

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830053

研究課題名(和文) Necdin - Sirt1 複合体によるミトコンドリア制御機構

研究課題名(英文) Regulation of mitochondrial biogenesis and function by necdin-Sirt1 complex

研究代表者

長谷川 孝一 (Hasegawa, Koichi)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：20546783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの生合成や機能を制御する転写補因子PGC-1 と、ニューロンの分化や生存に關与するnecdinによる、ミトコンドリアの生合成と、ミトコンドリア障害からの神経の防御機構について検討した。NecdinはPGC-1 のユビキチン-プロテアソーム経路を介した分解を阻害し、PGC-1 の安定化を正に制御し、ミトコンドリアの生合成と、ミトコンドリア障害に対する神経保護作用を促進する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：I examined the regulation of mitochondrial biogenesis and the mechanism of neuroprotection against mitochondrial insults by necdin and PGC-1 . Necdin suppressed PGC-1 degradation via ubiquitin-proteasome pathway to promote mitochondrial biogenesis and to protect neurons against mitochondrial insults.

研究分野：総合生物

キーワード：ミトコンドリア 神経変性疾患 PGC-1alpha Necdin パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

ニューロンの分化過程で発現が誘導される遺伝子の探索において、Necdin が分離、同定された (Maruyama et al., 1991, *Biochem Biophys Res Commun* 178:291-296.)。申請者が所属する研究室によって行われてきた解析の結果、Necdin は種々の転写因子 (E2F1、p53 など) や膜蛋白質 (p75、TrkA) と相互作用し、細胞増殖抑制、ニューロンの生存維持及び、分化促進に重要な役割を果たしている事が明らかとなった (Taniura et al., 1998, *J Biol Chem* 273:720-728., Kuwako et al., 2005 *J Neurosci* 25:7090-7099.)。なかでも、がん抑制遺伝子産物 p53 やフォークヘッド型転写因子 Foxo1 はアセチル化修飾を受ける事で転写活性が増強されるが、Necdin は脱アセチル化酵素 Sirt1、p53 または Foxo1 と安定的な三者複合体を形成して、これら因子の脱アセチル化を促進し、転写因子の機能阻害をする事が明らかとなった (Hasegawa and Yoshikawa, 2008, *J Neurosci* 28:8772-8784., Hasegawa et al., 2012, *J Neurosci* 32:5562-5572.)。さらに、Necdin はニューロンのみならず同じく最終分化した骨格筋でも高発現しており、分化や生存維持に関与している。脳や骨格筋はヒトの組織において特に多くのエネルギーを必要とする組織であり、そのためにはミトコンドリアを介する ATP 合成が必要不可欠である。一方、Sirt1 は上記以外にもエネルギー代謝や寿命に関与する様々な因子を基質とする事が示唆されている (Bordone and Guarente, 2005, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:298-305.)。この内、核内受容体スーパーファミリーに属する PPAR $\gamma$  の活性化補因子である PGC-1 $\alpha$  は、ミトコンドリアの生合成に関与し、ATP 産生に多大な役割を担っている。また、抗酸化作用を有する酵素群の転写を活性化し、細胞毒性のある活性酸素種を減弱化することによって細胞の生存を維持する役割も持つ (Puigserver et al., 1998, *Cell* 92:829-839.)。近年、ミトコンドリアの機能低下は、神経変性疾患の発症に深く関与しているとされ、注目を集めている (Lin and Flint Beal, 2006, *Nature* 443:787-795., Knott et al., 2008, *Nature Rev Neurosci* 9:505-518.)。脳を構成するニューロンは体全体の 20% 程度のエネルギーを情報処理や生命活動維持に利用しているため、エネルギー産生のある場であるミトコンドリアの機能低下や枯渇は、ニューロンの活動維持に極めて甚大な影響を及ぼす。ミトコンドリアの機能低下が蓄積されると、神経変性疾患で見られる様なニューロンの脱落が起こり、その結果、認知症や運動機能障害を引き起こす事になる。PGC-1 $\alpha$  は筋肉、肝臓や褐色脂肪組織で上記の作用を持つ事が報告されているが、中枢神経系における役割に関してはあまりよく理解されていないのが現状である。そこで本応募研究課題では、Necdin-Sirt1 複合体が脱

アセチル化を介して PGC-1 $\alpha$  の活性を制御し、ミトコンドリアの機能低下や活性酸素種によって誘導されるニューロン死を抑制する、という着想に至った。この分子メカニズムの解明は、神経変性疾患の発症機構の解明に貢献するだけでなく、これらの疾患の予防や治療方法の開発にも応用出来ると考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患と、ミトコンドリアの機能異常との関連性が注目を集めている。Sirt1 は、細胞の生存や寿命に関連する種々の蛋白質を脱アセチル化することにより活性を調節する。PGC-1 $\alpha$  は Sirt1 の基質の一つであり、細胞におけるミトコンドリアの生合成や活性に関わる遺伝子の発現を統御している。一方、Necdin はニューロンにおける Sirt1 の正の調節因子である。本研究では、Necdin-Sirt1 複合体による PGC-1 $\alpha$  の活性調節を介したミトコンドリアの制御とニューロンの生存との関連を明らかにすることにより、神経変性疾患の成因や治療法開発のための分子基盤の解明を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) PGC-1 $\alpha$ に対する分子制御機構の解明

