

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700361

研究課題名（和文）有髄神経軸索内ミトコンドリアの機能制御における髄鞘の役割

研究課題名（英文）The importance of myelin in the regulation of axonal mitochondria

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

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の神経細胞軸索は周囲を髄鞘（ミエリン）に覆われている。髄鞘は軸索を絶縁することにより跳躍伝導を引き起こすが、髄鞘の役割はそれだけではない。髄鞘と軸索が直接接するパラノード部位では、ジャンクションが形成され軸索と髄鞘の膜タンパク質が結合している。髄鞘がこのジャンクションを形成することが、軸索輸送や軸索内カルシウム濃度調節など軸索恒常性維持に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Vertebrate myelinated axons propagate electrical impulse rapidly by salutatory conduction. Paranodal axo-glial junctions play a crucial role in the organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. Cerebroside sulfotransferase (CST) deficient mice show disruption of the paranodal axo-glial junction both in the CNS and the PNS. We reported that axonal mitochondria at the nodes of Ranvier were large and swollen, and that axonal transport related protein levels decreased in the PNS of CST-deficient mice. We also found that the finding of frequent focal axonal swellings in the cerebellar Purkinje neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2200,000	660,000	2860,000
2010 年度	0	0	0
2011 年度	1200,000	360,000	1560,000
総計	3400,000	1020,000	4420,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：髄鞘（ミエリン）、オリゴデンドロサイト、ミトコンドリア、軸索

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎動物の神経軸索は髄鞘（ミエリン）に覆われている。中枢神経系はオリゴデンドロサイトが、末梢神経系はシュワン細胞がそれぞれ軸索周囲にミエリンを形成する。ミエリンが形成されると、活動電位発生に関与する電位依存性 Na チャネルはランビエの絞輪にクラスターを形成し跳躍伝導を引き起こす。ランビエ絞輪の両隣にはパラノードジャンクション(PJ)が形成され、軸索・ミエリン間を結合させる重要な役割を担っている。

(2) PJ の形成は軸索表面のみならず軸索内部の恒常性維持にも重要である可能性がある。ミエリンの主要糖脂質スルファチドが形成されないマウス CST 欠損マウス(KO マウス)は、PJ 形成不全を呈する(図1)。このマウスの座骨神経ランビエ絞輪部に異常に拡大したミトコンドリアが認められることを以前報告している。ミトコンドリア等の膜小器官は軸索内で ATP 依存性モータータ

ンパク質と結合し微小管に沿って輸送される。微小管のプラス端に向かう順行性輸送はキネシンが、逆行性輸送はダイニンが担っている。PJ 崩壊により軸索輸送に何らかの変化を来とし、ランビエ絞輪部にミトコンドリアを集積している可能性が考えられる。

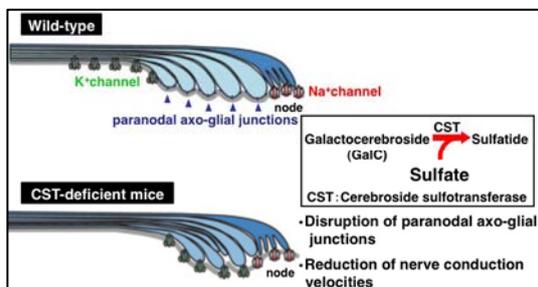


図 1

(3) 一方 CSTKO マウス小脳では異なる変化が認められ、プルキンエ細胞軸索に異常膨らみが高頻度に出現し、内部にリン酸化ニューロフィラメントやアミロイド前駆体タンパク質の蓄積が認められた。この軸索の腫脹はコンパクトミエリンに覆われたインターノード部位に存在していた。

2. 研究の目的

有髄神経軸索内ミトコンドリアを含めた細胞内小器官の分布および機能制御におけるミエリンの役割を調べる。特に PJ 形成の重要性を明らかにすることを目的に研究を行った。また中枢神経系と末梢神経系のランビエ絞輪部の構造の違い、パラノードルジャンクション形成不全における異常所見の違いを比較し、軸索恒常性維持におけるパラノードルジャンクションの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CST 欠損マウス小脳プルキンエ細胞軸索の変化の解析

