

145. アルツハイマー病における MAM の機能解析

長島 駿

Key words : MAM, MITOL, アルツハイマー病

東京薬科大学 生命科学部 分子生化学

緒言

ミトコンドリアはエネルギー産生だけでなく、脂質代謝、細胞内カルシウムの濃度調節、活性酸素の産生、細胞死の制御など様々な役割をもつ細胞小器官である。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。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おり、主にミトコンドリアの融合には Mitofusin1 (Mfn1), Mitofusin2 (Mfn2) が関与し、分裂には dynamin-related protein1 (Drp1) が関与する。近年、Drp1 がミトコンドリアと小胞体の接着点である mitochondria-associated ER membrane (MAM) に集積し、ミトコンドリアの分裂を引き起こすことが明らかとなった。さらに MAM はミトコンドリアの分裂だけでなく、ミトコンドリアと小胞体のカルシウムや脂質の受け渡し、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 がミトコンドリアと小胞体のカルシウムの受け渡しを担うことから過剰な MAM の形成がミトコンドリアへの過剰なカルシウムを促すことにより、ミトコンドリアの機能不全を引き起こすことがアルツハイマー病の原因となるとの仮説が提唱された²⁾。しかしながら、反対に MAM がミトコンドリアの機能維持に重要な機能を担うことも報告されていることから、アルツハイマー病における MAM の増加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。したがって、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できる。

本研究グループはミトコンドリア外膜に局在するユビキチンリガーゼ MITOL (別名 MARCH5) を同定した³⁾。さらに MITOL が MAM の形成を担う Mitofusin2 (Mfn2) を介して MAM の形成を制御することを報告した⁴⁾。Mfn2 はミトコンドリアと小胞体のそれぞれに局在し、ミトコンドリアに局在する Mfn2 と小胞体に局在する Mfn2 が結合することにより MAM 形成を促す。MITOL が Mfn2 に Lys 63 結合型ポリユビキチン鎖を形成し、Mfn2 の活性化を促すことにより、MAM 形成を促進する。実際に MITOL を欠損したマウス胎児線維芽細胞では MAM の減少が確認されたことから、他の MITOL を欠損した細胞やマウスにおいても MAM の減少が推測され、MAM の詳細な解析が可能となった。本研究では MITOL ノックアウトマウスとアルツハイマー病モデルマウスを用いて、アルツハイマー病における MAM の機能解明を目的とし、研究を進めた。

方法、結果および考察

アルツハイマー病は脳内にアミロイド β が蓄積することが原因のひとつと考えられており、アルツハイマー病モデルマウスとしてアミロイド β の前駆体である Amyloid precursor protein (APP) の変異体と APP を切断する酵素である presenilin 1 の変異体を発現し、アミロイド β が過剰に産生されるトランスジェニックマウスが広く用いられている⁵⁾。本研究はこのアルツハイマー病モデルマウス (AD マウス) に MAM を減少させ、アルツハイマー病における MAM の役割の解明を目指した。MAM を減少するマウスとして、ミトコンドリアと小胞体の接着を担う Mfn2 複合体の形成を制御する MITOL に着目した。MITOL の 2 番目のエクソンの両端を loxP 配列で挟んだマウス (MITOL^{lox} マウス) と大脳皮質・海馬・嗅球特異的に Cre を発現するマウス (Emx1-Cre マウス) を掛けあわせ、大脳皮質・海馬・嗅球

特異的に MITOL を欠損させたマウス (*MITOL*-KO マウス) を作製した. さらに *MITOL*-KO マウスと AD マウスを掛けあわせ, MAM が減少したアルツハイマー病モデルマウス (*MITOL*-KO-AD マウス) を作製した (図 1 A, B). まず, 作製したマウスの 4 週齢から 20 週齢までの生存率を比較したところ, *MITOL*^{flox} マウス, *MITOL*-KO マウス, AD マウスの生存率がほぼ 100%であったのに対し, *MITOL*-KO-AD マウスの生存率が 63%であった (図 1 C). MITOL を欠損したマウスは MITOL を欠損していないマウスと比較すると死に至りやすいことが明らかとなった. すなわち MAM の減少はアルツハイマー病モデルマウスに早期の死を引き起こすことが示唆された.

