

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870614

研究課題名(和文)アルツハイマー病におけるMAMの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of MAM in Alzheimer's disease

研究代表者

長島 駿 (Shun, Nagashima)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：40634465

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)：ミトコンドリアと小胞体の接着点であるmitochondria-associated ER membrane (MAM)はアルツハイマー病の患者脳で増加することが報告され、アルツハイマー病とMAMの関係が示唆されている。本研究ではミトコンドリアユビキチンリガーゼMITOLがMitofusin2を介してMAM形成を制御することに着目し、大脳皮質、海馬特異的にMITOLを欠損させたマウスの解析を通じ、生体内におけるMAMの機能の解明を目指した。さらにアルツハイマー病の原因の一つであるアミロイドを産生し、MITOLを欠損したマウスを解析し、アルツハイマー病におけるMAMの機能解明を行った。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria-associated ER membrane (MAM), the contact site between mitochondria and ER, is closely related with Alzheimer disease because MAM is increased in brain of Alzheimer's disease patients. We previously reported that mitochondrial ubiquitin ligase MITOL regulates MAM formation via Mitofusin2. In this study, we analyzed brain-specific MITOL knockout mice in order to elucidate MAM functions in brain. Moreover, we also generated MITOL-deficient Alzheimer's disease mouse models so that we studied the roles of MAM in Alzheimer's disease.

研究分野：生化学

キーワード：mitochondria MAM Alzheimer's Disease

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはエネルギーを産生する細胞小器官である。ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返しながらその機能を維持している。ミトコンドリアに異常が生じるとアルツハイマー病を含め、様々な病気を発症することが知られている。

近年の研究では、ミトコンドリアと小胞体の接着点である mitochondria-associated ER membrane (MAM)がミトコンドリアのダイナミクス、アポトーシス、オートファジーなどの様々な機構に関与することが明らかとなり、注目を集めている。このMAMが神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病の患者脳で増加することが報告され、アルツハイマー病とMAMの関係が示唆されている。さらにMAM機能の亢進がアルツハイマー病の原因となるという仮説が提唱されていた。しかしながら、MAMが神経変性を抑制しているか増悪させているかの結論は未だについていない。MAMの役割を明らかにすることはアルツハイマー病の病態を明らかにし、アルツハイマー病の治療法の確立への寄与が期待される。

2. 研究の目的

ミトコンドリアと小胞体の接着点であるMAMがアルツハイマー病の患者脳で増加することが報告され、アルツハイマー病とMAMの関係が示唆されている。しかしながら、生体内のMAMの機能は未だに未知な部分が多く、MAMがアルツハイマー病を抑制するか増悪させるかは結論がついていない。本研究ではミトコンドリアユビキチンリガーゼMITOLがMfn2を介してMAM形成を制御することに着目し、大脳皮質、海馬特異的にMITOLを欠損させたマウスの解析を通じ、生体内におけるMAMの機能を明らかにする。さらにアルツハイマー病の原因の一つであるアミロイドβを産生し、MITOLを大脳皮質で欠損したマウスを作製し解析することにより、アルツハイマー病におけるMAMの機能を解明する。

3. 研究の方法

(1)大脳皮質・海馬・嗅球特異的なMITOL欠損マウスの解析

ミトコンドリアと小胞体の接着点(MAM)の機能を解明するために、MAM制御因子であるMITOLを大脳皮質、海馬特異的に欠損させたMITOLノックアウトマウス(MITOLeKO)を作製し、解析を行った。MITOLはMAM形成を促進することから、MITOLeKOの大脳皮質ではMAMが減少する。MITOLeKOの解析により、大脳皮質におけるMAMの機能の解明を行えると期待される。

