

| | |
|-------------|--|
| 氏 名 | こだに あつし 小谷 篤 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (学 術) |
| 学 位 記 番 号 | 博 甲 第 1 0 7 5 号 |
| 学位授与の日付 | 令和 5 年 3 月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研 究 科 ・ 専 攻 | 工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻 |
| 学 位 論 文 題 目 | Mitochondria related neurodegenerative disease model of <i>Drosophila</i> (ミトコンドリア関連神経変性疾患ショウジョウバエモデル) |
| 審 査 委 員 | (主査)准教授 吉田 英樹 教授 小谷 英治 教授 志波 智生 准教授 加藤 容子 |

論文内容の要旨

多くの生物にとって、ミトコンドリアは生存に欠かすことのできない細胞内小器官である。本申請論文では、ミトコンドリアで働く遺伝子の神経系特異的な機能低下が、ショウジョウバエの学習や運動に与える影響について詳細に解析されている。本申請論文は、序論、第二章「*MPV17* 関連ミトコンドリア DNA 欠損症候群のショウジョウバエモデル」、第三章「*SCO2* 欠損により誘発されるシャルコー・マリー・トゥース病のショウジョウバエモデル」から構成されている。

序論では、本研究の背景が述べられている。ミトコンドリアは、エネルギー産生の中心を担い、真核生物のほぼ全ての細胞に存在する細胞内小器官である。グルコースは、解糖系が働くことによりピルビン酸に分解され、酸素存在下では、ミトコンドリア内に運ばれたピルビン酸は、TCA 回路、電子伝達系により、ATP に変換される。ミトコンドリアには、核内のゲノム DNA とは独立して DNA (ミトコンドリア DNA : mtDNA) が存在し、ミトコンドリアで働くタンパク質がコードされている。ヒトにおいて、ミトコンドリア機能の異常は、シャルコー・マリー・トゥース病 (CMT 病) やミトコンドリア病、*MPV17* 関連肝脳型ミトコンドリア DNA 枯渇症候群 (MDS) など様々な疾患を引き起こすことが知られており、運動機能低下などの神経症状が頻度高く確認される。また、ショウジョウバエを用いた疾患の解析系の構築の重要性についても述べられている。

第一章では、MDS の原因遺伝子 *MPV17* のショウジョウバエホモログ *dMpv17* の神経細胞特異的ノックダウンの影響について述べられている。MDS は、mtDNA 維持に関わる遺伝子の変異によって mtDNA が減少、エネルギー代謝が阻害されることで発症し、肝機能障害や発達遅滞、筋力低下、運動性・感覚性末梢神経障害、痙攣などの神経症状を示す疾患である。治療薬は無く、食事療法やビタミン摂取などの対症療法に限られている。MDS のモデルとして、*Mpv17* が欠損したマウスやゼブラフィッシュが作製されたが、肝症状や筋症状は示されているものの、神経症状は認められなかった。そこで、MDS の神経症状の発症機構を解析するモデル系の樹立を目指し、ショウジョウバエの神経細胞で *dMpv17* をノックダウン、その影響を詳細に調べた。*dMpv17* タンパク質のアミノ酸配列が、ヒト *MPV17* と十分に相同性が高いことを確認し、神経細胞特異的

に *dMpv17* のノックダウンを行った。ノックダウンの効率が、コントロールに比べ有意に低下していることは、定量的 PCR により確認している。この神経細胞特異的 *dMpv17* ノックダウン系統の幼虫及び成虫を用いて、学習能、運動能および痙攣の有無を調べたところ、幼虫の学習能と運動能は有意に低下したが、成虫の運動能には影響がなく、痙攣症状も認められなかった。そこで、影響の認められた幼虫に焦点を当て、さらなる解析を行った。*MPV17* は、ミトコンドリアでイオンチャネルタンパク質として働くことが知られており、その欠損は *mtDNA* の減少、ミトコンドリア機能の低下につながるということが知られていた。そこで、ショウジョウバエ幼虫の神経細胞における *mtDNA* 量、ミトコンドリアの機能に密接に関係する ATP 量、活性酸素種 (ROS) の量を調べた結果、*mtDNA* は 30% 以下となり、ATP 量も有意に低下、ROS 量は 10 倍以上に増加しており、*dMpv17* のノックダウンにより、ミトコンドリア機能が低下することが示唆された。さらに、グルコース代謝の中間物質である乳酸やピルビン酸量を測定したところ、いずれもミトコンドリア機能の低下を示唆する結果が得られた。この神経細胞特異的 *dMpv17* ノックダウン幼虫では、神経の形態異常や機能異常を示唆する結果も得られており、神経細胞特異的 *dMpv17* のノックダウンが、MDS の神経症状を解析するモデル系になり得ることが報告されている。

