

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860224

研究課題名(和文)ミトコンドリア凝集が引き起こす神経細胞死メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of neuronal cell death triggered by mitochondrial aggregation

## 研究代表者

加藤 大樹(Kato, Hiroki)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30452709

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):近年、神経細胞のミトコンドリアが核近傍へ凝集することによるミトコンドリアの分配異常が、神経変性疾患の病因の一つとして認識されるようになってきた。我々は、プリオンタンパク質が引き起こすミトコンドリア凝集を実験モデルとして、ミトコンドリア凝集には14-3-3zetaが必須であることを明らかにしていた。本研究では、新たに14-3-3gamma、etaおよびミトコンドリア輸送因子であるTom70がミトコンドリア凝集に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文): Abnormal mitochondrial distribution and aggregation at perinuclear region in neuronal cells became to be recognized as one of the cause of neurodegenerative disease. We previously reported that deletion mutants of prion protein localize to mitochondria and induce mitochondrial aggregation. In addition, we showed that 14-3-3 zeta is essential for mitochondrial aggregation. In this study, we found that 14-3-3 gamma, eta and Tom70 are also involved in mitochondrial aggregation evoked by prion protein.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは微小管上のモータータンパク質であるキネシンと結合し核近傍の中心体から外側へ、ダイニンと結合し外側から中心体に向かって輸送され、細胞内に均一に分配されている。特に神経細胞では神経終末へのミトコンドリア輸送は重要であり、例えば我々はミトコンドリア分裂因子 Dynamin related Protein 1 (Drp1)のノックアウトマウスでは、巨大なミトコンドリアが神経細胞の核近傍に凝集し、ミトコンドリアが軸索へ分配されなくなると、シナプスの形成が低下し、神経細胞死が起こり、マウス胎児脳で白質の低形成がみられることを明らかにした。

近年、ミトコンドリア凝集による神経細胞死が、神経変性疾患の病因として注目されている。孤発性アルツハイマー病患者の単離繊維芽細胞では、核近傍へのミトコンドリア凝集が見られ(Wang et al., Am. J. Pathol. 2008)、家族性アルツハイマー病の病因とされるアミロイド前駆タンパク質の Swedish 変異は、核近傍へのミトコンドリア凝集を引き起こし、その結果軸索へのミトコンドリアの分配が減少することが報告されている(Wang et al., PNAS 2008)。また我々の研究室では、遺伝性プリオン病であるゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (GSS) の Y145STOP 変異によって、通常細胞膜に局在するプリオンタンパク質(PrP)がミトコンドリアにミスターゲティングし、それによりミトコンドリアが核近傍へ凝集し、神経細胞死を引き起こされることを明らかにした(Hachiya et al., BBRC2005)。

このような背景から、ミトコンドリアの核近傍への凝集メカニズムを明らかにすることは、これら神経変性疾患の病態解明の手掛かりとなると考えられた。そこで我々はミトコンドリア凝集に関して、ヒトプリオンタンパク質の Y145STOP に相当するマウス PrP(1-143)、および PrP(1-139)が引き起こすミトコンドリア凝集を実験モデルとして、以下のことを明らかにしていた。

### (1) 核近傍へのミトコンドリア凝集は微小管依存的である

ミトコンドリア凝集は核近傍に形成されることから、微小管を介したミトコンドリア輸送のバランスが、ダイニン側に傾くことでミトコンドリアが凝集したのではないかと考えられた。そこで微小管脱重合剤であるノコダゾールの効果の検討を行ったところ、核近傍に凝集したミトコンドリアが、ノコダゾール処理によって細胞内に分散することを明らかにした。

