

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590956

研究課題名（和文）ダイナミン様蛋白による神経細胞障害の生体内におけるメカニズムの解明

研究課題名（英文）In vivo mechanism of neuronal injury by DRP1

研究代表者

椎野 顯彦（SHIINO AKIHIKO）

滋賀医科大学・MR 医学総合研究センター・准教授

研究者番号：50215935

研究成果の概要（和文）：

ダイナミン様蛋白質であるDRP1のS-ニトロシル化がミトコンドリアの過剰な分裂を引き起こし、このことがアルツハイマー病の原因であるかどうかを研究した。Glyceryl trinitrate投与時のDRP1のS-ニトロシル化は、通常の野生型と比較してtriple transgenic mice (3xTg)においては増加していた。神経細胞内ミトコンドリアの形状をmito-DsRed2 で観察すると、分裂したミトコンドリアが数多く認められ、3xTgにおいては顕著であった。以上のことから、成体脳においてもアミロイドβ存在下ではDRP1のS-ニトロシル化が亢進し、ミトコンドリアの分裂が神経細胞内で促進されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of our study was to clarify whether S-nitrosylation induced excessive mitochondrial fission and fragmentation in the brain. We stereotactically administered glyceryl trinitrate in the mouse brain of both triple transgenic (3xTg) and wild type (Wt) mice, and measured SNO-Drp1 by biotin switch assay and compared mitochondrial morphology by deconvolution fluorescence microscopy using mito-DsRed2 staining. SNO-Drp1 formation was increased in a dose-dependent manner induced by glyceryl trinitrate, and this phenomenon was more prominent in 3xTg than in Wt mice. Mito-DsRed2 staining showed excessive mitochondrial fission and fragmentation in the brain of 3xTg but not prominently in the brain of Wt mice. These results suggest that β-amyloid may cause excessive mitochondrial fragmentation and mitochondrial dysfunction by induction of excessive SNO-Drp1 production.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：臨床神経生理学、アルツハイマー病、ミトコンドリア、アミロイド $\beta$ 、磁気共鳴、ダイナミン様蛋白、一酸化窒素、酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類のミトコンドリアの融合/分裂は、ミトコンドリア自身ではなく細胞側の制御で行われている。DRP1はそのkeyとなるタンパクと考えられており、例えば、小型ユビキチン様修飾因子(SUMO1)によるスモイル化は(Bax/Bakはこれを促進する)アポトーシスを引き起こす。DRP1のSer585のリン酸化は細胞分裂期のミトコンドリアの分裂に関与し、Ser637はPKAによってリン酸化されるとDRP1の機能が抑制され、ミトコンドリアの結合が促進される。過剰に産生されたNOによりDRP1がS-ニトロシル化を受けると、ミトコンドリアの過剰な分裂を引き起こし、ついには細胞死に至る。 $\gamma$ セクレターゼによって切り出されたアミロイド $\beta$ (A $\beta$ )はミトコンドリアに取り込まれて呼吸鎖の障害を引き起こし、過剰なフリーラジカルを産生する。さらにA $\beta$ はDRP1のS-ニトロシル化を促進する作用があると考えられており、今まで不明であったA $\beta$ と神経細胞死の機序として主要な現象と考えられる。しかしながら、この現象は生体内では証明されていないこと、生体内でアミロイド $\beta$ がNOの産生、さらにはS-ニトロシル化にどのように関わっているかは明らかでない。A $\beta$ 自身が触媒のように作用するのか、さらにはA $\beta$ に対するミクログリアの反応が関与するのかを調べる必要がある。

### 2. 研究の目的

アルツハイマー病の原因としてアミロイド $\beta$ のかかわりが考えられていたが、アミロイド $\beta$ が神経変性を引き起こす機序は不明確であり、現在でも多面的な研究が進行中である。アミロイド $\beta$ はミトコンドリアに取り込まれ呼吸代謝を障害するが、呼吸鎖の障害がNOを含めた過剰なフリーラジカルを産生しDRP1のS-ニトロシル化を促進するのか、アミロイド $\beta$ の沈着がDRP1のS-ニトロシル化に触媒のように作用するのか、あるいは、アミロイド $\beta$ に対するミクログリアの貪食反応としてiNOSがS-ニトロシル化に関係するのかを解明する。

