

平成20年 2月

# 高村歩美 学位論文審査要旨

主 査 西 連 寺 剛  
副主査 岡 崎 俊 朗  
同 難 波 栄 二

## 主論文

Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis

( $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジー亢進とミトコンドリア機能異常)

(著者：高村歩美、檜垣克美、梶卷賢哉、大塚晋、二宮治明、松田潤一郎、大野耕策、鈴木義之、難波栄二)

平成20年3月 Biochemical and Biophysical Research Communications 367巻

616頁～622頁

# 学 位 論 文 要 旨

## Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine $G_{M1}$ -gangliosidosis ( $G_{M1}$ -ガングリオシドーシスモデルマウスにおけるオートファジー亢進とミトコンドリア機能異常)

$G_{M1}$ -ガングリオシドーシスはライソゾーム病に分類される先天代謝異常症で、 $\beta$ ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) 遺伝子変異を原因とする常染色体劣性遺伝病である。中枢神経障害を主症状とし、発症する年齢が重症度と相関する。 $\beta$ -gal酵素欠損から中枢神経障害に至るメカニズムは不明で、有効な治療法も無い。ヒト $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス患者およびマウス脳神経細胞では、 $\beta$ -gal分解酵素の基質である糖脂質 $G_{M1}$ -ガングリオシド( $G_{M1}$ )が異常に蓄積し、小脳および脳幹部の神経細胞の選択的な脱落が顕著に見られる。 $G_{M1}$ は神経細胞の細胞膜に多く分布し、細胞内にとりこまれライソゾーム内で $\beta$ -gal酵素により分解されるが、 $G_{M1}$ -ガングリオシドーシス脳神経細胞では $\beta$ -gal酵素欠損により、ライソゾーム内の $G_{M1}$ が分解されず蓄積する。そこで筆者らは、 $\beta$ -galノックアウトマウス ( $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>) の脳を用いて、オートファジー・ミトコンドリア機能異常と中枢神経障害の関連性について検討を行った。

### 方 法

生後10日および10ヶ月齢の正常と $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>マウス脳からタンパク質を抽出し、オートファジー関連タンパク質 (LC3、Beclin-1) とAkt-mTORシグナル分子 (Akt、Erk、mTOR、S6) の発現をWestern Blot法により検討した。また、10ヶ月齢マウス大脳皮質凍結切片を作成し、LC3、Beclin-1、リン酸化mTOR抗体を用い免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で画像取得した。ミトコンドリアの解析はマウス脳組織と大脳皮質初代培養アストロサイトからそれぞれミトコンドリアを抽出し、cytochrome c oxidase活性を測定した。また、培養アストロサイトについてMitoTracker Redを用いミトコンドリアの形態を、JC-1を用いミトコンドリア膜電位を検討した。ミトコンドリア機能異常と細胞障害について、酸化ストレス誘導剤paraquatに対する応答性をLactate dehydrogenase (LDH) 放出量の測定により検討した。さらに、正常、 $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>およびchloroquine添加した正常アストロサイトのparaquat誘導細胞障害に対するATP、オートファジー阻害剤3-MA、促進剤rapamycin、カスパーゼ阻害剤z-VAD-fmkの効果を検討した。

## 結 果

生後10日齢の正常と $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>マウス脳では変化が見られなかったが、10ヶ月齢の $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>マウス脳では、G<sub>M1</sub>が蓄積している神経細胞でLC3、Beclin-1の発現が正常に比べ著しく上昇していた。それに伴い、10ヶ月齢の $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>マウスでは活性型のリン酸化Akt、リン酸化Erk、リン酸化mTORの発現が上昇していた。一方、cytochrome c oxidase活性は10ヶ月齢の $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>マウス脳組織および3週間培養後の $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>アストロサイトにおいて有為に低下していた。培養正常アストロサイトのミトコンドリアは大半がチューブ状の形態を示したのに対し、 $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>アストロサイトでは断片化とリング状の異常な形態が多く認められ、JC-1染色によるミトコンドリア膜電位も著しく低下していた。また、 $\beta$ -gal<sup>-/-</sup>アストロサイトは正常に比べ酸化ストレス誘導剤paraquatに高感受性を示し、ATP、3-MA、z-VAD-fmk添加により有為に抑制された。同様の効果はchloroquine添加した正常アストロサイトでも認められた。

## 考 察

$\beta$ -gal<sup>-/-</sup>マウス脳神経細胞におけるライソゾーム内のG<sub>M1</sub>蓄積はオートファゴソームの融合不全を引き起こし、オートファゴソームの形成を亢進させていることが示された。また、オートファジー本来の機能であるミトコンドリア等の細胞内小器官のターンオーバーやエネルギー自己供給が阻害されることで、細胞障害を引き起こしている可能性を示した。近年他のライソゾーム病でも同様の報告がされており、オートファジー機能不全はライソゾーム病全般に共通する病態経路である可能性が示唆された。また、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患とオートファジーの関連性についての報告もなされている。今回の結果は、G<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシスの神経変性発症の新たなメカニズムを示すとともに、将来的にこの機能を制御することによる治療戦略という新たな視点を与え、また他の神経変性疾患への応用も期待できると考えられた。

## 結 論

$\beta$ -gal<sup>-/-</sup>マウス脳神経細胞ではG<sub>M1</sub>蓄積に伴うオートファジーとミトコンドリアの機能不全が細胞障害性を引き起きていることを示した。これはG<sub>M1</sub>-ガングリオシドーシス神経変性の発症の新たなメカニズムであり、神経障害に対する将来的な分子治療の確立につながると考えられた。