

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 医学部器官病理学 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 教授

【研究の目的と内容】

1. 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、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。

2. 昨年度までの研究進行状況と本年度の研究目標

先行研究において、CCP1 遺伝子がコードする蛋白質・CCP1 (別名 Nna1) が、細胞内微小管の翻訳後修飾に関わること、CCP1 の機能が失われると、微小管に過剰なポリグルタミル化が起きミトコンドリアの動態が変化すること、その変化が神経細胞の軸索を介した物質輸送に障害をもたらすことが明らかとなってきた。

2019年度までの研究代表者らの研究において、CCP1、ミトコンドリア融合因子 MFN 及びミトコンドリア分離因子 MFF それぞれの、小脳における局在を調べてきた。その結果、①上記3つの因子の小脳での局在は、野生型マウスと AMS マウスの間に違いは見られないこと、②しかし、AMS マウスでは小脳に局在する CCP1 が野生型マウスと比較して、有意に少ないこと、③小脳における CCP1 の局在は、失調症を発症する前 (生後 15 日) で小脳分子層に強く局在するが、発症後 (生後 21 日) の時期になるにつれて、小脳プルキンエ細胞や小脳顆粒層に強い局在が見られること、④MFN は小脳プルキンエ細胞と小脳分子層グリア細胞に局在すること、MFF は失調症の発症前後に関係なく、小脳顆粒層に安定して局在することを明らかにしてきた。

失調症を発症する前の生後 15 日ごろは、小脳プルキンエ細胞と、脊髄下オリブ核由来

の登上線維や小脳顆粒細胞由来の並行線維とがシナプスを形成し、小脳プルキンエ細胞層の形成が完成する時期に相当する。そこで本年度、マウスの小脳の発達段階において重要な時期（生後 15 日ごろ）であるシナプス形成時期に、適切なミトコンドリアの分離融合と CCP1 の機能が保たれることが、プルキンエ細胞の生存維持に必要なではないのか、と仮説を立て、下記の研究内容を調べた。

3. 研究内容

- ①小脳におけるミトコンドリアの量を調べる。
- ②小脳におけるミトコンドリア分離因子（MFN）と融合因子（MFF）の局在を詳しく調べる。
- ③小脳プルキンエ細胞内のミトコンドリアの形態を詳しく調べる。
- ④顕微ラマン分光法にて小脳プルキンエ細胞に特異的なラマンスペクトルを調べる。

【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）】

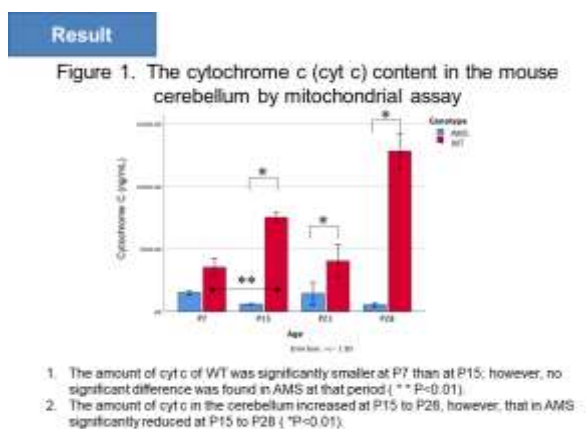
1. 本研究により得られた知見および成果

- ①小脳におけるミトコンドリアの量を調べる。（figure 1）

ミトコンドリア量を反映するチトクローム C (cyt c) 蛋白を免疫沈降法で半定量解析した。

野生型マウスの小脳における cyt c 蛋白量は他の日齢群とくらべて日齢(P)15 と P28 で増加していた。

野生型マウスに比べて、P15 と P28 の AMS マウスで cyt c 蛋白量は有意に減少していた。



- ②小脳におけるミトコンドリア分離因子（MFN）と融合因子（MFF）の局在を詳しく調べる。

- 1) ミトコンドリア分離因子である Mitochondria fission factor (MFF) の局在（figure 2）

生後7日目のマウス小脳プルキンエ細胞に MFF が存在していた。生後15日以降でその存在がやや減少して見られた。逆に生後21日、28日目は顆粒層の細胞に MFF の局在が見られた。

野生型マウス・AMS マウスともにこの局在のパターンは同様であった。

2) ミトコンドリア融合因子である mitofusion-2 (MFN2) の局在 (figure 3)

MFN2 の局在は、これまで調べてきた CCP1 の局在と類似していた。

即ち、生後15日目にプルキンエ細胞内における MFN2 の局在が顕著となった。その後プルキンエ細胞での MFN2 の局在は維持されていた。

CCP1 と類似した局在に加えて、分子層のグリアにも MFN2 の発現 (局在) が見られた。

AMS マウスでも同様の局在傾向が見られたが、野生型マウスと比較して全体に染色性が減弱して見られた。

③小脳プルキンエ細胞内のミトコンドリアの形態を詳しく調べる。(figure 4)

プルキンエ細胞の軸索突起部分を中心としてミトコンドリアの形態を透過電子顕微鏡で観察したところ、AMS マウスではプルキンエ細胞の軸索突起内のミトコンドリアのクリステの構造に乱れが見られた。

