

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500314

研究課題名（和文）

損傷神経軸索におけるミトコンドリアのダイナミクス

研究課題名（英文）

Mitochondrial dynamics in injured axons

研究代表者

桐生 寿美子（瀬尾寿美子）(KIRYU-SEO SUMIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70311529

研究成果の概要（和文）：

本研究ではエネルギー供給源であるミトコンドリアに焦点を当て、損傷軸索でのミトコンドリアダイナミクスを明らかにすることを目指した。このため神経損傷にตอบสนองして神経細胞内ミトコンドリアを蛍光標識する BAC トランスジェニックマウスを作製し、損傷軸索でのミトコンドリアの形態やターンオーバーを検討した。その結果、神経損傷後ミトコンドリアは細胞体で断片化し積極的に軸索末端へ輸送されることが明らかになった。これは神経再生・修復を促すための適応反応であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

This study focused on mitochondria and attempted to elucidate mitochondrial dynamics in injured axons. For this purpose, we generated BAC transgenic mice to label mitochondria specifically in injured neurons. The mice showed that mitochondria in the cell body were fragmented in response to nerve injury and transported to axonal terminal, suggesting that the change is an adaptive response for nerve regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経損傷、神経再生、神経変性、ATF3、ミトコンドリア、軸索輸送、BAC トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

神経細胞内でミトコンドリアはエネルギー供給、カルシウム濃度調節、活性酸素生成などを行い積極的に細胞内ホメオスタシスを維持している。このため、様々な神経変性疾患でミトコンドリアの異常が数多く報告されている。ミトコンドリアが正常に機能するためには細胞内でそのダイナミクスが

適切に制御されている必要がある。特に神経細胞特有の形態である軸索ではミトコンドリアは軸索輸送によって細胞体から供給され再び細胞体へ回収されるため、そのダイナミクスの異常は直ちに軸索変性を引き起こすと考えられている。近年、軸索ミトコンドリアのダイナミクスやその制御機構

に関する研究は徐々に増えてきているが、その多くは培養細胞を用いた系で行われている。しかし *in vivo* でのミトコンドリアダイナミクスの研究は神経細胞の変性・脱落のメカニズム解明を促す高いポテンシャルを有すると考えられる。そこで、*in vivo* 損傷軸索で効果的にミトコンドリアの動態変化を可視化できるようなマウスを作製する本申請課題を計画した。損傷神経特異性を有するトランスジェニックマウスは長く待望されているものの現在のところ存在しない。本申請課題のマウスはミトコンドリア研究にとどまらず、今後広範囲にわたる脳損傷研究に応用可能なマウスとして極めて強力なツールとなることが期待される。

2. 研究の目的

損傷軸索におけるミトコンドリア動態の研究を展開するためには、*in vivo* で有用な研究ツールや、状態別にミトコンドリアを区別しそれを特異的に標識できるようなシステムの開発が重要となってくる。こうした課題をクリアする最初の第一歩として、神経損傷を加えた時にのみ神経細胞内ミトコンドリアを蛍光標識し同時に組換え酵素 Cre リコンビナーゼを発現するようなマウスの作製を試みた。このため、通常状態ではほとんど発現が認められず損傷神経細胞特異的に発現誘導される転写因子 ATF3 のプロモーターを利用することにした。さらに、ATF3 の発現制御を忠実に模倣し損傷神経細胞特異的に外来性遺伝子を発現できるよう、ATF3 遺伝子全領域を含む大腸菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) クローンを用いてトランスジェニックマウス作製を行った。本申請課題は、このようなマウスを作製し神経損傷後の軸索ミトコンドリアの動態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BAC トランスジェニックマウス作製
ATF3 遺伝子領域を含む約 200kb の BAC クローンを用いてトランスジェニックマウス作製用コンストラクトを構築した。ミトコンドリアターゲティングシグナルを付加した GFP と Cre リコンビナーゼを *ires* で連結させた外来