① PJ 形成異常マウスである CST 欠損マウスの小脳プルキンエ細胞は、軸索に多くの腫脹した部分が認められた。この異常に腫脹した軸索は、ミエリンが形成されない幼弱期には認められないことから、パラノードルジャンクション形成不全による変化であることが考えられた。この軸索腫脹の性状を免疫組織化学的解析、電子顕微鏡解析により詳細に解析した。

② 上記のプルキンエ細胞軸索の腫脹部位にはカルシウム結合タンパク質であるカルビンジン D28K およびカルシウム濃度調節に関与している IP3RI の蓄積が顕著に認められた。このことより軸索内カルシウム濃度調節に何らかの異常がある可能性が考えられる。したがって、小脳スライスを用いて軸索カルシウムイメージングを行った。

(2) PJ 形成異常における軸索ミトコンドリアの性状変化の免疫組織化学的解析

① CST 欠損マウス teased 座骨神経を用い、ミトコンドリア電子伝達系の COXIV、マトリックスに存在する MnSOD、電子伝達系の一端を担う Cytochrome c、および FoF1-ATP 合成酵素である Complex V (COXV)、さらにミトコンドリア外膜に存在し、電位依存性アニオンチャンネルであるポーリンに対する各特異抗体を用い、PJ 形成異常におけるミトコンドリアの変化を調べた。

② PJ 形成異常がミトコンドリアの融合・分裂に影響を及ぼしている可能性が考えられるので、融合因子である GTPase である mitofusin1, 2、および分裂因子である Drp 1 の特異抗体を用い、免疫組織化学的に蛋白局在を調べ、ウェスタンブロッティングにより蛋白量の変化を調べた。

③ PJ 形成異常がミトコンドリア DNA の複製に影響を及ぼしている可能性を、BrdU 取り込みにより調べた。

上記の結果により、PJ 形成異常における軸索内ミトコンドリアの巨大化が、活性化されたポジティブな変化であるのか、あるいは変性の初期過程であるのか証拠を得ることができないのではないかと考えた。

④ミトコンドリアなどの膜内小器官は軸索内の ATP 依存性モータータンパク質と結合し微小管に沿って輸送される。軸索輸送に何らかの変化をきたし、ミトコンドリアの軸索内分布が変化している可能性を考え、モータータンパク質量の変化をウェスタンブロッティングにより調べた。

4. 研究成果

(1) CST 欠損マウス小脳プルキンエ細胞軸索の変化の解析

電子顕微鏡により生後 6 週齢ですでにプルキンエ細胞軸索に細胞内小器官(ミトコンドリアや膜状構造、小胞体)の局所集積が認められた。さらに 40 週齢以上になると、軸索変性が顕著に認められた。この変化はパラノードルジャンクション部分ではなくコンパクトミエリンに覆われているインターノード部位で観察された(図 2)。この変化はミエリンが形成される前は観察されないことにより、コンパクトミエリンが形成されることにより軸索の変化が生じていることが推測された。CST 欠損マウスの週齢が進むにつれこの軸索腫脹の出現頻度は多くなり、大きさは大きくなり、明らかに軸索輸送に障害があることが分かった。

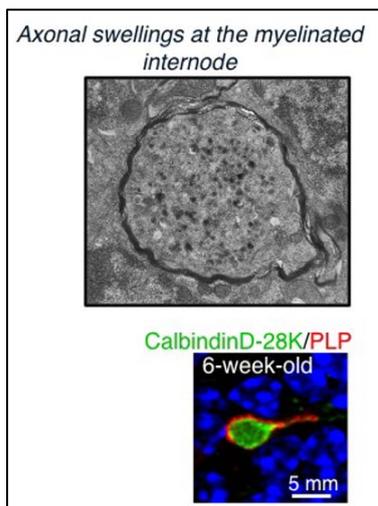


図 2

(2) プルキンエ細胞軸索の腫脹部におけるカルシウム濃度の測定
 軸索腫脹部におけるカルシウム濃度の局所変化が起こっている可能性を考え、免疫組織学的解析により 1 型 IP3R (IP3R1) の局在を調べた結果、正常プルキンエ細胞軸索では IP3R1 は軸索全長にほぼ均一に染色されるのに対して、CST 欠損マウスでは、腫脹部に限局的に IP3R1 の集積が認められた。この結果を踏まえ、小脳スライス培養を用いてプルキンエ細胞軸索のカルシウムイメージングを行った。しかしながらスライス作製時のアーチファクトにより CST 欠損マウスと正常マウスの差が明確ではなくなった。今後スライス培養の有効性を詳細に検討した後、カルシウムイメージングを行う予定である。

