

平成30年6月7日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21055

研究課題名(和文)細胞骨格制御によるミトコンドリア品質維持機構の解明

研究課題名(英文)The regulation of mitochondrial quality by cytoskeleton molecules

研究代表者

近藤 豪 (KONDO, Takeshi)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：10712705

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)：本研究では、微小管形成を担う α -tubulinがミトコンドリアの機能維持において果たす役割を明らかにし、神経疾患の病態理解や治療戦略の基盤につなげることを目指す。神経特異的に発現する Tubg2遺伝子を欠損したマウスの解析から、TUBG2タンパク質は普遍的に発現機能しているTUBG1タンパク質と同様の微小管形成能に加えて、ミトコンドリア品質管理に積極的に関与することが明らかとなった。さらにパーキンソン症を伴う疾患の病理解析において、 α -tubulinレベルの低下が認められ、TUBG2タンパク質の機能低下がミトコンドリア機能低下を通して、病態の増悪に寄与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the roles of α -tubulin proteins in the regulation of mitochondrial quality and the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases. Through analyzing Tubg2-KO mice, we found that TUBG2 protein functions not only in the microtubule nucleation, but also in the quality control of mitochondria. Moreover, α -tubulin proteins are decreased in some of human neurodegenerative diseases with parkinsonism. These findings indicate that loss of TUBG2 could lead to exaggeration of these diseases by defects in mitochondria.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞骨格 ミトコンドリア パーキンソン症

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは ATP の産生や代謝、ストレス応答において重要な細胞内小器官であり、その異常は神経疾患や代謝疾患、がん、老化など様々なヒトの疾患と密接に関わっている (*Cell*. 2012;148(6):1145-59.)

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで罹患率の高い神経変性疾患である。家族性パーキンソン病の原因遺伝子である PINK1 (*PARK6*) や Parkin (*PARK2*) は、選択的オートファジーの一種であるマイトファジーの構成因子であり、ミトコンドリア品質管理の異常が病因と考えられている (*Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):9-14.) これらの知見は協調運動を担う神経回路の機能維持が、ミトコンドリアの機能により大きく左右されることを意味している。パーキンソン病についてはドーパミンの補充による対象療法がある程度可能であるが、多系統萎縮症などでは同法による治療ができず病気の進行も早いので、別の作用機序による治療方法の確立が望まれている。

ミトコンドリアを含めたオルガネラが細胞内で適切に配置、連絡して機能するためには、微小管とモータータンパク質による輸送機構が重要である (*Nat Rev Neurosci*. 2012;13(2):77-93.) 微小管形成の中心を担うとされる γ -tubulin のうち、マウスにおける I 型 (TUBG1) の欠損は胎性致死となるが、神経系に特異的に発現する II 型 γ -tubulin (TUBG2) は欠損してもマウスは正常に発生・生育し、一見して明らかな異常が認められない。 (*Dev Biol*. 2005;282(2):361-73.)。しかし *Tubg2*-KO マウスの詳細な解析から、パーキンソン病に良く似た表現型を示すことが見出された。

2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリアの機能維持において γ -tubulin が果たす役割を明らかにする。*Tubg2*-KO マウスの表現型であるパーキンソン病様の異常について、(1) 細胞～分子レベルの機能解析による分子メカニズムの解明と (2) ヒト疾患と *Tubg2*-KO マウスを比較することによるヒト神経疾患における γ -tubulin の関与について検証する。

3. 研究の方法

(1) TUBG2 によるミトコンドリア制御の分子メカニズム

これまでの実験で *Tubg2*-KO マウスに見られるミトコンドリア異常をさらに詳細に評価する。ミトコンドリアの形態と機能の異常を別の方法で確認しつつ、異所性に発現させた TUBG2 や TUBG1 で回復するかについて検証する。

マイトファジーとの関係

損傷を受けたミトコンドリアがマイトファジーにより除去される際には、微小管に沿った輸送が重要であるため、TUBG2 欠損による微小管の減少が、ミトコンドリアの輸送効率を下げている可能性が考えられる。マイトファジーを誘導した際のミトコンドリアや γ -tubulin タンパク質の挙動から、マイトファジーとの関係性を探る。

ミトコンドリアの分裂・融合との関係

ミトコンドリアは動的なオルガネラであり、頻繁に分裂と融合を繰り返している。予備実験において、ミトコンドリアの動態制御に関与するタンパク質を TUBG2 結合分子候補として同定しているため、この分子との機能的関係を解析することで、ミトコンドリアの動態への影響を検証する。

(2) ヒト神経疾患における γ -tubulin の関与

パーキンソン症状を呈する神経疾患患者の死後脳において TUBG2 の発現量を解析し、ヒト疾患において TUBG2 の増減が病態に影響する可能性を探る。TUBG2 レベルに異常が認められた疾患の病理学的特徴が、*Tubg2*-KO マウスにおいても認められるかを確認する。さらに *Tubg2*-KO マウスに対して当該疾患治療薬を投与する、あるいは上記で得られた分子レベルの知見に基づいた治療実験を行うことで、疾患との相関性の更なる検証と、新しいコンセプトに基づく治療戦略を提示する。

4. 研究成果

(1) TUBG2 によるミトコンドリア制御の分子メカニズム

まず予備検討で *Tubg2*-KO マウスに認められたミトコンドリア異常について、さらに詳細に評価した。電子顕微鏡による神経細胞の観察を行なったところ、ミトコンドリアの形態異常と微小管の減少を認めた。また初代培養神経において ATP 産生能の低下も認められた。これらの異常は異所性に TUBG2 を発現させることで部分的に回復可能である一方で、TUBG1 の発現では回復不能であった。よって TUBG2 タンパク質は、ミトコンドリアの形態だけでなく機能維持にも重要であり、かつ γ -tubulin タンパク質に普遍的ではない、TUBG2 タンパク質に特異的な機能であることが示された。

