

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860133

研究課題名(和文) ミトコンドリアダイナミクスによる脳の発達制御と精神疾患発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Involvement of mitochondrial dynamics in brain development and pathogenesis of psychiatric disorders

研究代表者

高村 明孝 (Takamura, Hironori)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：80514398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ミトコンドリアダイナミクスメカニズムに注目し、脳の発達と精神疾患発症メカニズムの解明を目指して研究を行った。その結果、ミトコンドリア分子と小胞体分子の新規結合を明らかにし、その結合がミトコンドリア形態・機能制御に重要な役割を果たしている可能性を示した。一方で、同じく脳機能制御に関与し、ミトコンドリア機能制御に重要な役割を果たしているタンパクSUMO化について検討し、複数のSUMO化候補因子を同定した。その中でも脳機能制御への関与が強く示唆される分子に注目して研究を進め、SUMO化によるそれら因子の機能制御を観察した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on mitochondrial dynamics and observed the effects of the dynamics on brain development and psychiatric disorders. As results, we found interaction between the mitochondrial molecule and the molecule in endoplasmic reticulum, and also revealed that the interaction is important to regulate mitochondrial morphology and function. On the other hand, we observed SUMOylation, which has been reported to have important roles in brain function and mitochondrial function. We identified some potential SUMOylated proteins and studied the effect of SUMOylation on the proteins.

研究分野：神経科学・神経解剖学

キーワード：ミトコンドリア 脳発達 精神疾患 SUMO化

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは内部に独自のゲノム(mtDNA)を持つ2重膜構造の細胞内小器官であり、酸素呼吸を行い、エネルギー産生を始めとした様々な細胞内の代謝経路やアポトーシス誘導経路において中心的な役割を果たし、生命活動維持に重要な役割を果たしている。これまでに、ミトコンドリア異常と様々な疾患の関連が報告されている。例えば、mtDNAの変異によって引き起こされるミトコンドリア病は特に脳や骨格筋、心筋に異常をきたす。また、パーキンソン病やアルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患、双極性障害や自閉症をはじめとした精神疾患においてもミトコンドリアとの関連が報告されている。しかしながら、国内外で多くの研究が行われているものの、どのようにしてミトコンドリアの異常が疾患発症に結びつくのか、その詳細については不明な点が多い。

一方で近年、ミトコンドリアが分裂と融合を繰り返し、形態を劇的に変化させながらその機能制御・維持を行うことが明らかとなった。このような「ミトコンドリアダイナミクス」が注目され、前述の疾患だけではなく様々な分野においてミトコンドリアダイナミクスとの関連が報告されつつある。これまでに、ミトコンドリア融合因子としてMfn1、Mfn2、OPA1、ミトコンドリア分裂因子としてDrp1、Fis1、Mffといった分子が報告されており、これらが中心となってそのバランスによってミトコンドリアダイナミクスが制御されていると考えられている(図1)。前

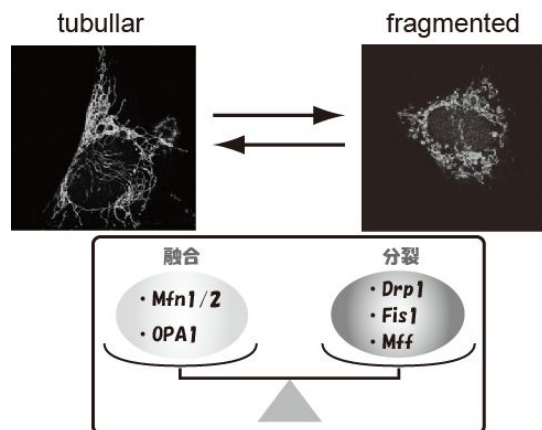


図1 ミトコンドリアダイナミクス
ミトコンドリアの形態は劇的に変化し、その変化は分裂因子と融合因子のバランスによって制御される

述の通り、精神疾患発症においてミトコンドリア機能異常の関与が報告されている一方で、ミトコンドリアダイナミクスと様々な疾患との関連が数多く報告されているものの、精神疾患とミトコンドリアダイナミクスとの関わりについての研究はあまり進んでいない。

これまでの研究において、脳の発達とミトコンドリアダイナミクスとの関連が報告されつつあり、脳の発達において、神経細胞のネットワーク・シナプス形成時にミトコンドリアが分裂し、適切な場所に配置されることが重要であることが報告されている。また、我々の研究グループではこれまでに脳機能制御分子の探索を行う中で、ミトコンドリア機能制御に関する複数の分子を同定した。

一方で、タンパク質 SUMO 化はタンパク質安定化、タンパク質輸送など様々な細胞内現象に關与するタンパク質翻訳後修飾のひとつである。SUMO 化は生体内の様々な現象において重要な役割を果たしていると考えられる。また、ミトコンドリアダイナミクスとの関連についても報告されており、ミトコンドリア分裂タンパクの1つであるDrp1の安定化がSUMO化によって制御されることが報告されている。我々の研究においてもミトコンドリア機能・脳機能制御にSUMO化が關与している可能性が示唆されている。

