

遺伝性神経変性症の病態解明に向けた、CCP1 蛋白質とミトコンドリアの動態解析

【代表者】 荒木亜寿香 島根大学 医学部附属病院病理部 准教授

【共同研究者】 山本 達之 島根大学 生物資源科学部 教授
青木 薫 米子工業高等専門学校 物質工学科 教授

【研究の目的と内容】

本研究の学術的背景と目的：

ミトコンドリア機能の異常が、がんや炎症、神経変性疾患など様々な疾患発症の原因となる事がわかっている。そのうちの神経変性疾患に、乳児期に発症する遺伝性神経変性疾患の1つである、Cytosolic carboxypeptidase (CCP) 1 (別名 Nna1) 遺伝子異常を背景に持つ希少疾患がある。この疾患に見られる小脳萎縮や小脳失調症は、小脳プルキンエ細胞に原因があると推測される。しかし、この疾患が希少であり、小脳という病変部位から、ヒトの組織を用いた疾患の解析や治療法の開発は難しい。このような場合にマウスなどの疾患モデル動物を用いた疾患の解析が、ヒトの疾患の解明に必須である。

研究代表者の所属する教室で分離・系統維持されている Ataxia and male sterility (AMS) マウスは、CCP1 遺伝子異常を持つことから、上記のような小脳失調症 (ataxia) の疾患モデル動物である。この動物モデルを用いて、ヒト遺伝性神経変性症の病態を解明し、治療法開発に発展させることが最終目的である。

昨年度までの研究進行状況と本年度の研究目標：

生後 15 日ごろは小脳プルキンエ細胞が登上線維とシナプス形成が完了する時期であり、小脳の発達に重要な時期であると考えられる。昨年度までの実験で、生後 15 日以降の AMS マウスではミトコンドリア融合因子 MFN の1つである MFN2 と CCP1 が、ともに免疫組織化学的に減少していたことを考慮すると、

CCP1 機能不全に伴い、AMS マウスのプルキンエ細胞内に融合型ミトコンドリアが少ない、つまり活性型のミトコンドリアが少ないのではないかと考察した。

生後 15 日にプルキンエ細胞の軸索でミトコンドリアのクリステの構造異常が見られたことを考慮すると、CCP1 が機能しないために、ミトコンドリアの分離融合がうまくいかず、プルキンエ細胞死に至る可能性が考えられる。

以上の結果より、生後早期に完全な機能を持つ CCP1 がプルキンエ細胞内にあることが、プルキンエ細胞の成熟に必須だと考えられる。

本年度は小脳プルキンエ細胞と同様に選択的に細胞死が起きる精巣精子形成細胞にも注目し、小脳プルキンエ細胞と精子形成細胞におけるミトコンドリアの動態や機能がどのように変化するのか調べる、これを当初の目的とした。

【研究の成果（本研究によって得られた知見、成果、論文、学会発表、外部資金への応募見込み等）

方法と結果：

方法 1. ミトコンドリアの量を調べる

小脳および精巣組織ホモジネート中のミトコンドリアに含まれるシトクロム C の量を、キットを利用して測定する。

結果：新型コロナウイルス感染拡大のため、キットを全く入手できず、結果を得ることができなかった。

方法 2. ミトコンドリアの活性を調べる

小脳および精巣組織ホモジネートに含まれるシトクロム C 量を経時変化を測定し、ミトコンドリアの活性として評価する。組織ホモジネートからミトコンドリア抽出液を作成する。