### (2) 14-3-3 $\zeta$ はミトコンドリア凝集の必須因子である

14-3-3 タンパク質は酵母から動物に至るまで高度に保存され、動物では7つのアイソフォームが存在しており多種の標的タンパ

ク質と結合し、細胞の増殖、細胞周期、細胞内シグナル伝達など多様な細胞内での事象を調節している。特に、14-3-3 $\zeta$ は神経変性疾患の凝集体の構成成分として検出されることから、凝集体形成に関わるのではないかと示唆されていた。これを踏まえ我々は、14-3-3 $\zeta$ の siRNA によってミトコンドリア凝集が阻害されること、通常細胞質に局在する 14-3-3 $\zeta$ が、ミトコンドリア凝集時にミトコンドリアへ局在することを明らかにした。さらに、我々は 14-3-3 $\zeta$ は、ミトコンドリアのキネシン輸送に関わる Mitochondrial RhoGTPase 1 (Miro1)と結合することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアが核近傍へ凝集する現象は、神経変性疾患以外にも虚血時に神経細胞で核近傍へミトコンドリアが凝集し活性酸素を発生させ、それがシグナルとなり核に伝わり細胞死を誘導すること(Al-Mehdi et al., Sci. Signal. 2012)、さらにミトコンドリアは細胞内免疫にも関与しているが、B型肝炎ウイルス感染によってミトコンドリアが凝集してしまい細胞免疫機能が低下すること(Kim et al., J. Virol. 2006)などが知られている。しかしながら、そのメカニズムは不明な点が多く、現在のところ応募者らが同定している 14-3-3 $\zeta$ が唯一のミトコンドリア凝集に関わる因子である。

そこで本研究は(1)Miro1 と相互作用する  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor interacting factor (GRIF1)のミトコンドリア凝集への関与の検討、(2)14-3-3 $\zeta$ 以外のミトコンドリア凝集に関与する因子の探索を行い、ミトコンドリアの凝集メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)GRIF1 がミトコンドリア凝集に与える影響の解析

EGFP-PrP1-139 発現ベクターとともに、pcDNA3.1 もしくは N 末端に HA タグを付加した GRIF1 発現ベクターをマウス神経芽腫由来 N2a 細胞にトランスフェクトした。48 時間後、蛍光顕微鏡による観察を行い、GRIF1 の発現確認、および約 100 個の細胞についてミトコンドリア凝集の有無のカウントを行った。

### (2)14-3-3 以外の因子群の探索

候補因子に対する siRNA を N2a 細胞にトランスフェクションした。24 時間後、EGFP-PrP1-139 発現ベクターを、siRNA と共に N2a 細胞にトランスフェクションした。48 時間後、蛍光顕微鏡によるミトコンドリア凝集の観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) GRIF1 がミトコンドリア凝集に与える影

## 響の解析

14-3-3 $\zeta$ と Miro1 の複合体には、GRIF1 が含まれていないことを明らかにしていた。そこで、14-3-3 $\zeta$ は GRIF1 と競合的に Miro1 と結合し、Miro1 とキネシンの結合を阻害することで、ミトコンドリア輸送をダイニン側に傾け、核近傍にミトコンドリアが核近傍に凝集すると考えられた。これを明らかにするため、GRIF1 を過剰発現させ、ミトコンドリア凝集が低下するか否か解析を行った。

EGFP-PrP1-139 と pcDNA3.1 もしくは HA タグを N 末端に付加した GRIF1 の発現プラスミドを N2a 細胞にトランスフェクションした。しかし、ほとんどの細胞で HA-GRIF1 の発現が見られなかった。そのため、HA-GRIF1 の発現が確認できた細胞のみを選択し解析を進めた。その結果、pcDNA3.1 をトランスフェクションしたコントロール細胞群では 58%の細胞でミトコンドリアが凝集していたのに対して、HA-GRIF1 をトランスフェクションし発現が確認できた細胞群では 39%の細胞のミトコンドリアが凝集していた。HA-GRIF1 の発現により、ミトコンドリア凝集の低下が見られた。この結果より GRIF1 のミトコンドリア凝集への関与が示唆されるが、全体的に HA-GRIF1 発現量が低く、トランスフェクション法や、発現ベクターの改善が必要である。