(3) PJ 崩壊により軸索輸送になんらかの変化を来し、ランビエ絞輪部にミトコンドリアを集積させている可能性を考え、軸索輸送に関与しているモータータンパク質の変化を調べた。その結果、CST 欠損マウス座骨神経では順行性、逆行性輸送ともにモータータンパク質量が有意に減少していた (図 3)。またミトコンドリア特異的タンパク質である COXIV がランビエ絞輪部に集積していること (図 4)、微小管結合タンパク質タウの軸索内局在に変化が生じていることを明らかにした。

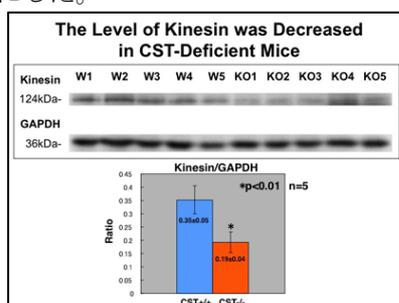


図 3

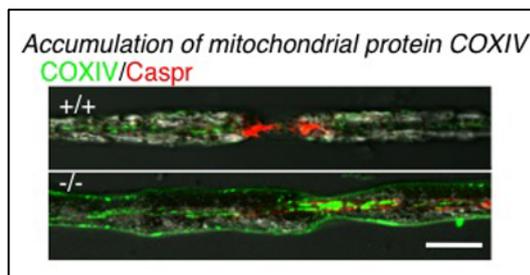


図 4

(4) 通常軸索の細胞骨格を形成するニューロフィラメントはインターノード部位 (ミエリンに覆われた部分) でリン酸化されており、ランビエ絞輪部ではリン酸化されていない。しかしながら、CST 欠損マウスの座骨神経ランビエ絞輪部では明らかに、ニューロフィラメントのリン酸化が亢進していた。また、微小管結合タンパク質タウのリン酸化も認められた。このことより、パラノーダルジャンクションの形成が軸索タンパク質のリン酸化に関与していることが示唆された。

未解決な部分が多く残されたが、有髄軸索のパラノーダルジャンクション形成が軸索輸送に必須であることを示唆する結果が得られた。またパラノーダルジャンクション形成不全に於ける、異常部位が中枢神経系と末梢神経系で異なることが分かった。今後は *in vitro* ミエリン培養系を用いさらに研究を行って行く予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Kajigaya H, Tanaka KF, Hayashi A, Suzuki A, Ishibashi T, Ikenaka K, Baba H. (2011) Increased numbers of oligodendrocyte lineage cells in the optic nerves of cerebroside sulfotransferase knockout mice. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87 (7): 415-424 <http://dx.doi.org/10.2183/pjab.87.415>

Ishibashi T, Lee PR, Baba H, Fields RD. (2009) Leukemia inhibitory factor regulates the timing of oligodendrocyte development and myelination in the postnatal optic nerve. *Journal of Neuroscience research* 58:752-764. DOI: 10.1002/jnr.22173

[学会発表] (計 3 件)

石橋智子, 馬場広子 パラノーダルジャンクション形成不全時における小脳プルキンエ細胞の変化 第 54 回日本神経科化学会 2011 年 9 月 27 日石川県・山代温泉・瑠璃光

Ishibashi T, Baba H Disruption of axo-glia interaction causes focal axonal damages in cerebellar Purkinje neurons. 10th Biennial ISN Satellite Meeting on Myelin Biology 2011年8月24-27日 Kolymvari, Creta, Greece

児玉明子, 石橋智子, 馬場広子 末梢神経系パラノーダル・ジャンクション形成異常における軸索の変化 第52回日本神経化学会 2009年6月21日～24日 伊香保温泉ホテル天坊 (群馬)

[その他]

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/kino-keitai/youkoso.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：