電気生理学的実験において *Tubg2*-KO マウス脳の線条体黒質経路の抑制性制御が低下していたことから、GABA の放出低下が疑われていた。GABA の変化をより直接的に確認するため、アミノ酸誘導体化法を併用した質量顕微鏡法を用いて GABA 分子自体の変化をイメージング解析した。

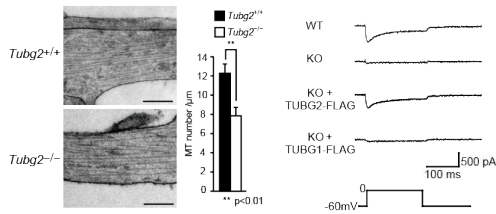


図1. TUBG2欠損による微小管減少と線条体黒質経路の機能低下

マイトファジーとの関係

ミトコンドリア品質管理機構マイトファジーにおける TUBG2 の関与を検証するために、脱共役剤 Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP)を用いてマイトファジーを誘導した際の TUBG2 の細胞内動態をイメージング解析した。細胞内に発現させた TUBG2 は安静時には微小管形成中心および細胞質に分散している状態であるが、CCCP で処理した細胞を観察したところ TUBG2 の一部が積極的にミトコンドリアに局在していた。そこでこの条件下で TUBG2 と結合が増す分子をプロテオミクス解析することで、ミトコンドリア機能制御の分子メカニズムのヒントとなる候補分子を新たに得た。

一方で微小管はオルガネラの適正な輸送・配置に必須であるため、TUBG2 欠損による微小管の減少が、ミトコンドリアの輸送等に影響する可能性も考えられる。実際、TUBG2 欠損神経細胞の微小管は減少し、逆に培養細胞に TUBG1 または TUBG2 を過剰発現させることで、ミトコンドリア形態に多少の影響が認められるが、前述のように TUBG2 には TUBG1 とは明確に異なる性質があるため、TUBG2 欠損によるミトコンドリア機能異常において微小管数の変化は部分的な寄与だと思われる。

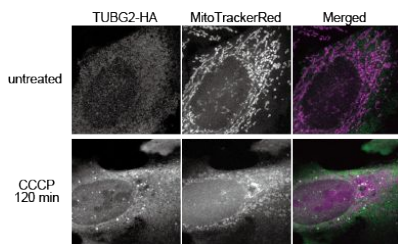


図2. マイトファジー誘導時の TUBG2 タンパク質局在変化

ミトコンドリアの分裂・融合との関係

TUBG2 タンパク質に対する特異的抗体を用いた免疫沈降法-質量分析による予備検討から、ミトコンドリアの分裂・融合に関わるタンパク質を結合分子として同定していた。そこで TUBG2 および当該タンパク質を培養細胞に共発現させ、両者の結合について免疫沈降法-ウエスタンブロット法で、細胞内の局在性については共焦点顕微鏡を用いて観察

したが、予備検討から予想された両者の直接的関係は認められなかった。予備検討の結果は、おそらく抗体の非特異的結合によるものと思われた。

前述のようにマイトファジー誘導時の関与が大きい知見が得られたため、正常時の分裂・融合制御よりもマイトファジーにおける役割の解明に注力することとした。但し、マイトファジーが起こる際にミトコンドリアは積極的に分断され、分解処理しやすい状態になることが知られるため、機能低下したミトコンドリアの分断において TUBG2 と当該タンパク質が協働している可能性は残されている。

(2) ヒト神経疾患における γ -tubulin の関与

ブレインバンクから提供されたパーキンソン病と多系統萎縮症の症例死後脳における γ -tubulin 発現量を解析した。パーキンソン病患者では γ -tubulin レベルの異常を認めなかったが、多系統萎縮症では顕著な減少を認めた。よって多系統萎縮症の病態に γ -tubulin の機能低下が寄与する可能性が考えられた。

Tubg2-KO マウスの異常と多系統萎縮症に関係性が疑われたので、*Tubg2*-KO マウスの脳に多系統萎縮症の病理学的特徴が認められるか検証したが、多系統萎縮症の最大の特徴であるグリア細胞質内封入体 (GCI) は認めなかった。このことから多系統萎縮症における TUBG2 レベル低下は、多系統萎縮症の原因というよりは、病態に伴って生じた結果である可能性が高い。TUBG2 タンパク質の機能低下は、それだけでミトコンドリアの機能低下につながるため、多系統萎縮症で認められた TUBG2 レベルの低下は病態の悪化につながっている可能性がある。

また *Tubg2*-KO 神経におけるミトコンドリア機能と ATP の低下から、脳への ATP 補給を狙って *Tubg2*-KO マウスにピルビン酸を与えたところ、運動機能の一部に改善を認めた。よって、TUBG2 レベルの減少とそれに伴うミトコンドリア機能低下が疑われる疾患において、ATP 補給が症状の一部改善に役立つことが期待される。*Tubg2*-KO マウスの運動障害はレボドパ投与では改善しないため、病態において TUBG2 レベルの低下が寄与している症状に対して、特に有効と考えられる。

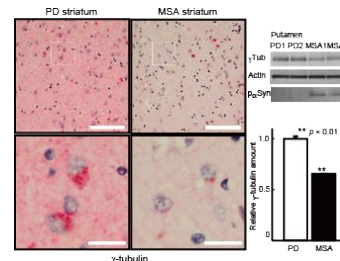


図3. ヒト死後脳における γ -tubulin レベルの低下

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 豪 (KONDO, Takeshi)
浜松医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：10712705

(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：

(4)研究協力者

なし ()