

令和元年6月12日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01949

研究課題名(和文) 有髄神経軸索のIP3R1およびERの分布におけるパラノードルジャンクションの役割

研究課題名(英文) Functional roles of paranodal axoglial junctions in IP3R1 distribution in myelinated axons.

研究代表者

石橋 智子 (ISHIBASHI, TOMOKO)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50453808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：有髄神経軸索のランビエ絞輪隣には、活動電位発生に関与する電位依存性チャンネルの局在化に必須の構造、髄鞘-軸索間結合paranodal axoglial junction(AGJ)が存在する。本研究では、AGJ形成が軸索表面の膜タンパク質の局在化のみならず、軸索内部の小胞体(ER)および小胞体 ミトコンドリア近接部位(MAM)の分布にも影響を及ぼすことを明らかにした。AGJ形成不全軸索では、ERに局在するカルシウムチャンネルIP3R1の集積が軸索局所に認められ、この集積を引き金に軸索腫脹を引き起こす。すなわち、AGJが軸索内カルシウム恒常性維持に極めて重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物神経軸索の多くは、生後軸索周囲に髄鞘を形成することにより跳躍伝導を可能にする。しかしながら一旦形成された髄鞘が障害を受けると、無髄軸索に戻るのではなく軸索変性が生じる。軸索に髄鞘を繋ぎ止める部位であるAGJは、損傷を受けやすい構造であり、わずかなAGJの崩壊が限局した軸索腫脹を引き起こすことが本研究から示唆された。また、軸索腫脹の引き金が、カルシウム恒常性維持に関与する分子IP3R1の軸索局所での過剰発現であることを示し、IP3R1の発現を抑制すると軸索腫脹およびその後の神経細胞死を改善することができた。この結果は多発性硬化症など脱髄性疾患の初期病態を理解する一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Myelin loops attach to the axonal membrane and form paranodal axoglial junctions (AGJ) at paranodes adjacent to nodes of Ranvier. AGJ play important roles in the organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. To better understand how AGJ regulate axonal functioning, we studied cerebroside sulfotransferase knockout (CSTko) mice that partially lack of AGJ. In CSTko cerebellar Purkinje axons, IP3R1-positive focal accumulations were the earliest finding in the axonal swellings, and subsequent the accumulation of MAM-related proteins were observed. CSTko/IP3R1heterozygote mice have less than half the normal level of IP3R1, and we found a marked decrease of the number of swellings, which suggesting that the focal accumulation of IP3R1 triggers cerebellar Purkinje axonal swellings and subsequent Purkinje cell death in CSTko mice. Our results imply that AGJ may have an important role in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in myelinated Purkinje axons.

研究分野：神経生物学

キーワード：パラノードルジャンクション 小胞体ミトコンドリア近接領域 プルキンエ細胞軸索 髄鞘(ミエリン)  
IP3R1

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の神経軸索の多くは周囲を髄鞘に覆われている。髄鞘は神経軸索を絶縁し、効率よく跳躍伝導を引き起す必要不可欠な構造であるが、それだけではない。ランビエ絞輪部両隣パラノード部位では、軸索と髄鞘が直接接して paranodal axo-glial junction (AGJ) を形成する。生後、軸索周囲を髄鞘が巻き始め AGJ が形成されると、軸索表面全体に存在していた電位依存性ナトリウムチャンネルはランビエ絞輪に、電位依存性カリウムチャンネルはパラノードの隣ジャクスタパラノードに局在を変える (Ishibashi et al. 2002; Arancibia-Carcamo et al. 2014)。すなわち、AGJ は軸索表面のチャンネルの局在変化・維持に必須の障壁として働いている。ところが、AGJ 形成不全を呈するマウス、cerebroside sulfotransferase 欠損 (CSTko) マウスを用いた研究より、AGJ が軸索表面分子の局在だけではなく、ミトコンドリアや小胞体の分布など軸索内動向にも積極的に関与していることが明らかになってきた。