予備的実験では、Necdin は PGC-1 $\alpha$  と結合し、両者を共発現させた場合、PGC-1 $\alpha$  のタンパク質レベルが顕著に増加することが認められた。PGC-1 $\alpha$  はユビキチン化による分解制御を受けるため、PGC-1 $\alpha$  の発現増加とユビキチン E3 リガーゼとの関係性について検討する。また、PGC-1 $\alpha$  は Sirt1 による脱アセチル化により活性が正に制御されているため、Necdin がこの脱アセチル化を促進し、機能増強に関与するかどうかについても検討する。

### (2) ミトコンドリアの生合成

PGC-1 $\alpha$  はミトコンドリアの生合成を正に制御するマスタータンパク質であるといえる。本研究では Necdin 欠損マウスにおけるミトコンドリアを重点的に解析し、それらに関与する因子の発現量解析や電気生理学的手法を用いた機能解析を行い、分子制御機構との相関性について検討する。

### (3) 神経変性疾患の予防及び治療法の探索

上記で述べた基礎的な情報に基づき、Necdin を過剰発現するレンチまたはアデノ随伴性ウイルスベクターを用いて、神経変性疾患モデルマウスや老齢マウスに施術し、ニューロンにおけるミトコンドリアの数や機能回復の有無を検討し、これら疾患の遺伝子治療の応用を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) PGC-1 $\alpha$ に対する分子制御機構の解明

PGC-1 $\alpha$  はユビキチン化による分解制御を受

けるため、PGC-1 $\alpha$ の発現増加とユビキチン E3 リガーゼとの関係性について検討した。PGC-1 $\alpha$ のユビキチン E3 リガーゼとして知られている Rnf34 と Fbxw7 をクローニングし、PGC-1 $\alpha$ のユビキチン化検出系を用いて検討した結果、necdin はユビキチン化を抑制し、PGC-1 $\alpha$ の安定化に寄与している事が明らかとなった。また、necdin、PGC-1 $\alpha$ 及び、Sirt1 の物理的、機能的相互作用を検討した結果、三者は複合体を取りうる事を免疫沈降法により確認したが、Sirt1 が PGC-1 $\alpha$ の発現を不安定化し、PGC-1 $\alpha$ の活性については十分な検討が出来なかった。そのため、以下は、necdin と PGC-1 $\alpha$ の相互作用を中心に解析を進める事とした。

#### (2)ミトコンドリアの生合成

Necdin 欠損マウスにおける PGC-1 $\alpha$ とミトコンドリア構成因子の発現量を検討した結果、それらの発現量は減少しており、また、ミトコンドリアの数や活性についても有意に減少していた。マイクロアレイを用いてミトコンドリア関連因子の発現量を mRNA レベルで検討した結果も、タンパク量と相関性を示した。これらの結果から、necdin はミトコンドリアの生合成と機能を正に制御している事が示唆された。

#### (3)神経変性疾患の予防及び治療法の探索

Necdin を過剰発現するレンチまたはアデノ随伴性ウイルスベクターを用いて、神経変性疾患モデルマウスの一つであるパーキンソン病モデルマウスや高齢マウスの中脳黒質にマイクロインジェクションし、ニューロンにおけるミトコンドリアの数や機能回復の有無を検討した結果、PGC-1 $\alpha$ とミトコンドリア構成因子の発現量は増加し、ミトコンドリア障害に対する神経保護作用が示された。つまり、necdin はパーキンソン病を始めとするミトコンドリア障害が関与する神経変性疾患の遺伝子治療、予防に応用出来得ると考えられる。

#### 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)

[雑誌論文](計5件)

- (1)Koichi Hasegawa, Toru Yasuda, Chinatsu Shiraishi, Kazushiro Fujiwara, Serge Przedborski, Hideki Mochizuki and Kazuaki Yoshikawa, Promotion of mitochondrial biogenesis by necdin protects neurons against mitochondrial insults, Nature Communications 7:10943, 2016. doi: 10.1038/ncomms10943. 査読有

り

- (2) Izumi Fujimoto, Koichi Hasegawa, Kazushiro Fujiwara, Masashi Yamada and Kazuaki Yoshikawa, Necdin controls EGFR signaling linked to astrocyte differentiation in primary cortical progenitor cells, Cellular Signalling 28(2):94-107, 2016. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.11.016. 査読有り

- (3) Ibrahim Gur, Kazushiro Fujiwara, Koichi Hasegawa and Kazuaki Yoshikawa, Necdin Promotes Ubiquitin-Dependent Degradation of PIAS1 SUMO E3 ligase, PLoS ONE 9(6):e99503, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0099503. 査読有り

