Graduate School of Advanced Science and Engineering
Waseda University

# 博 士 論 文 概 要
# Doctoral Thesis Synopsis

## 論 文 題 目
Thesis Theme

# Mitochondrial Dynamics and Autophagy in the Hippocampus of Animal Model of Cognitive Aging
# 加齢性記憶障害モデル動物の海馬における ミトコンドリアダイナミクスおよび ミトコンドリアオートファジー


申 請 者
(Applicant Name)

| | |
|---|---|
| Kosuke | KATAOKA |
| 片岡 | 孝介 |

Department of Life Science and Medical Bioscience,
Research on Solid State Bioscience


May, 2020

ミトコンドリアは、細胞内の ATP 産生や脂質代謝、鉄－硫黄クラスター生成、カルシウム恒常性、ひいてはアポトーシス性細胞死に関与する、細胞内で最も重要なオルガネラの一つである。１９５６年に Harman によって提唱された「フリーラジカル説」は、老化の原因をミトコンドリアから発生するフリーラジカルとする説であり、以降さまざまな修正が加えられ、今日ではミトコンドリアの機能不全が老化の主要因の一つであるという考えは広く認められている。ミトコンドリアはフリーラジカルによる傷害に対処するために、さまざまなレベルのミトコンドリア品質管理機構を発達させてきた。代表的なミトコンドリア品質管理機構として、ミトコンドリアダイナミクスやミトコンドリアオートファジー（マイトファジー）が挙げられる。すなわち、融合や分裂といった膜ダイナミクスによる傷害の相補や隔離、またマイトファジーによる傷害ミトコンドリアそのものの分解が、フリーラジカルによる傷害の軽減に寄与する。ミトコンドリアはエネルギー産生を担う主要なオルガネラであるため、これらミトコンドリア品質管理機構は、エネルギー需要の高い細胞のエネルギー恒常性に必須である。

内在性カンナビノイド系は、リン脂質由来の前駆体から合成される内在性カンナビノイドやそれらの受容体、生合成および分解に関与する酵素から構成されている。内在性カンナビノイド系は中枢・末梢神経系を中心に、記憶・食欲・痛みなどのさまざまな生理学的・病理学的な機能を有している。カンナビノイド受容体の１種である１型カンナビノイド受容体（CB１受容体）は、中枢神経系の神経細胞に発現し、脳内で最も発現量の高い G タンパク質共役型受容体である。先行研究から、CB１受容体活性が加齢性記憶障害に深く関与することが示唆されているが、そのメカニズムは不明である。興味深いことに、CB１受容体は細胞膜のみならずミトコンドリア外膜にも発現していること、さらにこのミトコンドリアに局在する CB１受容体が記憶に重要な役割を果たすことが分かっている。そこで、本研究では CB１受容体のミトコンドリア品質管理機構における役割に着目し、加齢性記憶障害を示すモデル動物である CB１受容体ノックアウトマウスの海馬において、ミトコンドリア形態とマイトファジーの加齢に伴う変化を解析した。

本博士論文は４章から構成され、以下に各章の概要を記述する。

第１章では、序論を記述した。まず、ミトコンドリアと老化に関する重要な先行研究を概説した。次に、内在性カンナビノイド系の分子メカニズムや生体内における役割、エネルギー代謝への影響に関する先行研究を概説した。

第２章では、本研究で使用した実験方法を記述した。

第３章１節では、マイトファジーに重要である、ユビキチン６５番セリンのリン酸化産物（Ser65-pUb）のマウス海馬における免疫組織化学的な解析結果について記述した。マイトファジーの際、傷害ミトコンドリアはオートファゴソームと呼ばれる二重膜によって隔離され、その後リソソームと融合することで傷害ミトコンドリアは分解される。Ser65-pUb は、傷害ミトコンドリアの周りにオートファゴソー

