

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03221

研究課題名（和文）ニューロンの軸索におけるミトコンドリアDNA 排除の機構と役割

研究課題名（英文）Mechanism and Role of Mitochondrial DNA Exclusion in Neuronal Axons

研究代表者

平林 祐介（Hirabayashi, Yusuke）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：80447391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：多くのエネルギーを必要とするニューロンの軸索においてATPの供給源の解明は、ニューロン活動の制御メカニズムの解明のみならず、加齢や疾患に伴う脳機能の低下メカニズムの解明においても非常に重要である。本研究において我々はミトコンドリアが持つDNAに着目し、ニューロンのメタボリズム制御メカニズムの解明をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアDNAは近年、様々な炎症やパーキンソン病の病因に関連することが明らかになりつつあり、その制御についての解明は非常に重要である。従って本研究によって明らかになった哺乳類大脳皮質ニューロンにおける特異的なミトコンドリアDNAの制御は、ニューロンのメタボリズム制御メカニズムの解明だけでなく広くミトコンドリア研究、疾患原因解明のための研究にインパクトを与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of the source of ATP in the axon of neurons, which requires a large amount of energy, is very important for understanding the regulatory mechanisms of neuronal activity, and the mechanisms of decline in brain function associated with aging and disease. In this study, we focused on the mitochondrial DNA to reveal the regulatory mechanisms of neuronal metabolism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ニューロン

1. 研究開始当初の背景

脳の重量は全体重の 2.5%に過ぎないが、全身で使われるエネルギーのうち 20%は脳で消費されると考えられている。実際に、虚血や低血糖症などによるエネルギー供給の低下によってまず脳の機能が急激に低下する。従って、脳が正常に機能するためにはエネルギー供給が厳密にコントロールされてなくてはならず、またそのメカニズムを知ることが虚血などから脳の機能を守る上での基礎的な知識となる。ニューロンは非常に区画化された細胞であり、樹状突起・細胞体と軸索は機能や局在するタンパク質の種類などに大きな違いがある。そのため、区画ごとの代謝は大きく異なると予想され実際に、ニューロンで消費される ATP の大部分は軸索で消費される事が明らかになっている。人間の脳では一秒間に 47 億分子の ATP が消費されていると見積もられており、脳のエネルギーの主な供給源であるグルコースを効率良く ATP に変換する必要があると考えられている。

ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化は ATP を非常に効率良く産み出すが、副産物として細胞毒性を持つ活性酸素 (ROS) や熱も産生する。ニューロンのほとんどは一生涯に渡って維持される細胞であり、センチメートルからメートル単位で伸びる軸索も一生涯に渡って維持される。このような特殊な細胞においては細胞へのダメージの蓄積を極力避ける必要があり、ROS や熱産生の回避は特に重要であると考えられる。実際、多くの神経変性疾患への ROS の関与が疑われているし、多くの神経細胞の反応は熱に敏感である。細胞においてほとんどの ROS は酸化的リン酸化により作られるため、ニューロンにおける酸化的リン酸化の制御は ROS 産生抑制の鍵となる。しかしながら、これまでのニューロンのミトコンドリアにおける代謝研究は、ほとんどがニューロン内の区画化を無視したものであり、各区画ごとに特異的な代謝制御についての研究は非常に少なかった。この問題を解決するために新たな技術による、区画ごとの代謝研究を進める必要があった。

2. 研究の目的

ミトコンドリア DNA (mtDNA) はミトコンドリアの酸化的リン酸化による ATP 産生に必須なタンパク質などをコードする。mtDNA にコードされたタンパク質は、タンパク質輸送やコドン利用などの理由からミトコンドリア内で翻訳されなければならない。つまり、ミトコンドリアが酸化的リン酸化を行う際にはミトコンドリアは mtDNA を持つ必要がある。その為に mtDNA は正確に複製されミトコンドリア分裂の際に正確に分配されなければならない。一方で、軸索のミトコンドリアは非常に小さいことが知られ、mtDNA の分配が困難であることが予想される。そこで、本研究では mtDNA の軸索における局在を発生の時期を追って調べ、軸索における mtDNA の量が制限されているメカニズム、およびその生理的意義を明らかにすることを目的とした (図 1)。

