

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15069

研究課題名(和文) AIS微小管による新しい神経機能制御機構の研究

研究課題名(英文) MTCL1 plays an essential role to maintain axon initial segment

研究代表者

鈴木 厚 (SUZUKI, Atsushi)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：00264606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：MTCL1の遺伝子改変マウスが小脳プルキンエ細胞の「AIS微小管束の形成異常」と「AISの構造・機能の異常」を示し、そのことに起因する運動失調症を呈することを明らかとした。そして、こうした異常がMTCL1の微小管束化、安定化活性の欠失に起因していることを証明した。さらに、原因不明の脊髄小脳変性症を示す患者さんゲノム200例に対してMTCL1遺伝子のエキソーム解析を進め、一家系ではあるが、MTCL1の機能に不可欠なC末端微小管結合領域に点変異が認められることを発見した。さらに、この変異が実際にプルキンエ細胞におけるMTCL1のAIS微小管制御活性を損なっていることもあきらかとした。

研究成果の概要(英文)：The axon initial segment (AIS) is a specialized domain essential for neuronal function, the formation of which begins with localization of an Ankyrin-G (AnkG) scaffold. However, the mechanism directing and maintaining AnkG localization is largely unknown. In this study, we demonstrate that in vivo knockdown of MTCL1 in cerebellar Purkinje cells causes loss of axonal polarity coupled with AnkG mislocalization. MTCL1 lacking MT-stabilizing activity failed to restore these defects. Interestingly, during postnatal AIS development, colocalization of MTCL1 with these stable MT bundles was transiently observed in the axon hillock and proximal axon. These results indicate that MTCL1-mediated formation of stable MT bundles is crucial for AnkG localization. We also demonstrate that Mtcl1-gene disruption results in abnormal motor coordination with Purkinje cell degeneration, and provide evidence suggesting possible involvement of MTCL1 dysfunction in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：微小管 軸索起始部 架橋 MTCL1 脊髄小脳変性症 アンキリン プルキンエ細胞

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の軸索起始部 (AIS) は、イオンチャンネルの凝縮と、細胞質内における分子篩機能に働くことを通じて、活動電位の発生とその伝導路である軸索の機能を維持する役割を果たしている。そして、アクチン系にリンクするスペクトリン-アンキリン系が、この機能に必要な膜裏打ち構造の形成に働いていることも研究開始前に判明していた。しかし、この構造の形成に不可欠なアンキリンの局在がいかに制御されているのかという点は不明であった。一方、AIS の分子篩機能を担う実体も明らかではなかった。

我々は細胞極性制御機構の研究を進める中で、細胞極性制御キナーゼ PAR-1 の結合タンパク質として、新規の微小管架橋・安定化因子、MTCL1 (microtubule crosslinking factor 1) を 2014 年に同定した。そして、この MTCL1 の遺伝子改変マウスを解析したところ、このマウスはほぼ正常に発生し発育するものの、活発に動き始める生後 3 週あたりから後ろ足の運びが乱れるなど、典型的な小脳性の運動失調を示し始めることが明らかになった。その後の解析により、MTCL1 が高い発現を示す小脳プルキンエ (PJ) 細胞の活動電位がこのマウスでは低下していること、そしてこの異常は小脳機能に決定的に重要な PJ 細胞の AIS の形態異常に起因することが示された。これらの結果は、これまでその存在が知られながらも機能がほとんどわかっていなかった「AIS を貫く安定化した微小管の束 (AIS 微小管束)」の形成に MTCL1 が働き、そのことを介してアンキリンの局在、AIS の形成に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものであった。実際、MTCL1 は PJ 細胞の発達段階で AIS に特徴的な濃縮を示すことも判明しており、電子顕微鏡による解析からは、MTCL1 遺伝子改変マウスの PJ 細胞では AIS 微小管束の整列が乱れていることも明らかとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では「MTCL1 が AIS 微小管の形成・維持を制御することを通じて、小脳 PJ 細胞の機能発揮に不可欠な役割を果たしている」という仮説を証明することを目的とした。また同時に、これまで不明であった AIS の構造・機能の発達・維持における AIS 微小管の役割を明らかにすることを目指した。一方、発症原因が未知であるヒト脊髄小脳変性症の患者さんゲノム 200 例に対して MTCL1 のエキソーム解析を行い、MTCL1 の遺伝子変異がヒト疾患の原因になっている可能性を検討することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 子宮穿孔法 (in utero electroporation 法) による、小脳 PJ 細胞特異的な MTCL1 ノックダウン

胎生 11.5 日のマウス胎児の第 4 脳室に、マウス MTCL1 に対するノックダウン配列と GFP を同時に発現するプラスミド (2.5-5ug) を子宮外から注入し、子宮電子穿孔法によって小脳内に導入した。本方法による DNA の導入は、ほぼ PJ 細胞特異的に起こることはすでに報告されている。レスキュー実験を行う際には、上記プラスミドにさらに RNA 抵抗性のマウス MTCL1 野生型、あるいは変異体を発現するカセットを挿入した。

