria on neurodegeneration, we created transgenic (Tg) mice expressing a phosphorylation-defective mutant of succinate dehydrogenase A in neurons (nSDHAY215F). Neurons in substantia nigra of in male nSDHAY215F mice produced three times more ROS than those in control mice, and increased both the activated caspase-3 and the TUNEL reactivity. The nSDHAY215F mice further displayed increased JNK cascade in neurons of substantia nigra. We identified several factors from the nSDHAY215F mice as a mitochondrial ROS signal that associate with JNK cascade and neuronal death. These results suggest that mitochondrial ROS may directly regulate neuronal survival in substantia nigra through modulation of JNK cascade. Exact molecular targets for mitochondrial ROS will be discussed.

研究分野：薬理学

キーワード：活性酸素種
質量分析 ミトコンドリア プロテオーム アポトーシス シグナル伝達 神経細胞 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

酸化的リン酸化によるエネルギー産生はミトコンドリアの最も重要な機能であるが、同時に、ミトコンドリアは ROS の主な発生源である。エネルギー代謝に伴う ROS 発生については、神経変性疾患をはじめとする種々の加齢性疾患の発症要因の一つと考えられている (Erich *et al.*, *Free Rad Biol Med*, 2009)。ところが、ROS 発生から疾患の発症に至るまでの一連の分子メカニズムには、未だ未解明な点が多く残されており、解決すべき基本課題となっている。

申請者は、現在までにミトコンドリア機能制御に関与するシグナル系の解析を行い、非受容体型チロシンキナーゼである c-Src がミトコンドリア内に高レベルに発現することを見出した。このミトコンドリア内 c-Src の生理学的役割を解明する目的で、ミトコンドリア内 c-Src 特異的にチロシンリン酸化シグナルを抑制するミトコンドリア移行シグナル融合キナーゼ欠損 c-Src 変異体の作製し、この変異体発現細胞を用いて次の結果を得た。ミトコンドリア内 c-Src のキナーゼ活性の抑制が ROS 産生を著明に増加させた。呼吸鎖複合体 II の活性中心サブユニットである SDHA の 215 番目のチロシン残基が c-Src によりリン酸化されることを見出した。この分子のリン酸化部位変異体 (SDHA^{Y215F}) 発現細胞による解析を行い、チロシン残基におけるリン酸化が ROS 産生の抑制に必須であることを見出した (Ogura *M et al.*, *Biochem J*, 2012)。

さらに、ミトコンドリア内 c-Src による ROS 産生制御メカニズムを明らかにする目的で、質量分析装置を用いた呼吸鎖複合体 II の網羅的解析を行い、新規相互作用タンパク質として flotillin-1 分子を同定した。In vitro キナーゼアッセイによる解析から flotillin-1 の 56 番目および 149 番目のチロシン残基が c-Src によりリン酸化されることを見出した。これらのリン酸化部位変異体 (Tyr Phe) 発現細胞を用いた解析を行い、56 番目および 149 番目のリン酸化が呼吸鎖複合体 II との相互作用に必要であるのみならず、ROS 産生の抑制に必須の役割を持つことを明らかとした (Ogura *M et al.*, *FEBS Lett*, 2014)。

神経変性疾患患者の脳病変領域や神経

細胞において 8-オキソグアニン、カルボニル化タンパク質および過酸化脂質の蓄積を指標とした酸化ストレス障害の亢進が見出され、ROS が病態の発症に関与していることが示唆されている。申請者は予備的実験として恒常的な ROS 産生の増加を引き起こす SDHA^{Y215F} 発現レンチウイルスを作製し、マウス胎児由来初代培養神経細胞およびマウスの線条体に感染させた。その結果、SDHA^{Y215F} の発現とともに ROS 産生が増加し、細胞死の指標となる乳酸脱水素酵素 (LDH) の細胞外放出および線条体の感染領域部において TUNEL 染色陽性を示すアポトーシス細胞数が著明に増加した。一方で、SDHA^{Y215F} 発現はコハク酸脱水素酵素活性を変化させなかった (Ogura *M et al.*, 2012) したがって、SDHA^{Y215F} は、クエン酸サイクルを阻害することなく、ROS 産生を増加させ、神経細胞死を惹起すると示唆された。

上記の予備実験結果に基づき loxP 配列を付加したクロラムフェニコールアセチル転移酵素 (CAT) および SDHA^{Y215F} 遺伝子を導入した CAT-SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを作成した。このマウスでは、全身の細胞において CAT 遺伝子のために SDHA^{Y215F} 発現が抑制されている。細胞群特異的なプロモーターを持つ Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配させることで、目的の細胞群においてのみ CAT 遺伝子が欠損し、SDHA^{Y215F} 発現が引き起こされる。