(2) MITOL欠損アルツハイマー病モデルマウ

スの解析

アルツハイマー病におけるMAMの機能を解析するために、MAMの減少が認められたMITOLeKOとアルツハイマー病の原因の一つであるアミロイドβ42が異常に発現するマウス(アルツハイマー病モデルマウス:変異型APP^{swe}と9番目のエクソンを欠損したpresenilin 1を発現したマウス)を掛けあわせ、MITOL欠損アルツハイマー病モデルマウス(AD-MITOLeKO)を作成し、解析を行った。AD-MITOLeKOはアルツハイマー病の患者脳と同様にアルツハイマー病の原因となるアミロイドβが蓄積するが、MAMの減少が推測される。MAMの減少により、AD-MITOLeKOの病態が改善するか増悪するかを検討することで、アルツハイマー病におけるMAMの役割の解明を行った。

4. 研究成果

(1)大脳皮質・海馬・嗅球特異的なMITOL欠損マウスの解析

MITOLeKOの作製

MITOL flox/floxマウスと大脳皮質・海馬・嗅球特異的にCreを発現するEmx1-Creマウスを掛けあわせ、大脳皮質・海馬・嗅球特異的にMITOLを欠損するマウス(MITOLeKO)を作成した。MITOLを欠損した神経細胞においてもMAMが減少しているか検証するためにMfn2の複合体の形成量を比較した結果、MITOLeKOでMfn2の複合体形成量の低下が認められ、MITOLを欠損した神経細胞ではMAMの減少が示唆された。

発生期におけるMITOLeKOの解析

MAMが神経の発生や神経細胞の移動に必要であるか検討を行った。Nissel染色やクリューバレーラ染色を用いて解析した結果、8週齢のMITOLeKOの脳の層構造や軸索について大きな変化は認められなかった。しかしながら、胎生期のMITOLeKOをCux1抗体などの層構造のマーカーを用いて解析したところ、大脳皮質の層構造に乱れが認められた。MITOLは正常な発生に重要な機能を持つことが明らかとなった。

細胞死など神経変性の解析

TUNEL assayを用いて細胞死について検討した結果、MITOLeKOでは有意に細胞死の亢進が認められた。また、MITOLを欠損した大脳皮質ではGFAP抗体で染色されるアストログリアの肥大化および増加、IBA1抗体で染色されるミクログリアの活性化が認められた。MITOLの欠損は細胞死やグリオシスなどの神経変性を引き起こすことが示唆された。

MITOLeKOの行動解析

Open field testを用いて行動解析を行った結果、8週齢のMITOLeKOでは顕著な行動異常は認められなかった。しかしながら、生後1年経過したMITOLeKOをBarnes mazeテストを用いて記憶能力を比較した結果、

MITOLeKO は記憶能力の低下が認められた。
以上の研究結果より、MAM の減少は細胞死や個体の記憶能力の低下を引き起こすことから、アルツハイマー病における MAM の増加は細胞や個体を保護するために機能することが示唆された。

(2) MITOL 欠損アルツハイマー病モデルマウスの解析

アルツハイマー病における MAM の機能を解析するために、MITOLeKO とアルツハイマー病モデルマウスを掛けあわせ、AD-MITOLeKO を作成した。AD-MITOLeKO はアルツハイマー病モデルマウスと同様にアミロイドβ プラークやグリオーシスの亢進が認められた。さらに AD-MITOLeKO の個体の生存率を比較した結果、生存率の顕著な低下が認められた。MAM が減少したアルツハイマー病モデルマウスの生存率が低下したことから、アルツハイマー病において MAM は細胞を保護するために増加したことが示唆された。

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 3 件)