CSTko マウスは、髄鞘の主要糖脂質であるスルファチド合成酵素が欠損し、中枢・末梢神経軸索ともに AGJ 形成不全を示すが、脱髄は引き起さないため (Honke et al. 2002)、AGJ の機能を調べるための最適なモデル動物である。最近 CSTko マウス小脳を用いた研究より、以下の所見を見出している。小脳プルキンエ細胞特異的に 1) 軸索の腫脹が認められること、この軸索腫脹は週齢を経るにつれ大きくなり、数も増加し、最終的にミトコンドリアや軸索骨格タンパクなどが蓄積し軸索輸送障害が認められること、2) 軸索腫脹部位はパラノードではなく、コンパクトミエリンに覆われたインターノード部分であり、3) 神経症状が見られるより前、髄鞘が形成されるとすぐ軸索腫脹は認められること (生後 11 日)。また、興味深いことに、軸索腫脹の極めて初期の変化として、IP<sub>3</sub> 誘導性のカルシウムチャンネルである I 型 IP<sub>3</sub> 受容体 (IP<sub>3</sub>R1) の集積がある (Ishibashi et al. 2015)。さらに、欠損軸索では、滑面小胞体 (ER) が過剰に層構造を成している所見も認められる (第 58 回日本神経化学会発表)。In vitro で IP<sub>3</sub>R1 を過剰発現させると ER が同様の形態変化を示すことが報告されている (Takei et al. 1994)。つまり AGJ 形成不全を呈する CSTko 軸索では、局所的に IP<sub>3</sub>R1 が過剰になりカルシウム濃度が上昇している可能性が示唆された。

IP<sub>3</sub>R1 は細胞内カルシウム貯蔵庫からカルシウムを放出するチャンネルであり、ER に存在している (Takei et al. 1992)。なかでも IP<sub>3</sub>R1 は小脳プルキンエ細胞に豊富に発現し、樹状突起のスパイン形成やシナプスにおける機能など様々な働きが明らかになっている (Mikoshiha 2007)。しかしながら、IP<sub>3</sub>R1 の軸索での役割はほとんど明らかにされておらず、また髄鞘との関係については全く報告がない。

## 2. 研究の目的

有髄神経軸索のランビエ絞輪部両隣には、活動電位発生を担っているチャンネル分子の局在化に必須の構造、髄鞘-軸索間結合 paranodal axo-glial junction (AGJ) が存在する。この AGJ が軸索表面分子の局在だけではなく、ミトコンドリアの分布など軸索内動向に積極的に関与していることが、明らかになりつつある。本研究では、AGJ の軸索機能恒常性維持における役割、特にカルシウム調節に関与している分子 IP<sub>3</sub>R1 や ER の軸索内局在変化を、どのように制御しているのか明らかにすることを目的とする。得られた結果は、神経系における髄鞘の新たな機能を理解するだけでなく、脱髄性疾患等における初期の軸索変化を理解する手掛かりになると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) CST/IP<sub>3</sub>R1 double ko マウスの解析

CSTko マウスプルキンエ細胞軸索の腫脹は、IP<sub>3</sub>R1 の限局的な集積が引き金になっている可能性があり、IP<sub>3</sub>R1 がなければ軸索腫脹は生じないのではないかと推測された。この仮説を検証するため、CST/IP<sub>3</sub>R1 double ko マウスの解析を行った。IP<sub>3</sub>R1<sup>-/-</sup> マウスは生後 14 日前後で死んでしまうため、CST<sup>-/-</sup>/IP<sub>3</sub>R1<sup>+/-</sup> マウスを解析に使用した。具体的には、軸索腫脹が明らかに認められる生後 18 日齢、4 週齢、および腫脹部が多くなり、数も増加する 8 週齢マウスを灌流固定後、小脳凍結切片を作製し、抗 calbindin 抗体、抗 Caspr 抗体 (AGJ のマーカー)、および抗 IP<sub>3</sub>R1 抗体などを用いて、免疫組織化学的に解析した。コントロールとして同腹の正常および CST<sup>-/-</sup> マウスも同時に使用し、各週齢 3 匹以上の動物を用いた。

