

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700424

研究課題名（和文） 軸索の形態維持における milton 遺伝子の分子多様性について

研究課題名（英文） The role of molecular diversity of milton gene for the maintenance of neuronal axon

研究代表者

米倉 真一（YONEKURA SHINICHI）

信州大学・農学部・助教

研究者番号：40443113

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの順行輸送に關与する milton 遺伝子の異なる alternative splicing axon の変異により、軸索変性、軸索の異常伸長と全く異なる表現型を示す。本研究から両変異体における軸索形態の異常は、単一のアイソフォームの異常によるものでなく、複数のアイソフォームが相互に關与しているものであることが示唆された。また、両変異体においてミトコンドリアの軸索輸送に異常が確認されたが、ミトコンドリアの輸送異常だけでは軸索の形態に異常が認められなかったことから、他の分子の軸索輸送異常により軸索の形態が破綻することが示唆された。今後、輸送障害が生じている分子を同定することによって、軸索変性の分子機序解明に貢献できるものとする。

研究成果の概要（英文）：Point mutation of different alternative splicing axon of milton gene, required for the anterograde transport of mitochondria, indicated the different phenotype such as axon degeneration or abnormal neurite outgrowth. Expressing single milton isoforms was sufficient to rescue the mutant phenotype. This result indicated that multiple isoforms were anticipated in the maintenance of neuronal axon. Although both mutant neurons failed to target mitochondria to their terminals, abnormal mitochondria transport was not sufficient to cause axon degeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学/神経薬理学

キーワード：神経科学、軸索、スプライシング

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は非常に長い神経突起である軸索をもつ特殊化した形態の細胞である。軸索は神経細胞間の刺激伝達経路であり、その形成、維持は神経機能や神経細胞の生存に必須である。従って、発生や成長過程において一度、神経回路が形成されると、その後、軸索の形態は維持されたままである。一方、神経変性疾患の症状の多くの発生には軸索変性が寄与している。すなわち、神経変性疾患の発症機構の一つには、軸索の形態維持機構の崩壊があると考えられるが、軸索の形態がどのような分子メカニズムで維持されているのかは依然不明な点が多い。

申請者は軸索変性の機序解明に際し「軸索の形態維持機構とは何か？」また「どのような細胞内の異常が生じると軸索の形態は破綻するのか？」という視点から研究を行っている。これまで遺伝学的な研究が豊富であり、哺乳類の神経細胞死の特徴も兼ね備えているショウジョウバエを用いたゲノムワイドスクリーニングにより軸索形態維持に関与する遺伝子の同定を行った。具体的には、ショウジョウバエを ethylmethane sulphonate (EMS) 処理することにより機能欠失変異体を作製し、軸索変性の様子を容易に観察できる photoreceptor の軸索を指標としスクリーニングを行った。その結果、発生期には軸索の形態に異常が認められないものの、生後に加齢と共に軸索が変性する 379A 株と、生後に加齢と共に軸索が異常伸長する 69A 株を得ることに成功している。両変異体の原因遺伝子の同定を行ったところ、非常に驚いたことに milton という同一遺伝子であり、両変異体の変異部位は、milton 遺伝子のそれぞれ異なる alternative splicing axon に存在していた。これらの結果より、軸索の形態維持機

構において、異なる milton 分子のアイソフォームが異なる機能を有している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

milton 遺伝子の変異部位により、軸索形態に異なるフェノタイプを有することが明らかとなり、milton の各アイソフォームは異なる機能を有している可能性が示唆された。よって、本研究では、軸索の形態維持と milton 遺伝子の分子多様性の関係性を明らかにすることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) milton 遺伝子の各アイソフォーム cDNA 全長のクローニング

少なくとも milton には 4 種のアイソフォームが存在することが明らかとなっている。4 種に共通である exon10 の部分 cDNA を RT-PCR 法により得た後、RACE 法を用いて各アイソフォーム全長のクローニングを行った。