性遺伝子を ATF3 遺伝子の ATG を含むエクソン部分に挿入した。作製した BAC コンストラクトを精製後、受精卵に注入し BAC トランジェニックマウスを作製した。得られた産仔の尾組織から DNA を抽出し PCR にてジェノタイプを確認した。得られたトランスジェニックマウスの Cre リコンビナーゼ活性を確認するために、Ai9; Rosa-LSL-TdTomato レポーターマウスとの交配を行った。

(2) 神経損傷モデル作製

得られたマウスの表現系を確認するために舌下神経、坐骨神経などの末梢神経損傷や脊髄損傷、大脳皮質挫滅モデルなどの中枢神経損傷モデルを作製した。

(3) 表現系の解析

各種神経損傷モデル作製数日後に灌流固定および凍結し組織を取り出し切片作製後、免疫組織化学を行った。また各種臓器より蛋白を抽出しウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) BAC トランスジェニックマウスの作製
損傷神経細胞特異性を保つために ATF3 遺伝子を含む BAC クローンを用いたトランスジェニックマウスの作製を行った (図 1)。BAC クローンに挿入する外来性遺伝子断片については、遺伝子導入した培養細胞でミトコンドリアの蛍光標識および Cre リコンビナーゼ活性を確認することができた。構築した BAC コンストラクトを精製し受精卵への注入を行ったが、トランスジーンを有する個体をなかなか得ることができず、複数回にわたりこの過程を繰り返しようやく 1 ラインを得ることができた。このためこの過程に予想外の時間を費やすこととなった。

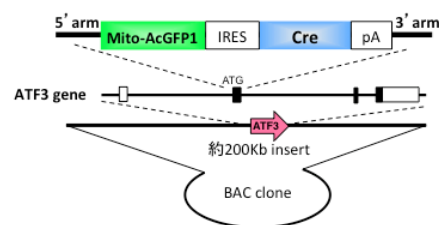


図 1. BAC コンストラクトの模式図

(2) 損傷神経細胞特異性の確認

① 神経損傷モデル

作製したトランスジェニックマウスを用い

て舌下神経損傷、坐骨神経損傷など末梢神経損傷に加え、脊髄損傷、大脳皮質損傷を含む中枢神経損傷モデルを作製し免疫組織化学を行った。その結果、通常状態の脳内にはほとんど GFP 陽性反応は観察されず、ATF3 陽性の損傷神経細胞および軸索に極めて特異的に発現することが明らかになった(図2)。また GFP はチトクローム c と共局在することから、効率よくミトコンドリアが蛍光標識されることも確認された。従って本研究により ATF3 プロモーターの損傷応答性を保持した BAC トランスジェニックマウスを得ることができた。

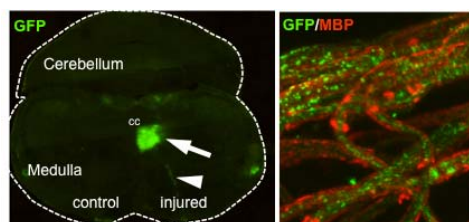


図2. 末梢神経損傷後、損傷神経細胞および軸索特異的にミトコンドリアを標識するトランスジェニックマウス

左：舌下神経損傷後、右側損傷側の運動ニューロン(矢印)と軸索(矢頭)特異的に GFP 陽性シグナルが観察される。

右：損傷軸索で GFP 標識されたミトコンドリア

②組織特異性の検討

トランスジェニックマウスの各臓器よりタンパクを抽出し western blotting を行ったところ、いずれの臓器においても明らかな GFP 陽性シグナルは検出されなかった(図3)。これまで我々のグループでは損傷神経細胞特異的トランスジェニックの作製を幾度となく試みてきたがなかなか期待通りのマウスを得ることができなかった。しかし今回 200kb 近い遺伝子領域を含む BAC システムを用いることで、組織特異性が保持されこれまではない高い損傷神経細胞特異性を有するマウスを得ることができた。