### (2) 小脳組織由来 in vitro 髄鞘培養系を用いた解析

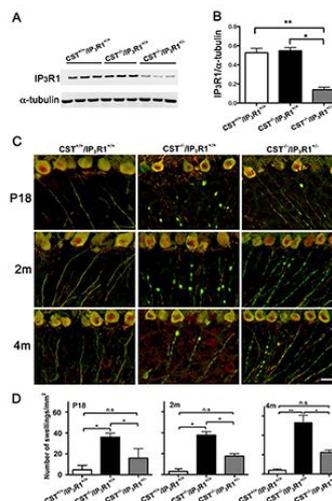
AGJ 形成不全を呈すると、なぜパラノード部分ではなく、髄鞘に覆われたインターノード部分

に軸索の異常、すなわち軸索腫脹が生じるのか非常に興味深い。IP<sub>3</sub>R1 の集積が最も初期の変化であることより、IP<sub>3</sub> シグナリングの関与が示唆される。IP<sub>3</sub> は細胞内カルシウムストアからカルシウム放出を制御するセカンドメッセンジャーであり、細胞外からの刺激に応じて、様々な細胞機能を調節することが知られている(Mikoshiha J Neurochem. 2007)。例えば、小脳平行線維の活動は、神経終末からのグルタミン酸放出を起こし、プルキンエ細胞において mGluR 依存的に IP<sub>3</sub> シグナリングを活性化する (Furutani et al. PNAS 2006)。しかしながら、軸索で IP<sub>3</sub> 産生が果たしている役割に関して、知見は非常に乏しい。申請者は、髄鞘形成、特にオリゴデンドロサイトが軸索に接すること(あるいは AGJ 形成)自体が、軸索への刺激になり、IP<sub>3</sub> シグナリングを活性化している可能性を考慮した。この仮説を検証するためには、オリゴデンドロサイトの突起の変化、および AGJ 形成を、経時的に観察可能な *in vitro* 髄鞘培養系を用いる必要がある。生後 1 日齢マウス小脳を無血清培地で培養しプルキンエ細胞が成熟した後に、別に準備したオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)を加える方法、あるいは胎生 12.5 日目の胎児小脳を分離し神経とグリア細胞の混合培養を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) CST/IP<sub>3</sub>R1 double ko マウスの組織学的解析

AGJ 形成不全を呈する CSTko マウスプルキンエ細胞軸索の腫脹の引き金が軸索局所での IP<sub>3</sub>R1 の過剰発現であるのか明らかにするために、CST<sup>-/-</sup>/IP<sub>3</sub>R1<sup>+/-</sup>マウスを作成した。作成したマウス小脳ホモジネートを用いて IP<sub>3</sub>R1 のタンパク量を調べると、CST<sup>-/-</sup>/IP<sub>3</sub>R1<sup>+/+</sup>および CST<sup>+/+</sup>/IP<sub>3</sub>R1<sup>+/+</sup>マウスと比較して半分以下に減少していた(右図 A, B)。このマウス的小脳切片を用いて免疫組織学的解析を行った結果、CST<sup>-/-</sup>/IP<sub>3</sub>R1<sup>+/+</sup>と比較して CST<sup>-/-</sup>/IP<sub>3</sub>R1<sup>+/-</sup>マウス小脳では軸索腫脹が顕著に減少していた(右図 C, D)。したがって、CST 欠損マウス小脳プルキンエ細胞軸索の腫脹の原因が、IP<sub>3</sub>R1 の軸索局所での過剰発現であることが強く示唆された。IP<sub>3</sub>R1 量が半分以下である CST<sup>-/-</sup>/IP<sub>3</sub>R1<sup>+/-</sup>マウスは、12 ヶ月齢 CST<sup>-/-</sup>/IP<sub>3</sub>R1<sup>+/+</sup>マウスで認められた、顕著な軸索変性およびプルキンエ細胞の脱落などは認められなかった。以上の結果より、小脳プルキンエ細胞軸索において、IP<sub>3</sub>R1 の量を制御することが軸索恒常性維持に重要であることが示唆された。