### 3. 研究の方法

アルツハイマーモデルマウスとして、triple transgenic miceであるB6;129-*Psen1*<sup>tm1Mop</sup>Tg (APPswe, tauP301L)1Lfa/Jを用いた。このマウスはPS1M146VKI、APPswe、P301Lの3カ所に変異を加えたもので、A $\beta$ の沈着以外にNFTの変化も出現する。このマウスの前頭前野に定局的にglyceryl trinitrate (GNT)を投与したのち、biotin-switch assay法によりSNO-DRP1を測定した。神経細胞の軸索輸送の障害を調べる目的で、定局的に右の嗅内野にMnCLを20mM投与し、3時間、1、3、6日目に7TMR装置で脳の撮像を行った。

#### 4. 研究成果

大脳皮質に定量的に glyceryl trinitrate (GTN) を投与するとダイナミン様 GTPase (DRP1) の S-ニトロシル化が起きることを確認した。Western blot によりこの反応は容量依存性に増加すること、Tg マウスに比べ野生型 (Wt) のマウスではこの変化が少ないことから、Aβ がこの反応を増強している可能性が示唆された。さらに、Wt マウスよりも Tg マウスにおいて 3-nitrotyrosine の量が増加していることが判明した。これは、GTN 投与後の NO 産生が Tg マウスにおいて亢進していることを示唆する結果であった。Mg を用いた軸索輸送の計測では、Tg マウスは野生型と比べて軸索輸送に問題のあることが判明した。次に神経細胞内ミトコンドリアを形態学的に観察すると、Tg マウスにおいて小型のミトコンドリアが多数認められた。しかしながら、Tg マウス、Wt マウスともに GTN 投与周辺の神経細胞のミトコンドリアの形状にあまり変化はなく、GTN によるミトコンドリアの分裂を証明するには至らなかった。現時点では、脳内 NO に発生による DRP1 の S-ニトロシル化が神経細胞の変性をきたす直接証拠はないが、アミロイド β は NO の慢性的な脳内での発生を促進し、かつ、ダイナミン様 GTPase (DRP1) の S-ニトロシル化を誘発させることにより、脳内ミトコンドリアの分裂を惹起させ、このことがアミロイド β による神経変性の原因と推測された。

#### 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 7 件)

1. Shiino A, Yamauchi H, Morikawa S, Inubushi T. Mapping of cerebral metabolic rate of oxygen using DSC and BOLD MR imaging: a preliminary study. *Magn Reson Med Sci*. 11(2):109-15, 2012  
(査読あり)
2. Watanabe T, Shiino A, Akiguchi I. Hippocampal metabolites and memory performances in patients with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*. 97(3):289-93. 2012  
(査読あり)
3. Shiino A, Watanabe T, Shirakashi Y, Kotani E, Yoshimura M, Morikawa S, Inubushi T, Akiguchi I. The profile of hippocampal metabolites differs between Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia, as measured by proton

magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 32(5):805-15.  
(査読あり)

- doi: 10.1038/jcbfm.2012.9. 2012
4. Morikawa S, Murayama H, Fujimoto S, Shiino A, Inubushi T. A simple way to acquire T(1)-weighted MR images of rat liver with respiratory triggering. *Magn Reson Imaging*. 30(3):453-8. 2012.  
(査読あり)
5. Shiino A, Akiguchi I, Watanabe T, Shirakashi Y, Nozaki K, Tooyama I, Inubushi T. Morphometric characterization of Binswanger's disease: comparison with Alzheimer's disease. *Eur J Radiol*. 81(9):2375-9. 2012.  
(査読あり)
6. Yanagisawa D, Amatsubo T, Morikawa S, Taguchi H, Urushitani M, Shirai N, Hirao K, Shiino A, Inubushi T, Tooyama I. In vivo detection of amyloid β deposition using 19F magnetic resonance imaging with a 19F-containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2011 Jun 16;184:120-7.  
(査読あり)
7. Watanabe T, Shiino A, Akiguchi I. Absolute quantification in proton magnetic resonance spectroscopy is useful to differentiate amnesic mild cognitive impairment from Alzheimer's disease and healthy aging. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2010;30(1):71-7.  
(査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

Mn 脳内直接投与による軸索輸送障害の画像化の検討。第 24 回日本脳循環代謝学会。2012 年、広島。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

椎野 顯彦 (SHIINO AKIHIKO)  
滋賀医科大学・MR 医学総合研究センター・  
准教授  
研究者番号：50215935

##### (2) 研究分担者

犬伏 俊郎 (INUBUSHI TOSHIROU)  
滋賀医科大学・MR 医学総合研究センター・  
教授  
研究者番号：20213142

(3) 連携研究者

なし