- (1) Homma, M., Nagashima, S., Fukuda, T., Yanagi, S., Miyakawa, H., Suzuki, E., and Morimoto, T.
Downregulation of Centaurin gamma1A increases synaptic transmission at Drosophila larval neuromuscular junctions. *Eur. J. Neurosci.* 40(8), 3158-3170 (2014)
doi: 10.1111/ejn.12681.
- (2) Nagashima, S., Tokuyama, T., Yonashiro, R., Inatome, R., and Yanagi, S.
Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. *J. Biochem.* 155(5), 273-279 (2014)
doi: 10.1093/jb/mvu016
- (3) 武田啓佑、徳山剛士、長島 駿、柳 茂
ミトコンドリアダイナミクスの制御シグナルと疾患。
実験医学増刊「知る・見る・活かす!シグナリング研究 2015 シグナル伝達の要素発見から時空間ダイナミクスへ」(第2章)シグナリングから見た生命現象 その破綻と疾患の理解 実験医学 33(10), 1591-1596 (2015)

[学会発表](計 11 件)

- (1) 長島 駿、杉浦 歩、徳山剛士、武田啓佑、稲留涼子、柳 茂 : Role of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial dynamics and diseases. 86回

日本生化学会大会 2013 9/11. 横浜

- (2) Nagashima, S., Takeda, K., Konishim, T., Inatome, R., and Yanag, S. : Role of MITOL in neuron. 11th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine ASMRM 2014, 2014, 11/14-15, Taipei
- (3) 柳 茂、福田 敏史、稲留 涼子、長島 駿 : CRAG による SRF 活性化を介した神経細胞の生存シグナル機構 第 37 回日本神経科学大会. 2014, 9/11, 横浜
- (4) 長島 駿、稲留涼子、柳 茂 : 神経回路形成関連分子 CRAG による生存シグナルと神経変性疾患への応用 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム「病態メカニズムへのオートファジーの多様な関与」. 2014, 10/18, 京都
- (5) 武田啓佑、長島 駿、徳山剛士、稲留涼子、柳 茂 : MITOL による小胞体-ミトコンドリア接着の制御と細胞死 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会 セクション 2「ミトコンドリアと酸化ストレス」. 2014, 12/3, 福岡
- (6) 長島 駿 : SBF-SEM を用いたミトコンドリアと小胞体の形態学的解析 SSSEM 研究部会&生理研研究会 合同ワークショップ「電子顕微鏡ビッグデータが拓くバイオメディカルサイエンス」~ 電子顕微鏡による生物構造情報の抽出 ~ レクチャーワークショップ 2015, 11/18, 岡崎 (招待講演)
- (7) 玉井 勇、長島 駿、福田敏史、稲留涼子、柳 茂 : CRAG によって形成される MitoTracker 陽性の核内封入体の解析 BMB 2015 第 88 回日本生化学会大会合同大会・第 38 回日本分子生物学会年会. 2015, 12/4, 神戸 4T7L-02(3P0025)
- (8) 玉井 勇、小林伶暉、長島 駿、柳 茂 : 神経回路形成関連分子 CRAG による生存シグナルと神経変性疾患への応用. A critical role of CRAG, a splicing variant of Centaurin- 3/AGAP3, in neuronal development and survival via Elk1-mediated SRF activation. 第 38 回日本神経科学大会. 2015, 7/29, 神戸
- (9) 長島 駿 : SBF-SEM を用いたミトコンドリアと小胞体の形態学的解析 SSSEM 研究部会&生理研研究会 合同ワークショップ「電子顕微鏡ビッグデータが拓くバイオメディカルサイエンス」~ 電子顕微鏡による生物構造情報の抽出 ~ 2015, 11/17, 岡崎
- (10) 玉井 勇、長島 駿、福田敏史、稲留涼子、柳 茂 : CRAG によって形成される MitoTracker 陽性の核内封入体の解析 BMB 2015 第 88 回日本生化学会大会合同大会・第 38 回日本分子生物学会年会. 2015, 12/3, 神戸
- (11) 徳山剛士、武田啓佑、長島 駿、松下暢子、毛利聡、若月修二、柳 茂 : MITOL

によるミトコンドリア形態制御が心機能へ与える影響 2015, 12/1, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

長島 駿 (NAGASHIMA SHUN)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：40634465

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：