本研究課題ではこれまでに我々が同定した分子やタンパク質SUMO化に注目し、その機能解析を進める中でミトコンドリアダイナミクスと脳発達、脳機能や疾患との関連の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究課題ではミトコンドリアダイナミクスに注目し、我々がこれまでに同定した分子を中心としてその機能解析を行う。また、同じくミトコンドリアダイナミクス制御に關与するタンパク質SUMO化に注目し、その機能を詳細に検討することでミトコンドリアダイナミクスと脳機能、精神神経疾患の関連を明らかにすることを目指す。これらの研究から、疾患治療の新たなターゲットを将来的に提供することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題ではこれまでに我々の研究グループがミトコンドリア機能との関連、脳機能との関連を報告しているいくつかの分子に注目し、研究を進めた。

まず、ミトコンドリアと小胞体の相互作用に注目し、ミトコンドリア分子と小胞体分子の共局在をヒトグリオーマ細胞 KNS 細胞において、免疫細胞化学染色法を用いて観察した。また、実際の結合を観察するため、同様に KNS 細胞を用いて細胞抽出液を回収し、免疫沈降法およびウエスタンブロッティング法を用いた。さらに、実際のミトコンドリアの形態の違いを観察するため、正常なMEF細胞ならびに今回注目した小胞体分子の発現抑制細胞を用い、ミトコンドリア分子Mffの過剰発現と合わせてミトコンドリアマーカータンパクに対する抗体を用いた免疫

染色を行い、その形態の観察を行った。

一方で、同じくミトコンドリアダイナミクス並びに脳機能との関連が報告されているタンパク SUMO 化の解析として、まず SUMO1 トランスジェニックマウスを用いて質量分析法にて SUMO 化候補因子を探索した。さらに、得られた情報をもとに脳機能制御に重要な役割を果たしていると考えられる分子を中心に、SUMO 化による機能制御を、免疫染色法、ウエスタンブロッティング法を用いて観察した。

4. 研究成果

本研究課題ではミトコンドリアダイナミクスと脳機能の関連を目指して実験を行った。得られた結果は以下の通りである。

(1) ミトコンドリア分子と小胞体分子の結合

近年、細胞小器官同士の相互作用の重要性が報告されている。その中で、ミトコンドリアと小胞体はお互いに結合することで直接情報のやり取りをしており、互いの機能制御に重要な役割を果たしていることが報告されている。本実験では、前述のミトコンドリア分裂因子である Mff と小胞体分子であり、脳機能制御に関与する分子が実際に結合していることを明らかにした(図2, 3)。

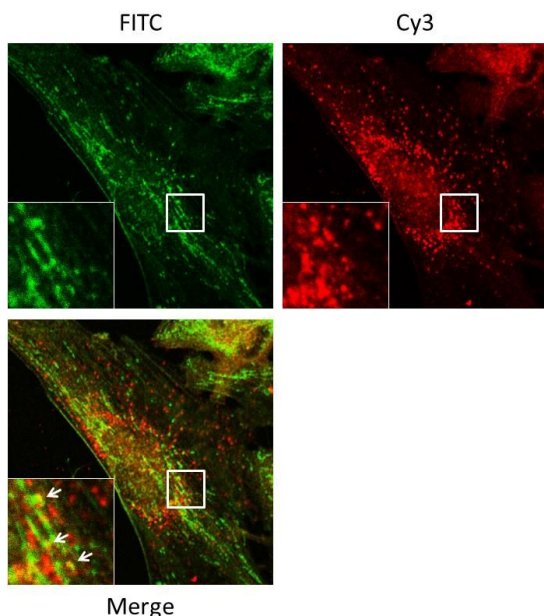


図2 ミトコンドリア分裂因子 Mff と小胞体分子の局在

ミトコンドリア分裂因子 Mff(FITC: 緑)は小胞体分子(Cy3: 赤)と共局在する。Merge における矢印は共局在の例(黄)を示す。

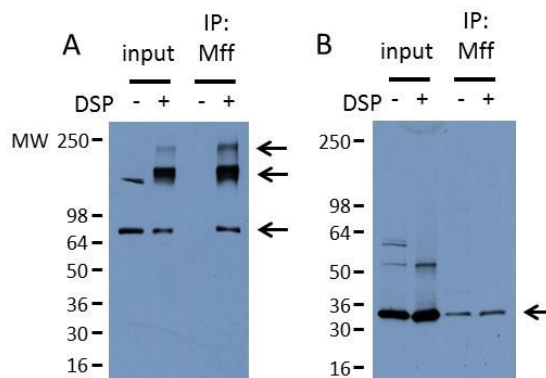


図3 ミトコンドリア分裂因子 Mff と小胞体分子の結合

A、ポジティブコントロールとしてこれまでに報告された Mff と Drp1 の結合を観察した。Mff と Drp1 の結合は DSP (Dithiobis(succinimidyl propionate): タンパク架橋剤)を用いた場合にのみ観察される(矢印)。