## (2)14-3-3 $\zeta$ 以外のミトコンドリア凝集に関与する因子の探索

14-3-3 以外の因子群の探索として、まず以外の 14-3-3 アイソフォームの関与を検討した。神経芽細胞腫由来 N2a 細胞に 14-3-3 、 、 、 の siRNA をトランスフェクションし、その後 EGFP-PrP1-139 を発現させた。蛍光顕微鏡でミトコンドリア凝集を観察した結果、14-3-3 と をノックダウンした時に、ミトコンドリア凝集が観察されなかった。また 14-3-3 と をノックダウンした時は、EGFP-PrP1-139 のミトコンドリアへの局在が阻害されていた。14-3-3 と はプリオンタンパク質のミトコンドリア輸入に関与し、ミトコンドリアを凝集させることがわかった。

我々はさらに、プリオンタンパク質のミトコンドリア輸入とミトコンドリア凝集について解析を進めた。ミトコンドリアタンパク質の輸入には、ミトコンドリア外膜に存在する Tom 複合体が関与している。そこで、プリオンタンパク質の輸入には Tom 複合体が関与するか検討を行った。Tom 複合体を構成する成分のうち、受容体として機能する Tom20、22、70 と、膜透過装置に機能する Tom40 の siRNA を N2a 細胞にトランスフェクションし、EGFP-PrP1-139 を発現させた。その結果、Tom70 の siRNA をトランスフェクションしたときのみ、EGFP-PrP1-139 のミトコンドリア局在は阻害され、さらにミトコンドリア凝集も阻害されていた。

本研究により 14-3-3 、 および Tom70、

これら因子群によりプリオンタンパク質がミトコンドリアへ輸入され、ミトコンドリア凝集を引き起こすことが明らかになった。

## 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2件)

Kato, H., Nishijima, K. and Hachiya, N. (2013) Motor Switch from KIF4 to KIF5 Induces a Selective Reduction in Anterograde Velocity of Fluorescent Cellular Prion Protein in Neurites., J. Neurol. Neurophysiol., 査読有, S11:005, DOI: 10.4172/2155-9562.S11-005

加藤大樹、八谷如美 (2013) プリオン病 Up to date 正常プリオン蛋白の構造と機能, Clinical neuroscience, 31(9), p1012-1014

[学会発表](計5件)

加藤大樹、福島実紀、宮下佳奈、鈴木森香、西島佳奈、八谷如美、正常型プリオンタンパク質が引き起こす神経変性機構の解析、第 87 回日本生化学会大会、平成 26 年 10 月 15-18 日、京都

Kato, H., Miyashita, K., Fukushima, M., Nishijima, K., Hachiya, N. Involvement of MSF pathway for the neurodegeneration of prion disease., Asian Pacific Prion Symposium 2014, Jeju, Korea, July 6-7, 2014

加藤大樹、正常プリオンタンパク質が引き起こすミトコンドリア異常凝集と神経細胞死、第 6 回 タンパク質と異常凝集とその防御・修復に関する研究会、平成 25 年 11 月 15 日、京都大学原子炉実験所、大阪

Kato, H. and Hachiya, N, Identification of the cyptic mitochondrial targeting sequence for PrPC/mitochondria-dependent neuronal cell death., Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, Japan, July 21-22, 2013

Miyashita, K., Fukushima, M., Kato, H., Hachiya, N. Possible involvement of a novel mitochondrial quality control system from the PrPC-dependent neuronal cell death., Asian Pacific Prion Symposium 2013, Sasebo, Japan, July 21-22, 2013

[図書](計1件)

Suzuki, M., Kato, H., Hachiya, N. Mitochondrial Physiology and Cerebro-Spinal Protection. (2015) Uchino, H., Ushijima, I., Ikeda, Y. (Eds.) Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection, Chapter 6, Springer, in press.

[産業財産権]

出願状況（計 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 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤大樹 (KATO HIROKI)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：30452709

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：