Figure 2. The immunohistochemical expression of MFF

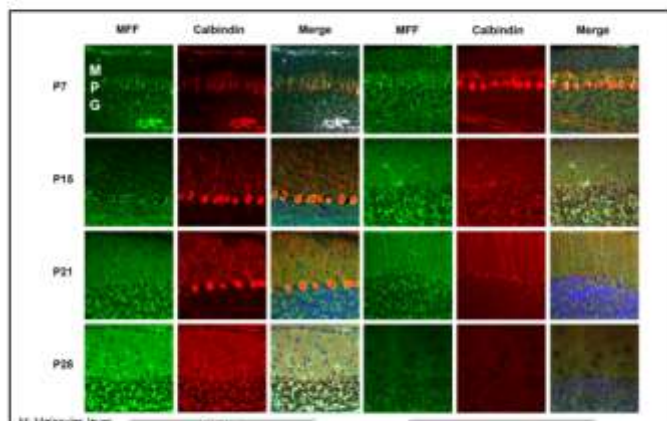


Figure 3. The immunohistochemical expression of MFN2

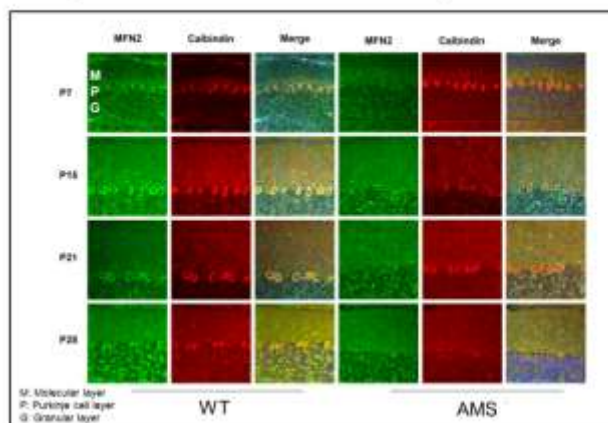
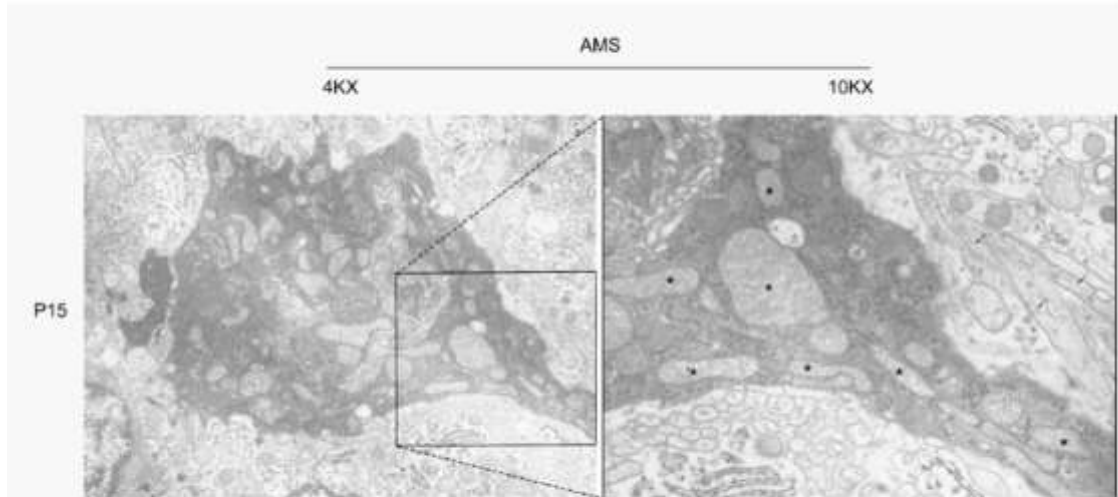


Figure 4. The ultrastructural changes of Purkinje cells by TEM

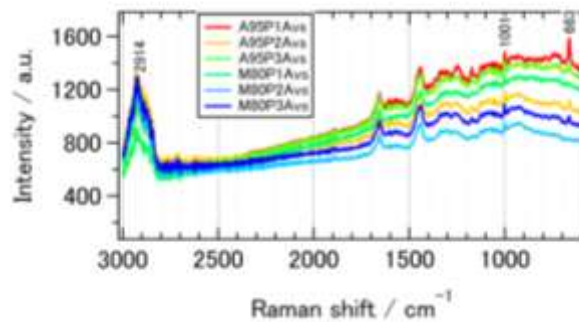


1. The structure of mitochondrial cristae in Purkinje cells was disordered. At same time, the Golgi apparatus was swollen and the polyribosome was depolymerized to form free monoribosomes at P15 in AMS mouse.
2. Compared to the WT mouse, the endoplasmic reticulum in the dendrites expanded to form vesicles, and lysosomes appeared by P21, indicating the possibility that Purkinje cell degeneration begins around P15.
(▲ :Nucleus; △ :Synapse; ★ : Mitochondria; → : Microtubule.)

④ラマン分光分析

生後 7 日の野生型マウスと AMS マウスの小脳プルキンエ細胞を分析対象とした。分析材料に野生型マウスと AMS マウスの小脳凍結切片を用いた。顕微ラマン分光法にて小脳プルキンエ細胞のラマンスペクトルを調べたところ、脂質やタンパク質の生体分子に特異的なラマンスペクトルが

マッピング範囲のラマンスペクトルの比較



確認された。またフェニルアラニンが持つラマンスペクトルに、近い分子も混在する可能性が示唆された。加えて小脳由来の成分を示すと考えられる、ラマンスペクトルが得られた。

考察

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。この時期に AMS マウスでは MFN2 と CCP1 が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かもしれない。

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。

2. 論文、学会発表、外部資金への応募見込み等

学会発表：第110回日本病理学会総会（2021年4月）

第62回日本神経病理学会総会学術研究会（2021年5月）

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

外部資金への応募：令和4(2022)年度 科学研究費助成事業へ応募予定