ムを形成するために重要な分子である。培養細胞を用いた実験によってSer65-pUb の形成メカニズムに関しては明らかにされている一方で、Ser65-pUbの免疫組織化学的な知見はほとんど存在せず、組織における Ser65-pUb の役割は不明な点が多かった。そこで、マウス海馬を例にとって、組織における Ser65-pUbを免疫組織化学的に解析した。その結果、マウス海馬において一部の細胞は強くSer65-pUb のシグナルを呈する一方で、その他の細胞ではほとんどシグナルを呈しないことが分かった。さらに、Ser65-pUb 生成に重要なキナーゼとして唯一知られている PTEN-induced kinase1（PINK１）をノックアウトしたマウスの海馬では、Ser65-pUb 陽性細胞密度は有意に減少するものの、依然として Ser65-pUb 陽性細胞が残存することが分かった。また、Ser65-pUb 陽性細胞密度の減少が、海馬のどの領域に顕著に観察されるか解析した結果、PINK１ノックアウトで観察された Ser65-pUb 陽性細胞密度の減少は、主に CA３錐体細胞層および歯状回果粒細胞層に由来することが分かった。さらに、加齢に伴って組織に蓄積して自家蛍光を発するリポフスチンと、Ser65-pUb シグナルは共局在しないことが明らかとなった。最後に、Ser65-pUb シグナルが、海馬を構成するどのような細胞種に発現しているか解析した結果、Ser65-pUb 陽性細胞は神経細胞マーカーと共局在することが分かった。これらの結果から、マウス海馬において Ser65-pUb は一部の神経細胞のみに PINK１部分依存的に強く発現していることが明らかとなった。Ser65-pUb がマイトファジーに重要であることを踏まえると、Ser65-pUb で惹起されるマイトファジーは海馬神経細胞の保護に関与している可能性がある。また、ユビキチンの６５番目のセリンをリン酸化するキナーゼはこれまで PINK１のみしか報告されていないことから、PINK１非依存的で未報告の Ser65-pUb 生成メカニズムが存在する可能性があることにも触れた。

第３章２節では、第３章１節の結果を踏まえて、加齢性記憶障害モデル動物におけるミトコンドリアダイナミクスおよびマイトファジーを解析した結果を記述した。本研究では、若齢期のマウスとして１～２ヶ月齢の個体、一方で成熟期のマウスとして６～７ヶ月齢の個体を使用した。はじめに、加齢および CB１受容体の遺伝型が、マイトファジーの活性に影響を及ぼすか解析した。まず、第３章１節での実験結果に基づいて、海馬における Ser65-pUb の発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、野生型の海馬においては、Ser65-pUb 陽性細胞密度は若齢期と成熟期の間でほとんど変化しない一方で、CB１-KO の海馬では加齢に伴って有意に減少することが分かった。また、この変化が海馬のどの領域に顕著に観察されるか解析した結果、成熟期の CB1-KO で認められた Ser65-pUb 陽性細胞密度の減少は、主に CA１錐体細胞層に由来することが明らかとなった。興味深いことに、若齢期の CB1-KO の CA１錐体細胞層では、同齢の野生型に比べて Ser65-pUb 陽性細胞密度が逆に増加することが分かった。以上の結果を裏付けるために、透過型電子顕微鏡を用いて、CA１錐体細胞層の神経細胞において、オートファゴソームによっ

て隔離されているミトコンドリア様構造（マイトファゴソーム）の出現頻度を解析した。その結果、成熟期の野生型に比べて、CB1-KO の CA1 錐体細胞層の神経細胞では有意にマイトファゴソームの出現頻度が減少していることが分かった。次に、加齢および CB1 受容体の遺伝型が、ミトコンドリア形態に影響を及ぼすか解析した。まず、透過型電子顕微鏡を用いて、CA1 錐体細胞層の神経細胞におけるミトコンドリア形態を解析した。その結果、野生型では加齢に伴ってミトコンドリアのサイズの増加が認められた。また、野生型では加齢に伴ってミトコンドリアの形態が均質な円形に変化した。一方、CB1-KO においては、ミトコンドリアのサイズは顕著には変化せず、有意な伸長が認められた。さらに、収束イオンビーム走査型電子顕微鏡を用いて、CA1 錐体細胞層の神経細胞におけるミトコンドリアの三次元的な形態を解析した。その結果、若齢期においては、野生型と CB1-KO の間で顕著な三次元形態の違いは認められなかった。一方で、成熟期の野生型では、透過型電子顕微鏡の結果を裏付けるように、円形のミトコンドリアが均質に観察された。一方で、成熟期の CB1-KO においては、ミトコンドリアの顕著な伸長および相互接続が認められた。これらの結果から、CB1 受容体はマウス海馬神経細胞において、加齢依存的にマイトファジーおよびミトコンドリア形態を制御していることが明らかとなった。先行研究において、海馬におけるマイトファジー活性が加齢に伴って減弱することや、ミトコンドリアの分裂阻害が海馬において神経変性を引き起こすことが示唆されている。また興味深いことに、先行研究ではストレスを受けたミトコンドリアが伸長・相互接続し、オートファジーによる分解から免れることが示唆されている。したがって、CB1 受容体が制御するミトコンドリア品質管理機構は、加齢に伴う諸々のストレスから神経細胞を保護し、エネルギー恒常性を担保している可能性がある。さらに、ミトコンドリア形態やマイトファジーを制御する CB1 受容体の下流分子としてプロテインキナーゼ A やダイナミン様 GTPase が存在する可能性を記述した。