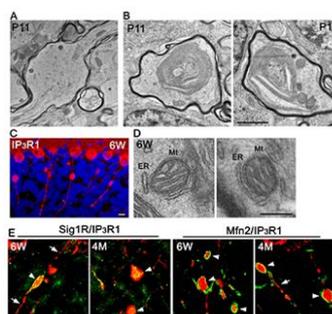


##### (2) 髄鞘形成に伴うプルキンエ細胞軸索 IP<sub>3</sub>R1 の分布の変化

IP<sub>3</sub>R1 は小胞体に存在するカルシウムチャネルである。AGJ 形成不全を呈する CSTko 軸索で IP<sub>3</sub>R1 の局在が変化していたことより、正常発達期、髄鞘形成に伴い IP<sub>3</sub>R1 の分布が変化する可能性が考えられた。そこで、正常マウス髄鞘形成時期に、AGJ 形成と IP<sub>3</sub>R1 局在変化を調べた結果、軸索全体に存在していた IP<sub>3</sub>R1 が、AGJ のマーカーである Caspr のパラノードへの局在化に伴いインターノード部分に限局することを見出した(左図 A, B)。*In vitro* の髄鞘形成培養系で、髄鞘形成に伴う IP<sub>3</sub>R1 の局在を詳細に調べた結果、髄鞘形成に伴い、ミエリンタンパク質である MBP 陽性のインターノード部位に IP<sub>3</sub>R1 に集まっていることが分かった(左図 E)。それに対して、細胞質に存在するカルシウム結合タンパク質である Calbindin は MBP の局在に関係なく、軸索全体に分布していた(左図 F)。したがって、髄鞘形成特に AGJ 形成が、軸索 IP<sub>3</sub>R1 の局在を変化させることが明らかになった。