(2) milton 遺伝子の単一アイソフォームを導入したトランスジェニックハエの作製とレスキュー実験

クローニングした milton 遺伝子の各アイソフォームの cDNA 全長をショウジョウバエの P ベクターに挿入し、得られた P ベクターを、embryo に injection することでトランスジェニックハエを作製した。作製後、各アイソフォームのトランスジェニックハエと 379A 株、69A 株をそれぞれクロスさせ、産まれてくる F1 の光受容細胞の軸索を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

(3) milton 遺伝子の単一アイソフォームのみ決失した際における軸索の形態観察

milton 遺伝子の各アイソフォームに特異的な RNAi の設計、作製を行った後、ショウジョウバエの P ベクターに挿入する。P ベク

ターを、embryo に injection することで各アイソフォームの RNAi トランスジェニックハエを作製した。その後、光受容細胞に特異的なプロモーターである GMR・Gal4 のハエと、作製した各アイソフォームに特異的な RNAi トランスジェニックハエを、それぞれクロスさせ、産まれてくる F1 の光受容細胞の軸索を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

(4) 379A株と69A株の神経細胞におけるミトコンドリアの局在について

MARCM 法を用いて光受容細胞でのみ変異する株（以後、MARCM による変異株と呼ぶ）を作製した。MARCM 法とは GAL4-UAS システムと体細胞組換えを利用したモザイク解析法であり、これにより一部の細胞集団だけで目的遺伝子を欠失させることができる。MARCM 法の体細胞組み換えを誘導するドライバーには、光受容細胞でのみ、分化前の段階で発現する ey3.5 を用いた。よって本実験の MARCM による変異株は、光受容細胞が分化する前の段階から機能欠失変異しているものである。MARCM による 379A 株、69A 株をそれぞれ作製した後、光受容細胞の細胞体におけるミトコンドリアの局在を電子顕微鏡を用いて観察し、また軸索における局在は、mito-GFP を用いて、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

(5) miro 変異体の軸索の形態観察

MARCM による miro 変異株を作製後、軸索の形態と、mito-GFP を用いた軸索におけるミトコンドリアの局在を、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

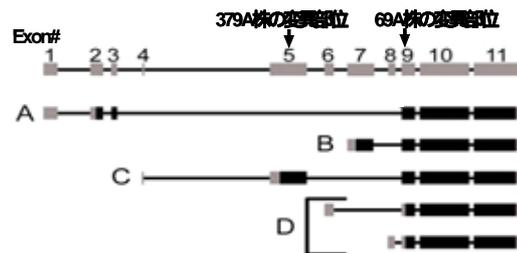
4. 研究成果

(1) milton 遺伝子の各アイソフォーム cDNA 全長のクローニング

milton には alternative splicing により少なくとも 4 種のアイソフォームが存在することが明らかとなっている。Milton 遺伝子のゲノム構造と 379A 株、69A 株の変異部位を

図 1 に示した。

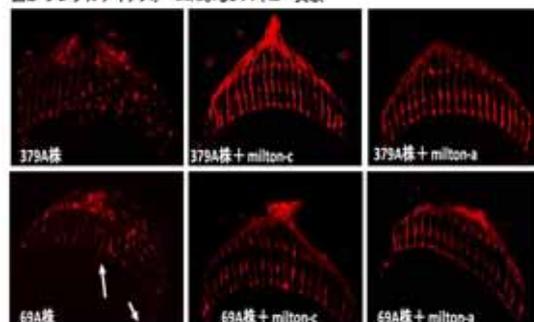
図1 milton 遺伝子のゲノム構造と変異部位



全アイソフォームの cDNA 全長のクローニングを試みた結果、milton-a、milton-b、milton-c の cDNA 全長のクローニングに成功したが、milton-d の全長を得ることが出来なかった。しかしながら、379A 株は milton-c が機能欠失であることが予想され、本研究の遂行に大きな障害にならないと考え、得られた各アイソフォームの cDNA 全長を用いて、引き続きレスキュー実験を行った。

