

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670495

研究課題名(和文)角化におけるミトコンドリアの関与の検討

研究課題名(英文)Contribution of mitochondria to keratinization

研究代表者

阿部 理一郎(Abe, Riichiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60344511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、細胞内のエネルギー産生やアポトーシスなど様々な細胞応答において重要な役割を担っている。ミトコンドリアは細胞内で頻りに融合と分裂を繰り返すオルガネラであり、ミトコンドリアの融合に機能する蛋白質として、Mfn(Mfn1, Mfn2)などがある。表皮の分化についてはアポトーシスが関与していると考えられているが、詳しい機序は未だ不明である。本研究より、Mfn1とMfn2は表皮の層において発現が異なり、Mfn2は基底層のみで発現し、Mfn1は基底層より上層の有棘層のみに発現することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria play critical roles in many cellular processes, including cell death. Recently, it is reported that mitochondrial fission/fusion processes are important for cell death. Mitochondrial morphologies are regulated by several GTPases: fusion is mediated by mitofusin 1 (Mfn1) and Mfn2. Proper mitochondrial dynamics are critical for human health. Keratinization requires strict regulation of keratinocyte proliferation and cell death. However, the role of mitochondria in keratinization remains obscure. We showed that mitochondria in keratinocyte cells were distributed in the perinuclear regions. No difference in mitochondrial morphology between the basal and the suprabasal cells. However, the number of mitochondria per cell was significantly higher in the suprabasal cells than in the basal cells. We found that the expression patterns of Mfn1 and Mfn2 were quite different: Mfn1 was expressed in the suprabasal cells, whereas Mfn2 was expressed only in the basal cells.

研究分野：皮膚科

科研費の分科・細目：皮膚免疫学

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、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。

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(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があるか検討する。また上述のように有棘層では Mfn1 の発現のみがみられる。Keratin1,10 遺伝子変異を有する表皮融解性魚鱗癬においてミトコンドリアの分布・形態異常について観察する。

(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 または

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。

Keratin 14 promoter-Cre マウスと Mfn1 および Mfn2-flox マウスを用いて、表皮特異的MfnまたはDrp1 ノックアウトマウスを作成する。表皮の形態を病理学的、かつ超微細構造の解析を行い、角化との関連性を検討する。Mfn1 の欠損で角化不全が起こることなどが予想される。

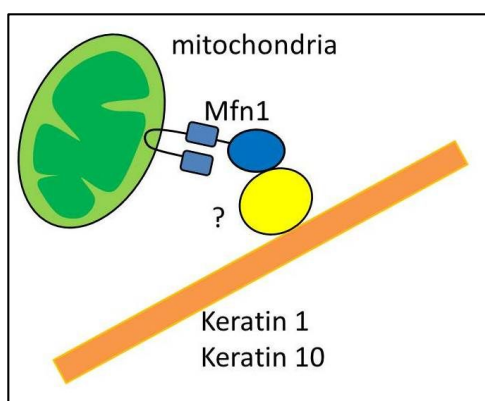
(4) Keratin と Mfn を結びつけるタンパクを同定する。

Keratin5,14 と Mfn2 を結びつける trichoplein のように、keratin1,10 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。

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する。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。

候補タンパクの同定後、免疫組織学的に表皮細胞内の局在を検討し、ミトコンドリアおよび keratin1,10 との空間的結びつきについて検討する。

さらに siRNA などの手法で、候補タンパ



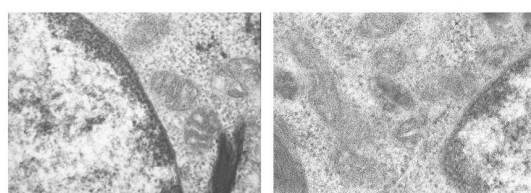
クの発現を抑制することで、ミトコンドリアの機能への影響、および角化現象への影響などを検討する。

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。

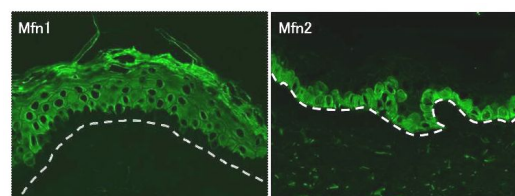
分裂融合にかかわる GTP 加水分解酵素において、興味深いことに Mfn2 は基底層のみに発現がみられ、Mfn1 は有棘層のみに発現がみられた。これまでの報告で Mfn2 は trichoplein により keratin5,14 と結合することが報告されており、keratin の発現パターンによりミトコンドリアの融合を担う酵素の発現パターンが変化することが示唆される。さらには Mfn の subtype の発現で keratin の発現パターンが影響される可能性もある。



正常

表皮融解性魚鱗癬

患者表皮において、ミトコンドリアの分布異常がみられた。有棘層表皮細胞においてミトコンドリアの量的ばらつきがみられ、細胞分布にも正常表皮と比較し、偏りがみられた。電子顕微鏡による観察では、形態異常はみられなかった。



分裂融合にかかわる GTP 加水分解酵素においても、有棘層表皮細胞における Mfn2 の発現のばらつきがみられる一方、基底層の Mfn2 の発現は正常表皮とほぼ同様であった。

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0件)

[学会発表](計1件)

Asuka Suto, Riichiro Abe
The mitochondria fusion proteins Mfn1 and Mfn2 are involved in keratinization

The 4th international Symposium on Dynamics
of Mitochondria
2013年10月28日～2013年11月1日
Okinawa Zanpamisaki Royal Hotel(Yomitan
Village)
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部理一郎 (ABE, Riichiro)
北海道大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60344511

(2) 研究分担者

藤田 靖幸 (FUJITA, Yasuyuki)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：80374437

(3) 連携研究者

須藤 明日香 (SUTO, Asuka)
北海道大学・医学研究科・大学院生
研究者番号：なし