(2) PJ 細胞特異的 MTCL1 コンディショナルノックアウトマウスの解析

MTCL1 のエクソン 1 の前後に loxP 配列が挿入されたゲノムを有するホモマウスを作成し、これを PJ 細胞特異的プロモーター、Pcp2 プロモーターの下流で Cre を発現しているマウスと交配させることによって作成した。

(3) ヒト脊髄小脳変性症患者ゲノムのエキソーム解析

発症原因が不明な患者さんから採取した末梢白血球より、ゲノム DNA を抽出し、MTCL1 のすべてのエクソン配列を増幅したのちに、次世代シーケンサーによる解析に付した。本実験は、三省のヒトゲノム解析に関する共通指針 (2001 年・2005 年改訂) を遵守し、「横浜市立大学医学部倫理委員会」において申請・承認を得た上で、患者さんへの十分な説明に基づく同意を得て採取されたサンプルに対して進められた。

4. 研究成果

(1) PJ 細胞における MTCL1 の消失は、AnkyrinG の AIS 局在を阻害し、軸索極性の発達を障害する

本研究を開始する段階では、MTCL1 ジーントラップマウス (第 4 イントロンにトラップベクターが挿入された結果、N 末微小管架橋領域のみを有する MTCL1 が全身で発現しているマウス) を解析することによって、MTCL1 の異常が AIS の形態・機能に異常を引き起こすことが示されていた。ただ厳密に言うとこの実験では、PJ 細胞の異常が、他の細胞に起こった異常の 2 次的結果である可能性を否定できなかった。また、MTCL1 の N 末端の活性が残っているという問題が結果の解釈を複雑にしていた。そこで本研究では、子宮穿孔法によるノックダウン実験によって PJ 細胞特異的に MTCL1 の発現を消失させ、その AIS 形成への影響を検討した。

GFP (ノックダウン配列と共発現する)の蛍光シグナルを発している PJ 細胞特異的に MTCL1 の発現の消失が確認された。そうした PJ 細胞は、胎生期から MTCL1 の発現が抑制されていると思われるにも関わらず、生後に進む PJ 細胞の移動と整列にほとんど影響を与えていなかった。すなわち、MTCL1 はこうした小脳のマクロな形態形成過程には必須ではないことが明らかとなった。細胞質内全体に行き渡る GFP の蛍光シグナルに基づいて細胞の形態を検討した際にも、巨視的に見た限りでは、PJ 細胞に顕著な異常は見られず、特に樹状突起の枝分かれの異常等は観察されなかった。ただ、AIS に着目して、高拡大で詳細な解析を進めたところ、生後 3 週令マウス小脳の多くの PJ 細胞で AIS 領域付近の軸索の形態がいびつとなり、表面に突起が出現するようになっていることが観察された (図 1: type2)。特に異常が顕著な約 30%ほどの細胞 (type3) では、軸索表面から枝分かれした多数の突起が伸びている様子が確認された。興味深いことに、AnkyrinG の染色結果から、こうした AIS の形態異常は、AnkyrinG の局在異常と密接に対応していることが判明した (図 1)。すなわち、形態異常が比較的穏やかな細胞では、AnkyrinG が軸索の根元から離れた領域に局在しており、一方、激しい突起を形成するようになっている細胞では AnkyrinG の局在が完全に消失していた。AnkyrinG の局在は AIS 構造の形成に必須であることがすでに示されていることから、この結果は MTCL1 の消失が AIS の構造の形成、あるいは維持に決定的な役割を果たしていることを示唆していた。この結論は、type3 の軸索上に形成された突起の先にはポスト、およびプレのシナプスマーカーが検出されたことによって支持された。すなわち、こうした細胞では AIS 構造が消失し、軸索極性 (軸索特異的な小胞輸送) が消失している (樹状突起が形成されている) と考えられた。

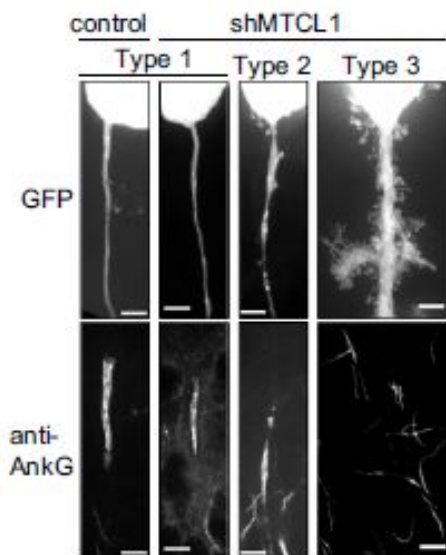


図 1. MTCL1 ノックダウンの効果

こうした MTCL1 ノックダウンが引き起こす PJ 細胞 AIS の異常は、RNA 抵抗性の野生型 MTCL1 を同時に共発現することで大きく改善した (図 2)。一方、C 末端微小管結合、安定化部位を消失した変異体の共発現では、ほとんどレスキューが観察されなかった。一方、N 末端微小管結合部位を欠き、C 末微小管結合部位を保持している変異体は、AnkyrinG の局在は改善したものの、その局在位置についてはレスキュー効果を示さなかった。以上の結果は、MTCL1 の AIS 形成・維持促進作用がその微小管制御活性に依存したものであることを示すとともに、特に C 末端を介した微小管安定化活性が重要な機能を果たしていることを示していた。

