

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15545

研究課題名(和文)角化におけるミトコンドリアの役割

研究課題名(英文)Role of Mitochondria in keratinization

研究代表者

阿部 理一郎(Abe, Riichiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60344511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、アポトーシスなどさまざまな細胞応答において中心的な機能を發揮している。またミトコンドリアは活発に融合と分裂を繰り返し、その形態を変化させている。一方角化におけるミトコンドリアの関わりは不明である。融合関連タンパクであるMfn2は基底層のみに発現がみられ、Mfn1は有棘層のみに発現がみられ、特定のケラチンとの結合することを明らかにした。さらにMfn1、Mfn2それぞれの表皮特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製に成功した。ミトコンドリアは角化に対してケラチンとの結合を介して密接に結びつくことが明らかになった。

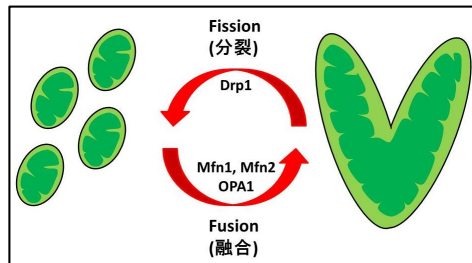
研究成果の概要(英文)：Mitochondria exert a central function in various cellular responses such as apoptosis. Mitochondria also actively fuses and divides, and changes its morphology. On the other hand, the involvement of mitochondria in keratinization is unknown. Expression was observed only in the basal layer of Mfn2, a fusion-related protein, Mfn1 was expressed only in the spinous layer, and it was revealed that it binds to specific keratin. We succeeded in producing epidermis-specific conditional knockout mice of Mfn1 and Mfn2, respectively. It became clear that mitochondria is closely associated with keratinization through binding to keratin.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ミトコンドリア 角化

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、酸素呼吸により細胞内のエネルギーをつくりだすオルガネラであり、アポトーシス、細胞内カルシウムシグナリング、自然免疫応答など、さまざまな細胞応答において中心的な機能を発揮している。またミトコンドリアは活発に融合と分裂を繰り返し、その形態を変化させている。発生・組織分化・特異的疾患に伴ってミトコンドリアの形態が大きく変化する。近年、ミトコンドリアの融合と分裂に機能する GTP 加水分解酵素群が同定された。融合には Mitofusin(Mfn)1、Mfn2、OPA1、また分裂は Drp1 が関与する。



一方角化におけるミトコンドリアの関わりは現在まで全く不明である。角化は一種のプログラム細胞死であるため、ミトコンドリアとの関与が強く想定される。加えて最近ミトコンドリア上の Mfn2 は keratin5,14 と trichoplein というタンパクを介して間接的に接合していることが明らかとなり、ケラチンの遺伝子異常、ミトコンドリア分裂融合および表皮肥厚の現象を結びつける鍵になる可能性がある。

正常表皮(基底層～顆粒層)におけるミトコンドリアの形態および機能の変化を解明する。さらに表皮融解性魚鱗癬(keratin1,10 遺伝子変異)患者の皮膚、および培養細胞を用いて、ミトコンドリアの形態および機能異常を明らかにする。さらに表皮特異的 Mfn または Drp1 のノックアウトマウスを作製し、角化の現象の変化をみる。さらに Mfn1 と keratin1,10 を結びつけるタンパクの検索を行う。最終的にミトコンドリアの角化への関与を明らかにする。

角化におけるミトコンドリアの役割は全

く不明である。ミトコンドリアの分裂融合が Mfn や OPA1 の遺伝子変異などで障害されると、神経変性疾患を発症することが明らかとなっているが、組織分化に対する関与の報告はほとんどない。本研究でミトコンドリアの分裂融合が角化の機序に関与していることが明らかになると予想される。また分裂融合に関与する Mfn などの欠損で角化異常が引き起こされることが、コンディショナルノックアウトマウスでみられれば、表皮融解性魚鱗癬の発症機序の全貌を明らかにすることができる。

## 2. 研究の目的

「角化」は、表皮における最も重要な生理的現象であり、表皮の役割であるバリアー機能の発現などをもたらす。現在まで精力的に角化のプロセスについて研究が行われているが、根本である表皮細胞の能動的細胞死の詳細な機序は不明な点が多い。一方、ミトコンドリアは細胞内エネルギーを産生するオルガネラで、アポトーシス、細胞内カルシウムシグナリングなど、さまざまな細胞応答に関与する。

本研究の目的は、角化の現象におけるミトコンドリアの関与を明らかにし、さらに先天性角化症発症におけるミトコンドリアの関与を解明することである。

ミトコンドリアは、酸素呼吸により細胞内のエネルギーをつくりだすオルガネラであり、アポトーシス、細胞内カルシウムシグナリング、自然免疫応答など、さまざまな細胞応答において中心的な機能を発揮している。またミトコンドリアは活発に融合と分裂を繰り返し、その形態を変化させている。発生・組織分化・特異的疾患に伴ってミトコンドリアの形態が大きく変化する。近年、ミトコンドリアの融合と分裂に機能する GTP 加水分解酵素群が同定された。融合には Mitofusin(Mfn)1、Mfn2、OPA1、また分裂は Drp1 が関与する。

一方角化におけるミトコンドリアの関わりは現在まで全く不明である。角化は一種のプログラム細胞死であるため、ミトコン

ドリアとの関与が強く想定される。加えて最近ミトコンドリア上の Mfn2 は肝細胞において keratin 8,18 と trichoplein というタンパクを介して間接的に接合していることが明らかとなっている。ケラチンとミトコンドリアの結合は、ケラチンの遺伝子異常、ミトコンドリア分裂融合および表皮肥厚の現象を結びつける鍵になる可能性がある。