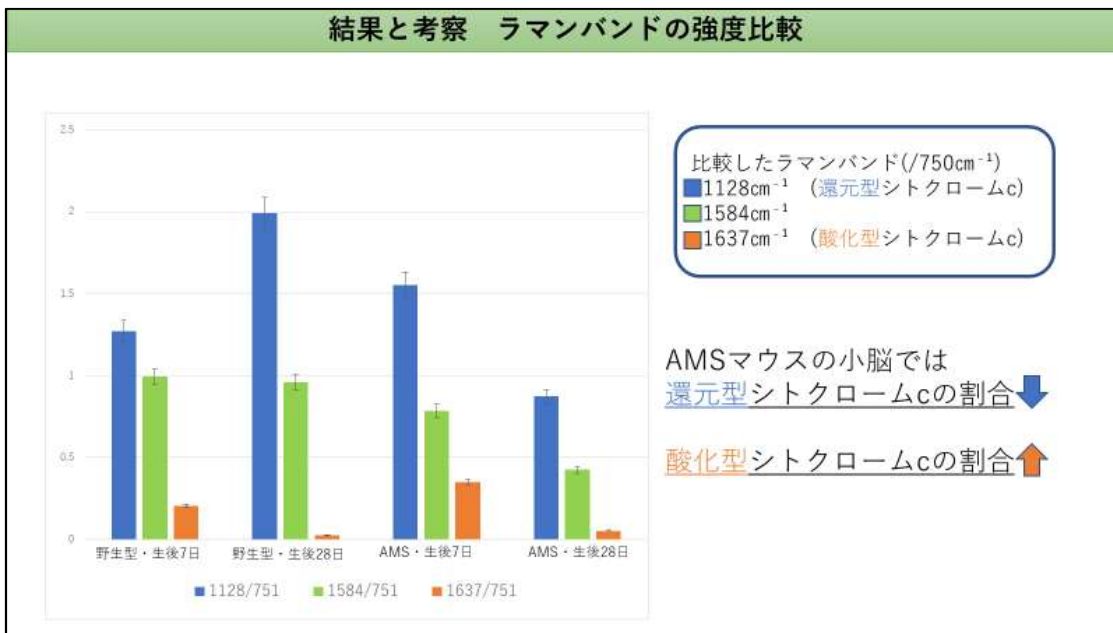
結果：こちらも 1 同様に新型コロナウイルス感染拡大のため、キットを全く入手できず、結果を得ることができなかった。

方法 3. ラマン分光法による解析

小脳組織よりミトコンドリア抽出液を作成し、ラマン分光装置にかけ、ラマンスペクトルを測定する。スペクトルの違いから酸化型ミトコンドリアと還元型ミトコンドリアの量を解析する。

結果：まずシトクロム c 標準物質のラマンバンドを測定したところ、シトクロム c で最も強度が大きいラマンバンドは 750 付近、酸化型および還元型シトクロム c に特異的に現れるラマンバンドはそれぞれ 1635 と 1128 であった。そこでミトコンドリア抽出液の測定では、750 付近のラマンバンドをシトクロム c のマーカーバンドとして測定した。解析サンプルである生後 7 日と 28 日の AMS 及び野生型マウスの小脳組織由来ミトコンドリア抽出液においてシトクロム c のラマンバンドの出現パターンに違いは見られなかった。しかしラマンバンドの強度に違いが見られた。野生型マウスは生後 7 日から 28 日にかけて還元型シトクロム c の強度が増加したのに対して、AMS マウスではその強度は減少していた。また野生型マウスと比べて、AMS マウスは生後 28 日で還元型シトクロム c の割合が少なく、酸化型シトクロム c の割合が多かった。

結果と考察 ラマンバンドの強度比較



まとめと考察：

AMS マウスの小脳では、野生型マウスのそれと比べて、生後 7 日から 28 日にかけて酸化型シトクローム c が多くなることが推察された。野生型マウスではこの時期に還元型シトクローム c の割合が多いことを考慮すると、AMS マウスの小脳の組織・細胞内で酸化型と還元型シトクローム c のバランスが悪いことが示唆された。このため AMS マウスの小脳ではミトコンドリアの呼吸鎖が正しく機能していない可能性が考えられ、その結果、小脳の細胞が機能するのに十分な ATP が生産できず、エネルギー不足になることや、溜まったシトクローム c が細胞質へ流出して細胞死（アポトーシス）を誘導することが考えられた。