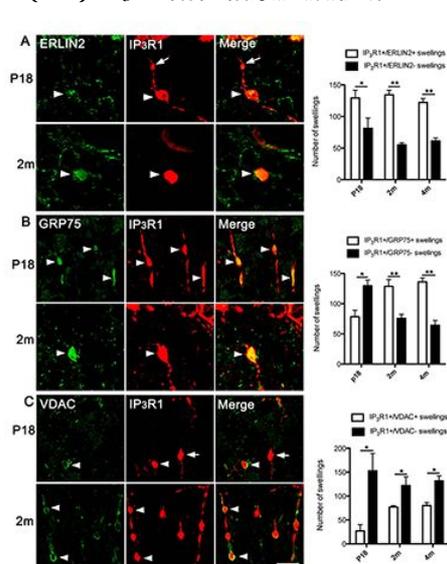
##### (3) CSTko プルキンエ細胞軸索腫脹部位の構造

CSTko マウス小脳プルキンエ細胞軸索の変化を電子顕微鏡



で詳細に調べた結果、発達期髄鞘形成の初期である生後 11 日にすでに腫脹している所見が認められ(右上図 A) 小胞体の多重層構造も有髄軸索内に認められた(右上図 B)。この多重層構造を呈する小胞体は、IP<sub>3</sub>R1 を過剰発現した場合に認められる所見であることが報告されている。したがって、免疫組織学的解析による IP<sub>3</sub>R1 陽性腫脹の所見(右上図 C)と、電子顕微鏡解析による小胞体の層構造所見は、同じ変化を見ている可能性が強く示唆された。軸索腫脹内をさらに詳細に観察した結果、小胞体とミトコンドリアが近接する部位 mitochondria-associated ER membrane (MAM)と呼ばれる構造が散見された(右上図 D)。IP<sub>3</sub>R1 は小胞体に存在するタンパクであるが、MAM にも豊富に存在することが知られている。したがって、IP<sub>3</sub>R1 陽性軸索腫脹部位に、MAM に存在するその他のタンパクも集積している可能性が考えられた。MAM に局在する小胞体側のタンパクとして Sig1R、ミトコンドリア側のタンパクとして Mfn2 に対する抗体を用いて免疫染色をした結果、IP<sub>3</sub>R1 陽性の腫脹部分に Sig1R (右上図 E) および Mfn2 (右上図 F) の陽性所見が認められた。以上の結果より、IP<sub>3</sub>R1 陽性の軸索腫脹部位には、MAM の構造が認められることが明らかとなった。

#### (4) IP<sub>3</sub>R1 陽性軸索腫脹形成にともなう MAM 構成分子の局在変化



IP<sub>3</sub>R1 陽性軸索腫脹部位に MAM 構成分子の集積が認められたが、それ以外の部位には Sig1R および Mfn2 陽性所見は認められなかった。すなわち、軸索 IP<sub>3</sub>R1 の局在変化が、他の MAM 分子の局在に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで、生後 18 日の腫脹形成初期および、腫脹の数が増え大きくなっている時期である 4 ヶ月齢の小脳切片を用いて、MAM 部位で IP<sub>3</sub>R1 と結合していることが明らかになっている分子 GRP75 および VDAC および、ERLIN2 の局在を調べた。その結果、ERLIN2 (左図 A)、GRP75 (左図 B) および VDAC (左図 C) いずれも、IP<sub>3</sub>R1 陽性腫脹部位にのみ陽性所見が認められ、腫脹部位以外の軸索部分には局在していなかった。すなわち、IP<sub>3</sub>R1 の軸索局所への過剰発現が MAM に存在する他の分子の局在に影響を及ぼすことが示唆された。以上の結果、AGJ 形成が IP<sub>3</sub>R1 のみならず MAM に存在する分子の軸索ない局在にも関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Yamazaki R, Ishibashi T, Baba H, Yamaguchi Y. (2017) Expression of unconventional myosin VI in oligodendrocytes. *Neurochem Res.* 42, 3372-3381.

Yamazaki R, Ishibashi T, Baba H, Yamaguchi Y. (2016) Knockdown of unconventional myosin ID expression induced morphological change in oligodendrocytes. *ASN Neuro*, doi:10.1177/1759091416669609.

[学会発表](計 4 件)

Ishibashi T, Yashima Y, Mikoshiba K, Baba H. (2018) Regulation of the activation of IP<sub>3</sub>R1-mediated signaling through MAMs is necessary to prevent axonal swellings and subsequent cell death in Purkinje neurons in CST<sup>-/-</sup> mice. 第 61 回日本神経化学会 2018 年 9 月 6-8 日 神戸・国際会議場

Ishibashi T, Tsurifune T, Takahashi S, Mikoshiba K, Baba H. (2017) Disruption of paranodal axo-glia junctions causes accumulation of axonal IP<sub>3</sub>R1 in Purkinje cells in CST-deficient mice. 第 60 回日本神経化学会 2017 年 9 月 7-9 日 仙台・仙台国際センター

Ishibashi T. Partial disruption of paranodal axo-glia junctions causes mislocalization of

IP3R1 in Purkinje axons in CST-deficient mice. 13<sup>th</sup> Biennial ISN satellite meeting, Myelin Biology 2017 Glial Neuronal Interactions 25-28<sup>th</sup> August 2017. Island of Embiez on the French Riviera.

Ishibashi T, Takahashi S, Mizuno J, Mikoshiba K, Baba H. (2016) Focal accumulation of type 1 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor triggers Purkinje axonal swellings in paranodal axo-glia junctional deficient mice. 第59回日本神経化学会 2016年9月8-10日 福岡・福岡国際会議場

2018年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。