(2) milton 遺伝子の単一アイソフォームを導入したトランスジェニックハエの作製とレスキュー実験

図2 シングルアイソフォームによるレスキュー実験



シングルアイソフォームによるレスキュー実験の結果を図 2 に示した。結果は、21 日目ハエ視神経の medulla 領域の軸索の様子を表している。379A 株の軸索変性のフェノタイプは、milton-a、milton-c の各単一アイソフォームにより完全にレスキューされることが明らかとなった。また 69A 株の軸索異常伸長のフェノタイプも milton-a、milton-c の各単一アイソフォームにより完全にレス

キューされた。引き続き、RNAi を用いた単一アイソフォームを欠失した際の、軸索の形態の検討を行った。

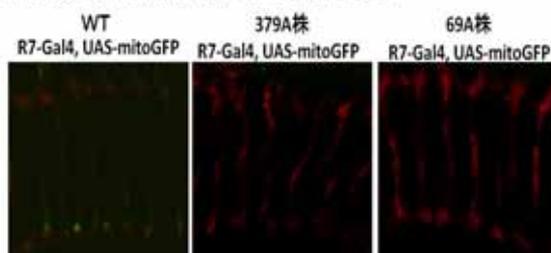
(3) milton 遺伝子の単一アイソフォームのみ欠失した際における軸索の形態観察

milton-a, milton-c にそれぞれ特異的 RNAi トランスジェニックハエを作製後、光受容細胞に特異的なプロモーターである GMR・Gal4 のハエとクロスさせ、産まれてくる F1 の光受容細胞の軸索を観察することで、アイソフォームの機能性の差異について検討したが、シングルアイソフォームの欠失のみでは、軸索の形態に異常が生じないことが明らかとなった。

(4) 379A株と69A株の神経細胞におけるミトコンドリアの局在について

両変異体の光受容細胞の細胞体におけるミトコンドリアの局在を電子顕微鏡で観察したが大きな異常は認められなかった。しかし、mito-GFP を用いて軸索における局在を検討した結果、379A 株と 69A 株の両変異体において、ミトコンドリアの軸索輸送に異常が確認された (図3)。

図3 両変異体の軸索におけるミトコンドリアの局在

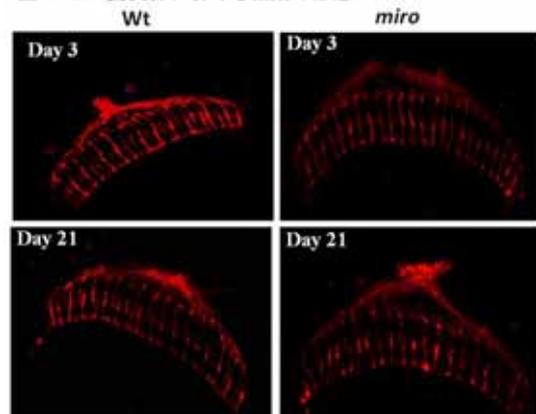


(5) miro 変異体の軸索の形態観察

これまでの結果より、軸索形態維持における単一アイソフォームの機能を見出すことが出来なかった。milton はミトコンドリアの順行輸送に必須な分子であることが明らかとなっているが、そもそも両変異体における軸索の異常がミトコンドリアの輸送異常によるものであるのか明らかにするため、同じ

くミトコンドリアの輸送に必須であり、ミトコンドリア膜上に存在する分子である miro の変異体における軸索の形態を観察した。miro 変異体においてもミトコンドリアの軸索輸送に異常が確認された。しかしながら、生後 21 日経っても、軸索の形態に全く異常が生じないことが明らかとなり (図4) 379A 株と 69A 株の軸索異常はミトコンドリアの輸送異常によるものでないことが示唆された。