第二章では、CMT 病の原因遺伝子 *SCO2* のショウジョウバエホモログ *Scox* のグリア細胞特異的ノックダウンの影響について述べられている。CMT 病は、四肢の遠位部の感覚・運動障害を示す遺伝性の末梢神経疾患である。神経軸索の損傷やミエリンの脱落による神経伝導速度の低下が見られ、原因遺伝子は 100 以上報告されているが、有効な治療法はない。*SCO2* は、ミトコンドリアの電子伝達系で重要な働きをする因子で、2018 年に CMT 病患者より変異が同定された。*SCO2* のショウジョウバエホモログとして *Scox* が報告されていたため、*Scox* を神経系においてノックダウンし、運動機能に異常が現れるか調べたが、神経細胞特異的なノックダウンでは、影響が認められなかった。神経系には、神経細胞とグリア細胞が存在するため、次にグリア細胞特異的な *Scox* のノックダウンを試みた。その結果、幼虫、成虫共に運動能が低下することが明らかとなった。また、この系統では、ATP 量の減少、ミトコンドリア形態の異常やミトコンドリア機能の低下を示唆する結果が得られ、また、神経形態異常も認められた。ショウジョウバエの神経系には、5 種類のグリア細胞が存在するため、*Scox* ノックダウンによる運動能低下の影響が、どのグリア細胞に関連した結果か、各グリア細胞特異的に *Scox* をノックダウンし解析した。その結果、神経軸索を覆うように存在する *ensheathing* グリア細胞でノックダウンされた場合のみ、幼虫、成虫での運動能の低下が認められた。*ensheathing* グリア細胞は、哺乳動物のミエリンに似た機能を示すと考えられるため、*ensheathing* グリア細胞特異的な *Scox* のノックダウンが、ミエリンの脱落を示す CMT 病の発症機構の解析に利用可能である可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアの機能異常は、様々な疾患を引き起こすことが知られているが、その発症メカニズムの解析系の開発は十分とはいえない。申請者は、ミトコンドリアで働き且つ神経疾患の原因となる遺伝子のショウジョウバエホモログを神経系でノックダウンし、個体に現れる表現型、神経細胞の形態、ミトコンドリア機能に与える影響を詳細に調べ、神経症状の解析系としての有

用性を検討した。*MPV17* 関連肝脳型ミトコンドリア DNA 枯渇症候群 (MDS) の原因遺伝子 *MPV17* のショウジョウバエホモログ *dMpv17* を神経細胞特異的にノックダウンすると、幼虫の運動能、学習能が低下することを見出した。この系統の中樞神経系では、ミトコンドリア DNA の減少及びミトコンドリア機能の低下、神経の形態異常が認められるなど、MDS 患者の症状と非常に類似性が高いことが明らかとなった。また、シャルコー・マリー・トゥース病 (CMT 病) の原因遺伝子である *SCO2* のショウジョウバエホモログ *Scox* をグリア細胞特異的にノックダウンした結果、幼虫および成虫の運動能の低下が認められた。このグリア細胞特異的 *Scox* ノックダウン系統では、ミトコンドリア機能の低下、神経の形態異常が認められた。さらに、ショウジョウバエに存在する 5 種のグリア細胞のうち、*ensheathing* グリア細胞でのノックダウンにおいてのみ、運動能の低下が認められることを明らかにしている。この *ensheathing* グリア細胞は、ショウジョウバエにおいて、哺乳動物のミエリン形成に関わるグリア細胞の機能を担っていると考えられている。そのため、*ensheathing* グリア細胞特異的な *Scox* のノックダウンが、ミエリンの脱落により発症する CMT 病患者の生体内での異常を再現している可能性も考えられる。一方で、神経細胞における *Scox* のノックダウンでは、運動能に異常は見られないことから、*SCO2* に突然変異を持つ CMT 病患者においても、神経細胞とグリア細胞のどちらの異常が、患者に対して大きな影響を与えているか調べる必要があると考えられる。これら二つの研究は、ショウジョウバエが、神経症状を示す疾患の解析系として有用であることを示しており、発症メカニズムの解析だけでなく、新規治療薬開発への利用も期待され、社会的な影響も大きいと考えられる。

これらの研究の成果は、申請者が筆頭著者 1 編を含む、査読のある下記の国際科学雑誌 2 編に掲載された。

- 1) *A Drosophila model of the neurological symptoms in Mpv17-related diseases*
Atsushi Kodani, Mizuki Yamaguchi, Ririka Itoh, Man Anh Huynh, Hideki Yoshida, SCIENTIFIC REPORTS, 12(1):22632. doi: 10.1038/s41598-022-27329-x., 2022
- 2) *The function of Scox in glial cells is essential for locomotive ability in Drosophila*
Ryosuke Kowada, Atsushi Kodani, Hiroyuki Ida, Masamitsu Yamaguchi, Im-Soon Lee, Yasushi Okada, Hideki Yoshida, SCIENTIFIC REPORTS, 11(1):21207. doi: 10.1038/s41598-021-00663-2, 2021