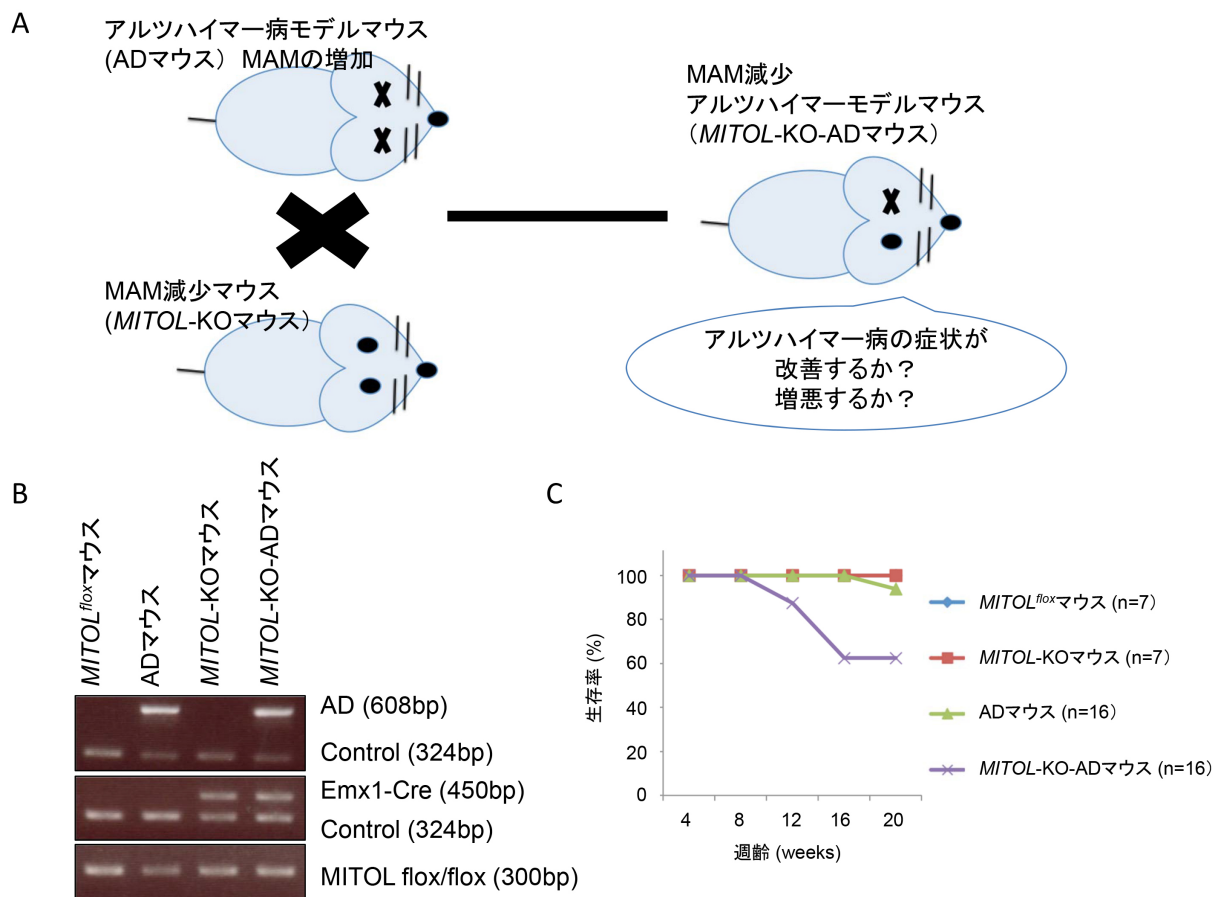


図 1. *MITOL* 欠損アルツハイマー病モデルマウスの作製.

