

## 遺伝性神経変性症の病態解明に向けた、CCP1 蛋白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 医学部器官病理学 講師

【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 教授

### 【研究の目的と内容】

一般に神経変性疾患の発症の一因にミトコンドリアの機能異常がある。研究代表者がこれまで研究してきた蛋白 Cytosolic carboxypeptidase (CCP) 1 (別名 Nna1) が、ミトコンドリアと関係して機能するという論文や、ヒトの遺伝性神経変性症の中に、CCP1 蛋白をコードする遺伝子 *CCP1* の異常を原因に持つ疾患が存在することが、近年報告されている。そこで、CCP1 蛋白は生後の小脳の発達に関与し、CCP1 蛋白の小脳組織内での局在は、ミトコンドリアの動態・機能に関係するのではないか、という学術的問いが生まれた。本研究は、*CCP1* 遺伝子異常を発症前に遺伝子診断できる Ataxia and male sterility (AMS) マウスと、試料を低侵襲で分析することが可能なラマン分光法を利用した実験である。ヒト遺伝性神経変性症の病態解明や治療法の開発に繋げることが、本研究の目的である。下記のように仮説を立て、これを検証する形で実験を行った。

**仮説 1.** 小脳におけるミトコンドリアの融合・分裂の程度は、CCP1 の局在と関係する。特に小脳失調症発症前後において、融合・分裂の程度が軸索側と細胞体内で異なる。

**仮説 2.** AMS マウスのプルキンエ細胞内のミトコンドリアは、融合・分裂のバランスが悪いため、ミトコンドリアの機能不全を起こしている。

### 実験材料：

小脳失調症を発症する AMS マウス (*ams*<sup>-/-</sup>) を実験群 (以降 AMS と表記)、正常形質の野生型マウス (*ams*<sup>+/+</sup>) を対照群 (以降 WT と表記) とした。各群の生後 7 日と 15 日のマウスを発症前週齢群、生後 21 日と 28 日のマウスを発症後週齢群にわけた。それぞれより採取する小脳組織を実験材料に用いた。

### 仮説 1 に対する検証実験：

実験材料より組織切片を作成し、免疫組織化学的にミトコンドリア融合・分裂に関係する蛋白の発現を調べた。融合に関与する蛋白 mitofusin (Mfn1/Mfn2) を融合マーカー、分裂に関与する蛋白 mitochondrial fission factor (MFF) 分裂マーカーとした。上記のマーカーの発現が、マウスの 2 実験群や発症前後の群で異なるのか定性解析・半定量解析した。同じ組織切片にラマン分光測定を用い、ラマンスペクトルに違いがあるか解析した。

### 仮説 2 に対する検証実験：

実験材料からミトコンドリア単離キットを用いて酵素活性を保持するミトコンドリアを単

離する。単離溶液を利用して、ミトコンドリア活性を測定アッセイキットで調べる。マウスの2実験群や発症前後でミトコンドリア活性やラマンスペクトルに違いがあるのか解析する。

**【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）】**

1. CCP1 蛋白の局在（別紙図1）

小脳プルキンエ細胞層が完成する前の生後7日から15日において、CCP1蛋白は小脳顆粒層に存在した。生後21日以降ではプルキンエ細胞の細胞体と軸索にCCP1が見られた。また顆粒層におけるCCP1の局在はいずれの時期でもほぼ安定して見られた。このようなCCP1の局在の仕方はAMS, WTとも同様であった。発症後週齢群のAMSでも残存するプルキンエ細胞や顆粒層にCCP1が見られた。

2. ミトコンドリア分離因子 MFF の局在（別紙図2）

生後7日ではプルキンエ細胞の細胞体・軸索にMFFが見られ、また顆粒層にもMFFが存在した。生後15日以降でプルキンエ細胞での存在は目立たなくなり、顆粒層での局在が際立って見られた。この局在の仕方はWT、AMSとも同様であった。

3. ミトコンドリア融合因子 MFN1/MFN2 の局在（別紙図3及び図4）

生後7日よりプルキンエ細胞の細胞体・軸索にMFNは存在し、それは生後28日まで安定して見られた。生後15日から28日に、小脳分子層のグリア細胞でもMFN見られた。

4. ラマン分光分析（別紙図5）

少なくとも5個の異なるプルキンエ細胞を選び、プルキンエ細胞の細胞体・軸索・細胞周囲の分子層を含むように範囲設定してラマンスペクトルを測定した。それぞれから得られたラマンスペクトルより平均ラマンスペクトルを算出した。WTとAMSの各週齢間で平均ラマンスペクトルを比較したところ、生後7日のAMSにのみ $666/\text{cm}^{-1}$ のラマンスペクトルバンドが見られなかった。

5. ミトコンドリア活性測定

WTとAMSの小脳よりミトコンドリア単離溶液を作成し、単離溶液の吸光度を測定することでミトコンドリア活性の評価とした。現在までの解析では、AMSとWTの間に有意なミトコンドリア活性の違いは見られなかった。

## 6. 考察

1. CCP1 の免疫組織化学的局在が、小脳プルキンエ細胞層が完成する前後、つまり失調症発症前後で異なる。このことから、CCP1 は生後の小脳発達に関与する可能性がある。
2. ミトコンドリア分離に関与する因子 MFF と CCP1 は、失調症発症前後に関わらず、ともに小脳顆粒層に安定して局在している。このことから、顆粒層の細胞におけるミトコンドリア分離に CCP1 が関与するかもしれない。
3. ミトコンドリア融合に関わる因子 MFN はプルキンエ細胞のみならず、小脳分子層のグリア細胞に免疫組織化学的局在が見られる。これは CCP1 の局在とは異なる。
4. AMS ホモマウスでは生後 7 日にプルキンエ細胞における MFN1/2 の局在が、野生型マウスよりもやや強くみられる。この点はラマン分光分析の結果と関係するかもしれないが、今後更なる解析が必要である。

## 7. 今後の方針

1. 実験材料であるマウスの生産に時間がかかってしまったため、免疫組織化学的局在の半定量解析まで至らなかった。免疫組織化学的染色は終了しているため、今後は半定量解析を続けて行う予定である。
2. 上記と同様の理由でミトコンドリア活性測定も十分行えていない。必要なマウス組織の採取は終了しており、現在ミトコンドリア単離溶液を作成中であるため、今後ミトコンドリア活性測定と解析を続けて行う。
3. ラマン分光分析はサンプル数を増やして測定・解析する必要がある。必要なマウス組織切片の作成は終了しているため、引き続きラマンスペクトル測定と解析を行う。

## 8. 論文、学会発表、外部資金への応募見込み等

学会発表：第 109 回日本病理学会総会（演題採択済、2020 年 4 月以降、Web 総会開催の見込み）

第 61 回日本神経病理学会総会学術研究会（演題採択済、2020 年 6 月 25 日～27 日、金沢）

論文投稿：Neuropathology (Impact factor: 2.161) へ投稿予定

外部資金への応募：令和 2 (2020) 年度 科学研究費助成事業へ応募済み