正常表皮の角化過程におけるミトコンドリアの形態および機能の変化を解明する。さらに Cre-lox システムを用いて表皮特異的 Mfn ならびに Drp1 のノックアウトマウスを作製し、角化の現象の変化をみる。さらに Mfn1 と keratin 1,10 を結びつけるタンパクの検索を行う。最終的にミトコンドリアの角化への関与を明らかにする。

角化におけるミトコンドリアの役割は全く不明である。ミトコンドリアの分裂融合が Mfn の遺伝子変異などで障害されると、神経変性疾患を発症することが明らかとなっているが、組織分化に対する関与の報告はほとんどない。本研究でミトコンドリアの分裂融合が角化の機序に関与していることが明らかになると予想される。また分裂融合に関与する Mfn などの欠損で角化異常が引き起こされることが、コンディショナルノックアウトマウスでみられ、さらにミトコンドリアとケラチンとの関係が明らかに出きれば、ケラチンの遺伝子異常により発症する先天性角化症の発症機序の全貌を明らかにすることができる。

### 3. 研究の方法

(1) 正常表皮(基底層~顆粒層)におけるミトコンドリアの形態および機能の変化を解明する。

ミトコンドリア染色で細胞内分布の変化、および電子顕微鏡にて形態の観察、ならびに分裂融合にかかわる GTP 加水分解酵素の分布の変化をみる。

(2) 表皮融解性魚鱗癬(keratin 1,10 遺伝子変異)患者の皮膚、および培養細胞を用いて、ミトコンドリアの形態および機能を検討する。

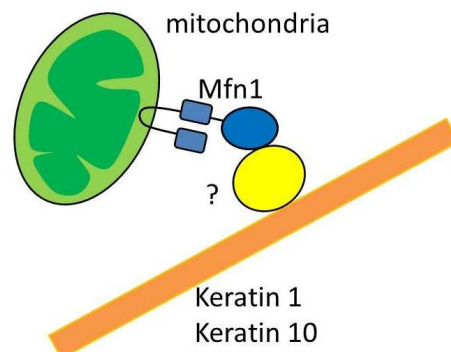
正常表皮と同様に検討を行い、正常表皮、正常表皮細胞と比較し、疾患特異的变化を検討する。

(3) 表皮特異的 Mfn または Drp1 のノックアウトマウスを作製し、角化の現象の変化をみる。

Keratin14promotor 特異的 Mfn ならびに Drp1 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、その表皮を観察することで角化への影響を検討する。

(4) Keratin と Mfn を結びつけるタンパクを同定する。

Keratin8,18 と Mfn2 を結びつける trichoplein のように、keratin5,14 または 1,10 と Mfn1 を結びつけるタンパクの存在が予想される。候補タンパクの検索を行う。

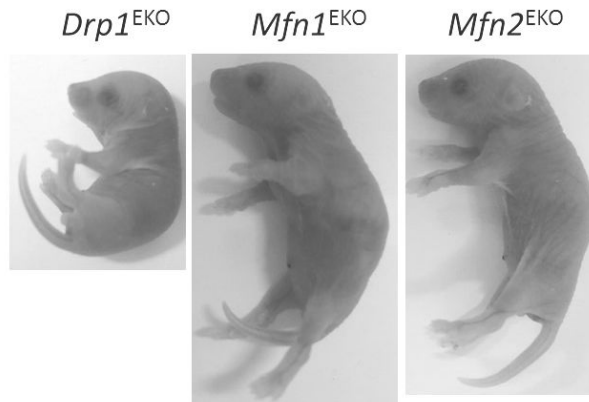


### 4. 研究成果

ミトコンドリアは表皮全層の細胞にほぼ一様に存在していた。電子顕微鏡で基底層、有棘層、顆粒層それぞれにおいて検討おこなったが、その形態の変化はほぼ見られず、また数の変化も見られなかった。

分裂融合にかかわる GTP 加水分解酵素において、興味深いことに Mfn2 は基底層のみに発現がみられ、Mfn1 は有棘層のみに発現がみられた。これまでの報告で Mfn2 は trichoplein により keratin5,14 と結合することが報告されており、keratin の発現パターンによりミトコンドリアの融合を担う酵素の発現パターンが変化することが示唆される。さらには Mfn の subtype の発現で keratin の発現パターンが影響される可能性もある。

我々はすでに Drp1、Mfn1、Mfn2 それぞれの表皮特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製に成功した（下図）。



表皮融解性魚鱗癬（keratin 1,10 遺伝子変異）患者の皮膚、および培養細胞を用いて、ミトコンドリアの形態および機能を検討した。電子顕微鏡による観察では、核周辺に変性したミトコンドリアが多数見られたことからミトコンドリアの関与が強く示唆される。

Keratin8,18 と Mfn2 を結びつける trichoplein のように、keratin1,10 と Mfn1、または keratin5,14 と Mfn2 を結びつけるタンパクの存在が予想される（下図）。候補タンパクの検索を行っている。

さらに培養表皮細胞を用いて、免疫沈降法にて Keratin1 または 10 と結合するタンパクを抽出し、質量分析により、候補タンパクを探索も行っている。同様に Mfn1 と結合する候補タンパクも検討することで同定を行う。

さらに Mfn1/Mfn2 ダブルノックアウトマウスも作成した。表現型として、発毛に以上をきたし、さらにすべての個体が 2 3 週間前後で志望した。それぞれ十分な数を得ておらず、今後詳細な皮膚症状などのフェノタイプの解析を行う予定である。

## 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）

なし

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 理一郎 (ABE, Riichiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60344511