- A) *MITOL* 欠損モデルマウス作製のストラテジー. B) ゲノム PCR 法を用いた *MITOL* 欠損マウスの作製確認.
C) マウスの生存率.

次に実際に *MITOL* 欠損により MAM に局在する Mfn2 が減少しているかを検証した. Fractionation 法により, *MITOL* を欠損したマウスは MAM 画分に局在する Mfn2 量が減少していることが明らかとなった (図 2). MAM に局在する Mfn2 が減少したことから, Mfn2 依存的な MAM 形成の減少が認められた.

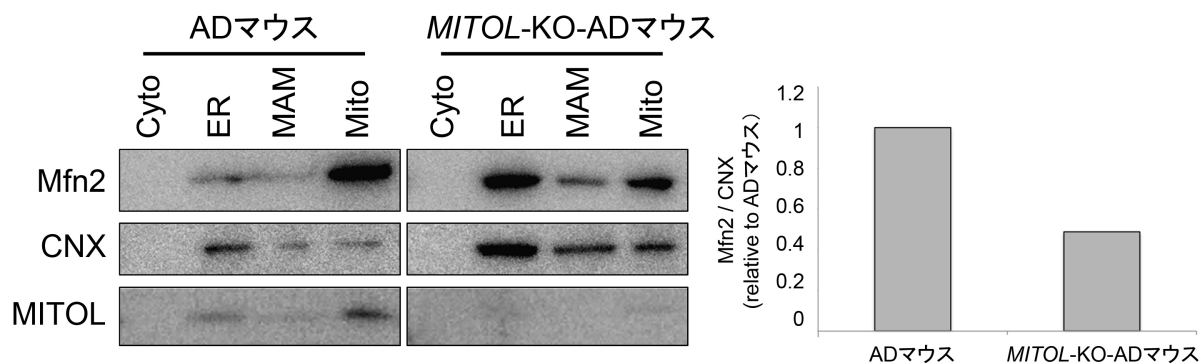


図2. MAM に局在する Mfn2 量の比較.

20 週齢のマウス脳を取り出し、画分 (cyto: 細胞質, ER: 小胞体, MAM, mito: ミトコンドリア) に分け比較した (左図). MAM 画分に局在する Mfn2 の量を CNX で標準化し比較した (右図).

次に脳に異常がないかを Nissl 染色を用い、形態学的な解析を行った (図3 A). 層構造の形成不全や顕著な細胞数の減少など形態学的に大きな差は認められなかった. アルツハイマー病はアミロイド β が蓄積することにより、症状が悪化すると考えられていることから、20 週齢におけるアミロイド β のプラーク数を検討した結果、アミロイド β のプラーク数に大きな差はみとめられなかった (図3 B).