- (4) Ryohei Minamide, Kazushiro Fujiwara, Koichi Hasegawa and Kazuaki Yoshikawa, Antagonistic Interplay between Necdin and Bmi1 Controls Proliferation of Neural Precursor Cells in the Embryonic Mouse Neocortex, PLoS ONE 9(1):e84460, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0084460. 査読有り

- (5) Zhenyu Huang, Kazushiro Fujiwara, Ryohei Minamide, Koichi Hasegawa, and Kazuaki Yoshikawa, Necdin controls Proliferation and Apoptosis of Embryonic Neural Stem Cells in an Oxygen Tension-Dependent Manner, The Journal of Neuroscience 33(25):10362-10373, 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5682-12.2013. 査読有り

[学会発表](計14件)

- (1) Koichi Hasegawa, Toru Yasuda, Chinatsu Shiraishi, Kazushiro Fujiwara, Hideki Mochizuki, Kazuaki Yoshikawa: Necdin

- promotes mitochondrial biogenesis to prevent neurodegeneration in experimental Parkinson's disease Neuroscience 2015 45<sup>th</sup> Annual Meeting, Chicago IL, 2015, 10, 21
- (2) Izumi Fujimoto, Koichi Hasegawa, Kazushiro Fujiwara, Kazuaki Yoshikawa: Necdin downregulates EGFR signaling in cortical neural precursor cells to suppress gliogenesis Neuroscience 2015 45<sup>th</sup> Annual Meeting, Chicago IL, 2015, 10, 20
- (3) 吉川和明、長谷川孝一、安田徹、望月秀樹: Promotion of neuronal mitochondrial biogenesis by necdin: Neuroprotection in experimental Parkinsonism (Necdinによるニューロン内ミトコンドリア生合成の促進: 実験的パーキンソンニズムにおける神経保護) 第38回日本神経科学学会大会、神戸、2015、7、29
- (4) Kazushiro Fujiwara, Koichi Hasegawa, Kazuaki Yoshikawa: Necdin regulates RanGAP1 sumoylation during neuronal differentiation Neuroscience 2014 44<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, 2014, 11, 15
- (5) 藤本泉、長谷川孝一、藤原一志郎、吉川和明: Necdinによる上皮成長因子受容体シグナルの制御機構 第87回日本生化学会大会、京都、2014、10、18
- (6) 長谷川孝一、安田徹、白石千夏、藤原一志郎、望月秀樹、吉川和明: Necdin promotes mitochondrial function in neurons: neuroprotection in Parkinson's disease models (Necdinによるニューロン内ミトコンドリア機能の促進: パーキンソン病モデルにおける神経保護作用) 第57回日本神経化学学会大会、奈良、2014、9、30
- (7) 藤本泉、長谷川孝一、藤原一志郎、吉川和明: Necdin天然変性領域の機能解析 第86回日本生化学会大会、横浜、2013、9、12
- (8) 藤原一志郎、長谷川孝一、吉川和明: NecdinによるRanGAP1のSUMO化制御 第86回日本生化学会大会、横浜、2013、9、12
- (9) 片山雄太、藤原一志郎、長谷川孝一、吉川和明: 神経発生における哺乳類 Smc5/6複合体要素の発現と安定化 第86回日本生化学会大会、横浜、2013、9、12
- (10) 長谷川孝一、白石千夏、藤原一志郎、吉川和明: NecdinによるPGC-1 $\alpha$ を介した
- ニューロン内ミトコンドリア機能の促進 第86回日本生化学会大会、横浜、2013、9、11
- (11) Ibrahim Gur, Kazushiro Fujiwara, Koichi Hasegawa, Kazuaki Yoshikawa: Necdin suppresses PIAS1 SUMO E3 ligase activity by promoting ubiquitin-dependent degradation 第86回日本生化学会大会、横浜、2013、9、11
- (12) 橋長秀典、長谷川孝一、藤原一志郎、吉川和明: Necdin regulates neural progenitor cell proliferation in the subventricular zone (Necdinは脳室下帯における神経前駆細胞の増殖を制御する) 第56回日本神経化学学会大会 (Neuro2013)、京都、2013、6、22
- (13) 南出良平、長谷川孝一、藤原一志郎、吉川和明: Regulation of neural stem cell proliferation via antagonistic interplay between necdin and Bmi1 (NecdinとBmi1の拮抗的相互作用による神経幹細胞の増殖制御) 第56回日本神経化学学会大会 (Neuro2013)、京都、2013、6、22
- (14) 長谷川孝一、白石千夏、藤原一志郎、吉川和明: Necdin promotes mitochondrial biogenesis via PGC-1 $\alpha$  stabilization in neurons (NecdinによるPGC-1 $\alpha$ の安定化を介したニューロン内ミトコンドリア生合成の促進) 第56回日本神経化学学会大会 (Neuro2013)、京都、2013、6、22
- 〔その他〕  
大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質高次機能学研究部門 神経発生制御研究室ホームページ  
[http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index\\_jap.html](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index_jap.html)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
長谷川 孝一 (HASEGAWA KOICHI)  
大阪大学・たんぱく質研究所・助教  
研究者番号: 20546783