第 4 章では、本研究のまとめと今後の展望について記述した。本研究における実験結果から、CB1-KO において記憶障害が急速に起こるメカニズムとして、マイトファジー不全やミトコンドリア分裂阻害によって神経細胞に傷害ミトコンドリアが蓄積する可能性を提唱した。先行研究から、CB1 受容体は肝臓や骨格筋などの末梢組織においてエネルギー代謝に深く関与していることが示唆されている。本研究によって、CB1 受容体は中枢神経系の神経細胞においてもエネルギー恒常性の維持に寄与する可能性が示唆された。以上の CB1 受容体がエネルギー恒常性に関与するという仮説は、加齢性記憶障害のメカニズムに新たな視点を与えると考えられる。また、内在性カンナビノイド系は神経系を有するほぼ全ての動物に保存されていることから、さまざまな老化モデル動物において内在性カンナビノイド系の役割を解析することも興味深い。本研究成果は、加齢に伴い記憶能力が変化するメカニズムを解明する上で重要な足がかりとなると期待される。

# 早稲田大学　博士（理学）　学位申請　研究業績書

氏 名　片岡 孝介　印

（2020 年 5 月 現在）

| 種 類 別 | 題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む） |
|---|---|
| 論文 | ○Kataoka, K., Bilkei-Gorzo, A., Nozaki, C., Togo, A., Nakamura, K., Ohta, K., Zimmer, A., Asahi, T. (2020) Age-dependent alteration in mitochondrial dynamics and autophagy in hippocampal neuron of cannabinoid CB1 receptor-deficient mice, *Brain Research Bulletin* **160**, 40-49, DOI: 10.1016/j.brainresbull.2020.03.014 |
| 講演 | 片岡孝介, Andras Bilkei-Gorzo, Andreas Zimmer, 朝日透, カンナビノイド受容体 CB1 の海馬内マイトファジーへの関与, 第 18 回日本ミトコンドリア学会年会, 久留米, 福岡, 2018 年 12 月.<br><br>Kataoka, K., Bilkei-Gorzo, A., Nidadavolu, P., Nozaki, C., Zimmer, A., Asahi, T. Mitophagy in hippocampal pyramidal neurons is reduced by cannabinoid receptor CB1 deficiency, Cluster Science Day 2018 and the 10th International Symposium of IFReC, Bonn, Germany, November 2018.<br><br>Kataoka, K., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., Asahi, T. Brain ageing from the points of mitochondria and cannabinoid, MIRAI Ageing Workshop, Gothenburg, Sweden, June 2018.<br><br>Kataoka, K., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., Asahi, T. Cannabinoid receptor 1 deletion leads to reduction in phosphorylated ubiquitin in hippocampal pyramidal cell layer, 4th Core-to-Core International Symposium, Bonn, Germany, March 2018. |
| その他<br>（論文） | Kataoka, K., Minei, R., Ide, K., Ogura, A., Takeyama, H., Takeda, M., Suzuki, T., Yura, K., Asahi, T. (2020) The Draft Genome Dataset of the Asian Cricket *Teleogryllus occipitalis* for Molecular Research toward Entomophagy, *Frontiers in Genetics*, in press, DOI: 10.3389/fgene.2020.00470<br><br>Kataoka, K., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., Asahi, T. (2020) Immunohistochemical characterization of phosphorylated ubiquitin in the mouse hippocampus, *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2020.01.20.912238<br><br>Wada, T., Hanyu, T., Nozaki, K., Kataoka, K., Kawatani, T., Asahi, T., Sawamura. N. (2018) Antioxidant activity of Ge-132, a synthetic organic germanium, on cultured mammalian cells, *Biological and Pharmacological Bulletin* **41**(5), 749-753, DOI: 10.1248/bpb.b17-00949<br><br>Kataoka, K., Nakamura, C., Asahi, T., Sawamura. N. (2016) Mitochondrial cereblon functions as a Lon-type protease, *Scientific Reports* **6**, 29986, DOI: 10.1038/srep29986 |
| その他<br>（講演） | 片岡孝介, 嶺井隆平, 井手圭吾, 小倉淳, 竹山春子, 竹田真木生, 鈴木丈詞, 由良敬, 朝日透, タイワンエンマコオロギの全ゲノム塩基配列解読：大量生産に向けた高効率品種改良技術の幕開け, 第 64 回応用動物昆虫学会大会, 名古屋, 2020 年 3 月.<br><br>片岡孝介, 朝日透, 澤村直哉, Cereblon promotes mitochondrial degradation via autophagy in human neuroblastoma cells, 第 60 回日本神経化学会大会, 仙台, 2017 年 9 月.<br><br>Kataoka, K., Asahi, T., Sawamura, N. Cereblon promotes mitophagy in human neuroblastoma cells, The 8th International Symposium on Autophagy, Nara, Japan, May 2017. |