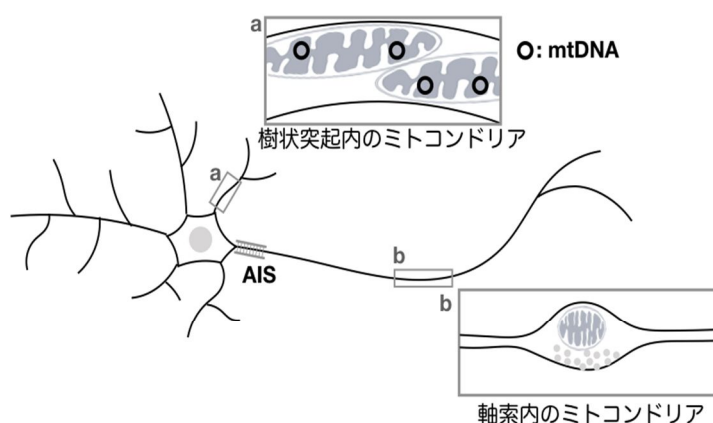


図 1 本研究の目的

ニューロンは樹状突起・細胞体と軸索に大きく区画化されている。本研究では、ニューロンの区画ごとにミトコンドリア DNA の局在を調べ、その制御メカニズムや意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、大脳皮質興奮性ニューロンの軸索における mtDNA の有無を調べる。これまでに抗 DNA 抗体を用いたミトコンドリア内の DNA の検出と、mtDNA のマーカーとして用いられている TFAM

(mtDNA の転写因子) あるいは Twinkle (TWNK; mtDNA のヘリケース) に蛍光タンパク質を融合したタンパク質の局在を用いて mtDNA の局在を調べることを試みた。また、mtDNA マーカーの蛍光タンパク質融合タンパク質を用いる系においては、一部のニューロンにのみこのマーカータンパク質を発現することで、単一ニューロンごとの mtDNA の局在を調べることが出来たが、これらのマーカータンパク質が本当に mtDNA の存在を反映しているかどうかはわからない。そこで、mtDNA を検出するために PCR を用いることにした。そのために、ニューロンのそれぞれの区画からミトコンドリアを単離する必要がある。そこで、我々は走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (Scanning Ion Conductance Microscopy) と蛍光顕微鏡の相関顕微鏡の開発を行なった (図 2)。その結果、このシステムを用い、軸索の単一ミトコンドリアを取得することに成功し、それぞれのミトコンドリア内の mtDNA の量を定量することに成功した。

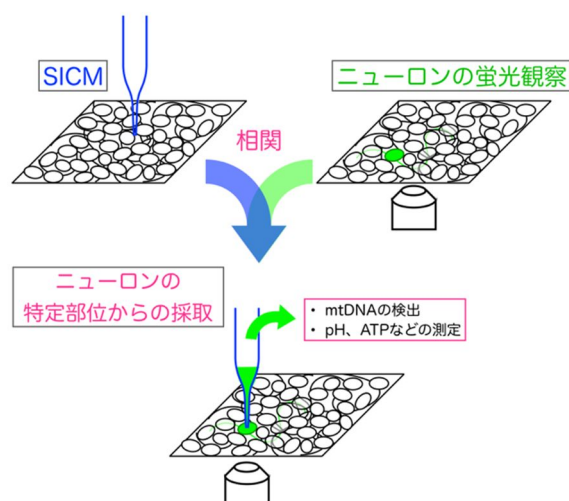


図 2 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡と蛍光顕微鏡の相関解析

SICM の位置と蛍光顕微鏡観察により取得した細胞情報を相関させる。これによりニューロンの特定部位から SICM を用いミトコンドリアを採取した。

4 . 研究成果

近年 1 細胞を対象にした遺伝子発現などの解析が非常に盛んに行われるようになり、Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS), マイクロ流路を用いた分離、ドロップレット中への細胞の単離、などの手法を用いて 1 細胞ごとに分離した細胞を解析する技術が発達してきた。これらの解析においては「1 細胞」が「最少の単位」であったが実際には神経細胞の様に高度に極性を持つ細胞 (単一細胞内でも樹状突起と軸索で大きく機能が異なる) の場合には細胞内の局所ごとの Subcellular level での解析が必要になる。しかしながら上に挙げた既存のテクニックを用いる際には、細胞の形状・特性やその細胞が置かれていたコンテキストの情報は失われてしまいその結果、ニューロン中の特定の形状や特性を持ったコンパートメントについて細胞生物学的な解析を行うことは未だに非常に難しい。本研究では SICM-蛍光顕微鏡の相関顕微鏡技術を開発することで、ナノメートルレベル、フェムトリットルレベルのこれまでにない精度でニューロンについて検討を行った。その結果、初めてニューロンの特定の区画からミトコンドリアを採取することに成功した。さらに、PCR を用いることでそれぞれのミトコンドリアにおける mtDNA の量を定量することに成功した。

今後は本研究結果をもとに、いかにして軸索における mtDNA が制御されているのか、またこの mtDNA 量の制御にどのような意義があるのかを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 シナプス前終末における小胞体-ミトコンドリア接触の役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平林 祐介, 櫻井 結衣, 菅 翔吾, 壺井 將史
2. 発表標題 小胞体 - ミトコンドリア接触の制御と役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------