2. 研究の目的

本研究目的は、ミトコンドリア活性酸素種に起因する神経変性モデルマウスの構築を通して疾患発症に関与する新規分子の同定および機能解析を行うことである。

- 1) 神経細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを作成し、神経変性モデルの構築を行う。
- 2) 老齢期に至るまで脳・脊髄組織の形態学的変化および神経細胞死を解析する。
- 3) 疾患発症マウスにより産生されるミトコンドリアおよび細胞質分子を質量分析装置により同定する。
- 4) 同定した分子が神経形態変化および細胞死に与える影響を細胞および個体レベルで解析する。

3. 研究の方法

Cre/loxP システムを用いて神経細胞群

特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを作出する。

胎児期から老齢期に至るまで、脳・脊髓組織の形態学的変化および神経細胞死を解析する。さらに、運動および記憶・学習能力を解析し、疾患発症時期および病変部を特定する。

疾患発症マウスの病変部より産生されるミトコンドリアおよび細胞質分子を二次元電気泳動法および質量分析装置により同定する。

同定した疾患候補分子を発現するレンチウイルスおよび RNA 干渉を行う small hairpin (sh) RNA を用いて、脳・脊髓形態および神経細胞死に与える影響を解析し、疾患分子を同定する。

4. 研究成果

CAT-SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスとドパミン-β-水酸化酵素(DBH)プロモーターまたはドパミントランスポーター(DAT)プロモーターを持つ Cre 発現マウスを交配させた後、生まれた産仔を SDHA および Cre に特異的なプライマーを用いた PCR 法により遺伝子型を解析した。その結果、DBH システムを用いたマウスでは、雌しか SDHA^{Y215F} 発現 Tg 産仔が得られなかったが、DAT システムを用いたマウスでは、雌雄において神経細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを得ることが出来た。DBH システムにおいては、青斑核を中心にミトコンドリア活性酸素種産生が増大すると考えられ、雄マウスが胎生致死する可能性が示唆された。

SDHA^{Y215F} 発現を確認する目的で、脳を摘出し、タンパク質サンプルを調製した後、特異的な抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。神経細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスのサンプルでは、約 70kDa の位置にシグナルが観察された。さらに、凍結脳切片を作成し、特異的な抗体を用いた免疫染色を行ったところ、黒質および線条体領域における SDHA^{Y215F} 発現が確認された。さらに、この脳切片を用いて活性型 Caspase-3 染色および TUNEL 染色を行ったところ、陽性細胞がコントロール群と比較して、有意に増加していた。ミトコンドリア活性酸素種産生を ROS 感受性蛍光指示薬 hydroethidine と MitoSox Red を用いて測定したところ、SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウス群の脳切片において有意な蛍光強度の増加が観察された。神経細胞死に関するシグナル系をウエスタンブロット法および免疫染色法により解析したところ、MAPK の一種で

ある JNK 経路の活性化を確認した。これらの結果から、神経細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスは、ミトコンドリア活性酸素種に起因する神経変性モデルとして利用できると考えられた。

この病変部からタンパク質サンプルを回収し、二次元電気泳動および LC/MS/MS 解析を行い、複数の発現変動するタンパク質群を同定した。さらに、これらの分子をクローニングし、レンチウイルスに組み込み、初代培養神経細胞を用いて機能解析を現在行っている。

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3件)

Ogura M, Inoue T, Yamaki J, Homma MK, Kurosaki T, Homma Y. Mitochondrial reactive oxygen species suppress humoral immune response through reduction of CD19 expression in B cells in mice. *European Journal of Immunology*, 査読有, 47(2), 406-418 (2017), DOI: 10.1002/eji.201646342

Ogura M, Kikuchi H, Suzuki T, Yamaki J, Homma MK, Oshima Y, Homma Y. Prenylated quinolinecarboxylic acid derivative suppresses immune response through inhibition of PAK2. *Biochemical Pharmacology*, 査読有, 105, 55-65 (2016), DOI: 10.1016/j.bcp.2016.01.020

Takarada T, Ogura M, Nakamichi N, Kakuda T, Nakazato R, Kokubo H, Ikeno S, Nakamura S, Kutsukake T, Hinoi E, Yoneda Y. Upregulation of Slc38a1 Gene Along with Promotion of Neurosphere Growth and Subsequent Neuronal Specification in Undifferentiated Neural Progenitor Cells Exposed to Theanine. *Neurochemical Research*, 査読有, 41(1-2), 5-15 (2016), DOI: 10.1007/s11064-015-1591-4

[学会発表](計2件)

Ogura M, Yamaki J, Homma MK, Homma Y. Phosphorylation of respiratory chain components by mitochondrial c-Src is required for neuronal viability, Neuroscience2016, San Diego (2016)

Ogura M, Kikuchi H, Suzuki T, Yamaki J,

Homma MK, Oshima Y, Homma Y. Prenylated quinolinecarboxylic acid derivative suppresses immune response through inhibition of PAK2. 第90回日本薬理学会年会、長崎(2017)

〔その他〕

研究者データベース

<http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/Profiles/31/0003021/profile.html>

医学部生体情報伝達研究所 生体物質研究部門ホームページ

<http://www.fmu.ac.jp/home/biomol/HTML/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 正人 (OGURA MASATO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10548978