# 早稲田大学　博士（理学）　学位申請　研究業績書

| 種 類 別 | 題名、　発表・発行掲載誌名、　発表・発行年月、　連名者（申請者含む） |
|---|---|
| その他<br>（講演） | 片岡孝介, 朝日透, 澤村直哉, Cereblon の Lon protease としての機能解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2016 年 11 月.<br><br>片岡孝介, 皮膚健康モニタリングにむけた EDGE プログラムでの取り組み, 平成 28 年度 WASEDA-EDGE 人材育成プログラムシンポジウム 受講生成果報告, 2016 年 12 月.<br><br>Kataoka, K., Asahi, T., Sawamura, N. The Role of Cereblon as s Lon-type protease, The 13th conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine [J-mit], Tokyo, Japan, October 2016.<br><br>片岡孝介, 朝日透, 澤村直哉, Cereblon の Lon protease としての役割, 第 15 回日本ミトコンドリア学会年会, 福井, 2015 年 11 月.<br><br>片岡孝介, 朝日透, 澤村直哉, Mitochondria-targeted cereblon suppressed stress-induced cell death, 第 58 回日本神経化学会大会, 埼玉, 2015 年 9 月.<br><br>片岡孝介, 丸山祐丞, 島岡未来子, 大橋啓之, 動物生体バランス, 第３回 EDGE プログラムシンポジウム DEMO DAY, 東京, 2015 年 9 月.<br><br>片岡孝介, 朝日透, 澤村直哉, 精神遅滞候補遺伝子産物セレブロンのミトコンドリアにおける機能解析, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 東京, 2015 年 7 月.<br><br>Kataoka, K., Asahi, T., Sawamura, N. Functional analysis of mitochondria-targeted cereblon, The 16th Joint Symposium between the University of Bonn and Waseda University, Tokyo, Japan, February 2015.<br><br>Kataoka, K., Asahi, T., Sawamura, N. Functional analysis of cereblon protein in mitochondria, EMNT2014 10th International Symposium on Electrochemical Micro and Nanosystem Technologies, Okinawa, Japan, November 2014.<br><br>Kataoka, K., Asahi, T., Sawamura, N. Functional analysis of cereblon, a candidate gene product for intellectual disability, in mitochondria, Three-Dimensional Development of Lab-Exchange Type Biomedical Science Research Consortium, Chiba, Japan, September 2014. |

# 早稲田大学　博士（理学）　学位申請　研究業績書

| 種 類 別 | 題名、　発表・発行掲載誌名、　発表・発行年月、　連名者（申請者含む） |
|---|---|
| その他<br>（受賞） | 神経化学教育口演優秀発表賞，片岡孝介，朝日透，澤村直哉，Mitochondria-targeted cereblon suppressed stress-induced cell death, 第 58 回日本神経化学会大会, 埼玉, 2015 年 9 月.<br><br>最優秀賞, 片岡孝介, 丸山祐丞, 島岡未来子, 大橋啓之, 動物生体バランス, 第 3 回 EDGE プログラムシンポジウム DEMO DAY, 東京, 2015 年 9 月. |