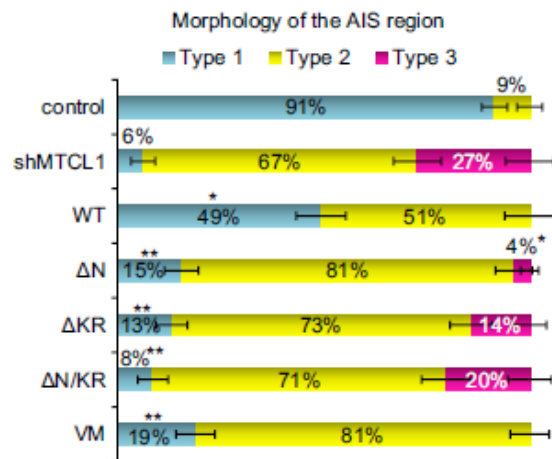


図 2 MTCL1 ノックダウン効果に対する各 MTCL1 変異体のレスキュー活性の比較

(2) PJ 細胞特異的 MTCL1 コンディショナルノックアウトマウスの解析

Pcp2 プロモーターは生後 1 か月から活性化するという報告に一致して、Pcp2-Cre を利用した MTCL1 遺伝子のノックアウト効果 (MTCL1 タンパク質の発現消失) は生後 2 週目以降に確認された。そして、こうした状況でもマウスは明らかな運動失調を示した。このことから、ジーントラップマウスに見られた表現型は、PJ 細胞における MTCL1 の機能の消失に起因することが最終的に確認されるとともに、MTCL1 は AIS 構造を維持する段階にも不可欠であることが示された。驚いたことに、ジーントラップマウスと同様、これらのマウスでも AIS における AnkyrinG の局在は維持されており、ただ AIS の幅が上昇しているだけであった。こうした結果は、子宮穿孔法で引き起こしたような急激な MTCL1 の消失が引き起こす AnkyrinG の消失とは比べ物にならないほどのわずかな AIS の異常が運動失調を引き起こすことに十分であることを示している。

(3) MTCL1 の微小管安定化能の低下を引き起こす C 末 V1435M 変異が、ヒト脊髄小脳変性症患者一家系に同定された。

200 例の患者ゲノムにおける MTCL1 のエキソーム解析から、1435 番目バリンのメチオニンへの変異が親子で確認された。さらに、同変異を導入した発現タンパク質が培養細胞を用いた実験において微小管安定化活性の顕著な低下を引き起こしたと、そして、対応する変異を導入したマウス MTCL1 は、PJ 細胞における MTCL1 ノックダウンが引き起こす AIS 形態異常を回復させる活性が顕著に低下している (図 2) ことが示された。一家系での変異の確認では、この変異が疾患の原因であると結論するには弱い、本研究における結果は、MTCL1 の変異がヒト脊髄小脳変性症の原因の一つ、少なくとも遺伝的背景の一つになっている可能性を示すものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Satake T, Yamashita K, Hayashi K, Miyatake S, Tamura-Nakano M, Doi H, Furuta Y, Shioi G, Miura E, Takeo YH, Yoshida K, Yahikozawa H, Matsumoto N, Yuzaki M, Suzuki A. MTCL1 plays an essential role in maintaining Purkinje neuron axon initial segment. *EMBO J*. 2017 May;36(9):1227-1242. (査読あり) doi: 10.15252/embj.201695630.

〔学会発表〕(計 3 件)

佐竹智子、鈴木厚 微小管架橋/安定化因子 MTCL1 は、軸索起始部 AIS 形成に必須である 第 68 回 日本細胞生物学会年会 2016 年 6 月 17 日 京都府民総合交流プラザ、京都府

佐竹智子、鈴木厚 軸索起始部 AIS の形成における微小管架橋/安定化因子 MTCL1 の役割 第 39 回 日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 1 日 パシフィコ横浜、神奈川県

Tomoko Satake, Atsushi Suzuki. Role of MTCL1, a microtubule crosslinking and stabilizing protein, in the formation of axon initial segment. 米国細胞生物学会年会 2016 年 12 月 4 日 サンフランシスコ Moscow センター、米国

〔その他〕

研究室 HP:

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/mcbl/suzuki/index.html>

本研究成果を報じた大学 HP の記事: [運動失](#)

調症が引き起こされる新たなメカニズムを発見しました！”

http://www.yokohama-cu.ac.jp/res_pro/news/10170324.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 厚 (SUZUKI, Atshsui)
横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授
研究者番号: 00264606

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐竹 智子 (SATAKE, Tomoko)
横浜市立大学・生命医科学研究科・
特任助教、 研究者番号: 21635130

宮武 聡子 (MIYATAKE, Satoko)
横浜市立大学・附属病院・講師、
研究者番号: 50637890

(4) 研究協力者

なし