図4 miro変異体における軸索の形態



考察および今後の展望

milton 遺伝子の異なる alternative splicing axon の変異により、軸索変性、軸索の異常伸長と全く異なる表現型を示したことから、軸索の形態維持と milton 遺伝子の分子多様性の関係性に焦点を当て検討を進めてきた。しかしながら、両変異体のフェノタイプは、単一アイソフォームにより完全にレスキューされ、また RNAi を用いて単一アイソフォームを欠失しても軸索の形態に異常が生じないことが明らかとなった。本実験では 4 種のアイソフォームのうち milton-d の cDNA 全長を得ることが出来なかったことから milton-d が軸索形態において何らかの重要な役割を担っている可能性が考えられる。また、複数のアイソフォームの相互作用によって軸索の形態維持に関与していることも考えられ、現在、複数種のアイソフォームを欠失する実験の準備を行って

いるところである。更に、単一アイソフォーム発現のオン・オフによって軸索の形態を維持しているというより、各アイソフォームの発現量のバランスによって維持している可能性も考えられる。本実験の単一アイソフォームのレスキュー実験では、光受容細胞に特異的なプロモーターである GMR・Gal4 を用いて強ちに過剰発現させたものであり、RNAi 実験では単一アイソフォームのみ欠失した実験であることを考えると、アイソフォームの発現量バランスを極端にしたものであると言える。微妙な各アイソフォームの発現量のバランスによって軸索の形態を維持している可能性を考えると、今後、内因性の *milton* 遺伝子のプロモーターを用いたレスキュー実験を行うことを考えている。

一方、両変異体においてミトコンドリアの軸索輸送に異常が確認されたが、同じくミトコンドリアの軸索輸送異常が認められる *miro* 変異体において、軸索の形態に全く異常が生じなかったことから、ミトコンドリアの輸送異常だけでは軸索の形態に異常が生じないことが示唆された。近年の研究より、*milton* はミトコンドリアのみならず他のタンパク質の輸送にも関与するアダプター分子であることが明らかとなってきた。すなわち、他の分子の軸索輸送異常により軸索の形態が破綻することが予想される。*milton* は、GABA_A 受容体サブユニットや、endosomal sorting に関与する Hrs の輸送を行っていることが明らかとなっているが、いずれの研究も GABA_A 受容体、Hrs をホストとして結合タンパク質を模索した結果明らかになったものである。これまで、*milton* 分子をホストとして結合タンパク質を模索した報告は無く、どういった分子の輸送に関わっているのか等、その全貌は明らかでない。今後、*milton* が輸

送に関与している分子を同定し、どういった分子の輸送異常によって軸索の形態が破綻するのか明らかにするべく検討も必要である。今後の更なる検討により、神経回路形成後、軸索が維持される仕組みの理解を深め、また神経変性疾患の病態メカニズムの解明を飛躍的に進展させるものであると考える。

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1件)

Hsu SN, Yonekura S, Ting CH, Robertson H, Iwai Y, Uemura T, Lee CH, Chiba A. Conserved Alternative Splicing and Expression Patterns of Arthropod N-Cadherin.

PLoS Genetics, 5(4):e100441-55 2009, 査読有

[学会発表](計3件)

米倉真一、軸索変性の分子メカニズムの解明を目指して。 第三回分子高次機能研究会 2010年11月23日 長野県筑北村

米倉真一、長竿淳、高英淑、Failure in axon transport cause axon degeneration in *Drosophila*. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 横浜市

米倉真一、長竿淳、高英淑、軸索の変性関連遺伝子のゲノムワイドスクリーニング。 第50回日本神経病理学会総会学術研究会 2009年6月5日 香川県高松市

6. 研究組織

(1)研究代表者

米倉 真一 (YONEKURA SHINICHI)

信州大学・農学部・助教

研究者番号：40443113