B、Mff と小胞体分子との結合(矢印)

(2) ミトコンドリア分子と小胞体分子の結合のミトコンドリア形態への影響

次に、ミトコンドリア形態を観察したところ、Mff 結合性小胞体分子の発現が Mff によるミトコンドリア形態制御に影響を与えていることが明らかとなった(図4)。

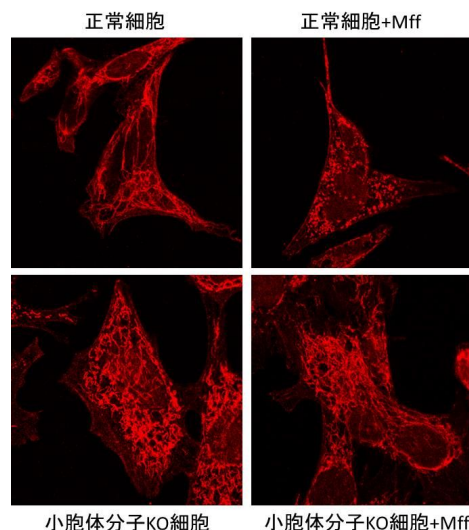


図4 ミトコンドリア形態の観察

正常な細胞では線維状につながったミトコンドリアがネットワークを形成しているのが観察される(左上)。ミトコンドリア分裂因子である Mff を過剰発現させた細胞ではミトコンドリアが断片化し、小さく独立して多数存在しているのが観察される(右上)。

一方で、小胞体分子の発現を抑制した細胞では、正常細胞と同じく線維状につながりネットワークを形成しており(左下)、また、Mff を過剰発現させてもその形態に変化は見られなかった(右上)。

このことから、ミトコンドリアと小胞体の相互作用が、ミトコンドリア形態の制御に大きく影響し、小胞体がミトコンドリア機能制御に大きく関与する可能性が示唆された。本小胞体分子は脳機能制御に関与することから、ミトコンドリアダイナミクスと脳機能制御に何らかの関連があると考えられる。

(3) SUMO 化候補因子の探索と機能解明
前述の通り、タンパクの SUMO 化はミトコンドリア形態・機能制御にも関与する、重要な翻訳後修飾の 1 つである。そこで我々は作成した SUMO1 トランスジェニックマウスを用い、SUMO 化候補因子の探索を行い、複数の SUMO 化候補因子を同定した。また、それら候補因子の中から脳機能や脳の発達に重要な役割を果たしている分子に注目しその分子の機能に対する SUMO 化の役割を検討した。その結果の 1 つとして、SUMO 化が脳機能、神経変性疾患関連分子である Tau の機能制御に重要な役割を果たしている可能性を示した。

本研究課題で得られた結果をもとにさらに詳細な研究が必要であるが、今後も本研究課題に関連して継続した研究を行うことで、ミトコンドリアダイナミクスのメカニズム、並びに脳発達や脳疾患メカニズムの解明につながると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 6 件)

Matsuzaki S, Takamura H, Katayama T, Fraser P. SUMOylation Pathways in Synaptic Development and Neurodegeneration. 第 89 回日本薬理学会年会 Mar 9-11, 2016, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

松崎 伸介、天野 元揮、向井 春香、佐藤 大樹、韓 薩日那、高村 明孝、三好 耕、片山 泰一. 神経系における Sumal Ubiquitin like Modifer 1 (SUMO1) の働き. 第 42 回 日本脳科学会 Nov 12-13, 2015, ANA ホリデイ・イン リゾート宮崎 (宮崎県宮崎市)

Matsuzaki S, Takamura H, Miyoshi K, Hashimoto H, Raught B, Arancio O, Katayama T, Fraser P. SUMO1 Overexpression Affects Synaptic Function, Spine Density and Memory. Neuroscience 2015 (Society for Neuroscience), Oct 17- 21, 2015, Chicago (USA)

Matsuzaki S, Takamura H, Amano G, Sato H, Han S, Miyoshi K, Fraser P, Katayama T. SUMO1 Affects Synaptic Function, Spine Density and Memory.

The 58th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Sep 11-13, 2015, 大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)

Takamura H, Yamada K, Matsuzaki S, Hazrati Lili-N, Katayama T, Fraser P. SUMOylation affects Tau accumulation in neurodegenerative diseases. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, July 28-31, 2015, 神戸国際会議場・神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

Matsuzaki S, Takamura H, Miyoshi K, Raught B, Arancio O, Fraser P, Katayama T. SUMO1 Overexpression Affects Synaptic Function, Spine Density and Memory. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, July 28-31, 2015, 神戸国際会議場・神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高村 明孝 (Takamura Hironori)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教
研究者番号 : 80514398