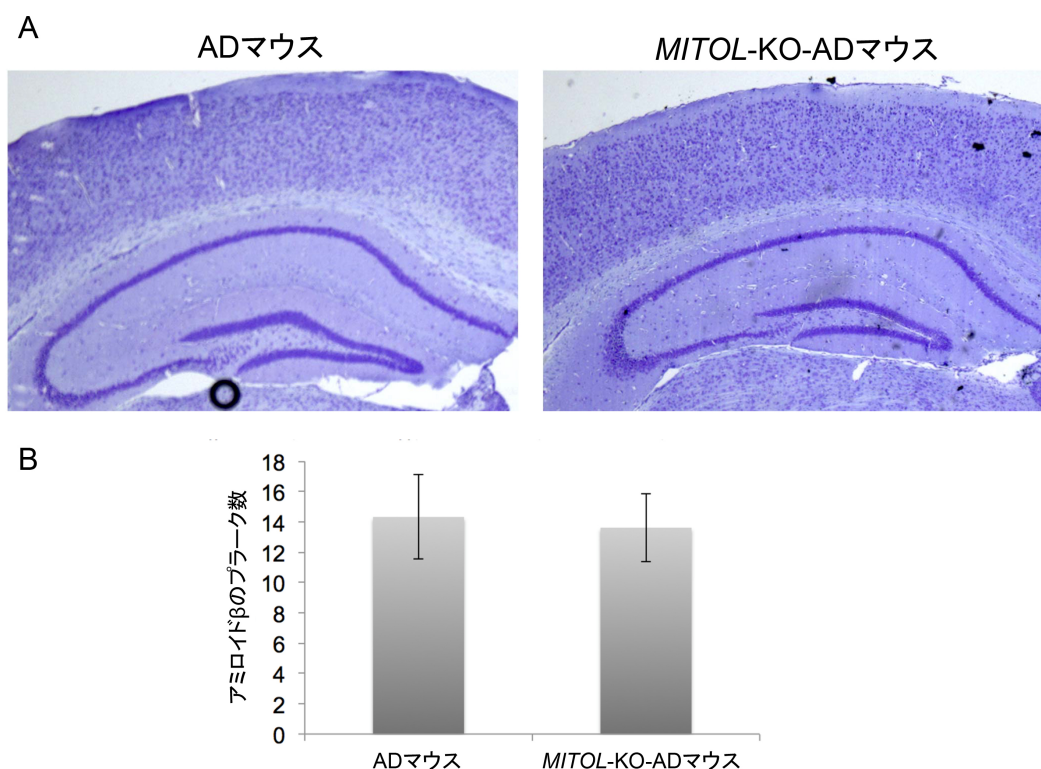


図3. MITOL 欠損アルツハイマー病モデルマウスの脳組織の形態学的解析.

A) Nissl 染色を用いた形態学的な解析. 20 週齢のマウス脳をホルマリン固定, パラフィン包埋後, 薄切し, 脱パラフィン処理し, cresyl violet で染色を行った. B) アミロイド β のプラーク数の解析. 20 週齢のマウス脳を薄切後, アミロイド β 抗体を用いて染色を行った.

アルツハイマー病の患者脳において MAM の増加が確認されたことから、MAM の過剰形成が小胞体からミトコンドリアに過剰なカルシウムの流入を引き起こさせ、細胞死の亢進やミトコンドリアの機能不全を引き起こし、アルツハイマー病の病態を悪化させると考えられていた。しかしながら、本研究により、MAM の減少は個体の早期な死を引き起こすことが示唆された。MITOL-KO-AD の致死となる原因を明らかにするまでは至らなかったが、アルツハイマー病において MAM の増加が個体を生存させるために増加していると推察される。今後はさらなる解析を行い、アルツハイマー病における MAM の機能のメカニズムの解明を目指したい。

文 献

- 1) Hedskog, L., Pinho, C. M., Filadi, R., Rönnbäck, A., Hertwig, L., Wiehager, B., Larssen, P., Gellhaar, S., Sandebring, A., Westerlund, M., Graff, C., Winblad, B., Galter, D., Behbahani, H., Pizzo, P., Glaser, E. & Ankarcrona, M. : Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110** : 7916-7921, 2013.
- 2) Area-Gomez, E., Del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, M. D., Guardia-Laguarta, C., de Groof, A. J., Madra, M., Ikenouchi, J., Umeda, M., Bird, T. D., Sturley, S. L. & Schon, E. A. : Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.*, **31** : 4106-4123, 2012.
- 3) Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., Inatome, R. & Yanagi, S. : A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J.*, **25** : 3618-3626, 2006.
- 4) Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H. M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R. & Yanagi, S. : MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol. Cell*, **51** : 20-34, 2013.
- 5) Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L., Younkin, S. G. & Borchelt, D. R. : Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum. Mol. Genet.*, **13** : 159-170, 2004.