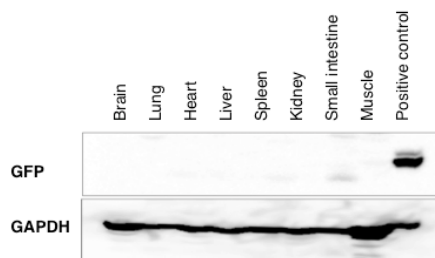


図3. BAC Tg マウスの各組織における GFP 発現

③Cre リコンビナーゼ活性の検討

本研究で作製したマウスは損傷を受けるとミトコンドリアを蛍光標識すると同時に Cre リコンビナーゼを発現する。今後各種 flox マウスとの交配を進める上で Cre リコンビナーゼの活性を確認する必要があるため、Rosa-LSL-TdTomato レポーターマウスと本トランスジェニックマウスを交配した。その結果、ミトコンドリア蛍光標識の場合と同様に損傷神経細胞が特異的に赤色蛍光標識されることが明らかになった。ところが、こうした神経系での特異的発現に加えて血管や皮膚にも強い陽性シグナルが観察された。これはミトコンドリアの蛍光標識ではほとんど検出されなかったシグナルである。この理由の一つとして、発生過程で一過性に少量発現した Cre リコンビナーゼが loxP 配列で挟まれた領域を欠損させ以降もその状態が続いたためではないかと考えられる。従って恒常的かつ全身性に発現する分子あるいは血管や皮膚に恒常的に強く発現する分子の flox マウスとの交配では、目的マウスが発生過程のいずれかの段階で致死となる可能性も考えられる。こうした可能性を回避するため、複数ラインの BAC Tg を得て解析を進めることが今後必要と考えられる。

(3) 損傷神経軸索におけるミトコンドリア動態

損傷軸索でのミトコンドリアダイナミクスを明らかにするために、坐骨神経損傷モデルを用いて軸索内ミトコンドリアをチトクローム c により免疫染色し、その長軸の長さを測定した。健常軸索では 2 μm 前後の長さのミトコンドリアの割合が高かったが、損傷後 18 時間よりミトコンドリア長軸が次第に短くなり再生軸索が形成される数週間後には元の長さに戻ることが明らかになった。このことから、ミトコンドリア断片化は損傷刺激に対する適応反応と考えられた。

次に、ミトコンドリアの断片化が軸索内で起こるのか、あるいは損傷前より軸索に存在していたミトコンドリアが回収され損傷後断片化したミトコンドリアが細胞体から輸送供給されるのか明らかにするため、作製した BAC Tg マウスを用いて同様に坐骨神経損傷実験を行った。損傷軸索内の GFP 陽性ミトコンドリア長軸の長さを測定したところ、チトクローム c 陽性ミトコンドリアより

も早い時期に2 μm 以下の小さいミトコンドリアが高い割合で存在することが明らかになった。損傷後数週間すると GFP 陽性ミトコンドリアは健常側軸索ミトコンドリアに近い長さに戻ることが明らかになった。

これまで培養細胞を用いたモデルでは、ミトコンドリア断片化は細胞死を引き起こすとも細胞死を防御するとも両方向からの報告がありその機能的意義は定まらなかった。しかし、本研究により神経損傷後ミトコンドリアが積極的に細胞体で断片化され軸索輸送されることが明らかになった。これは、損傷前から軸索に局在するミトコンドリアのターンオーバーや軸索末端へのエネルギー供給のスピードを加速させ神経再生・修復を促すための適応反応であることが示唆された。

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7件) 全て査読有

- ① Matsumoto S, Konishi H, Maeda R, Kiryu-Seo S, Kiyama H. Expression analysis of the regenerating gene (Reg) family members Reg-III β and Reg-III γ in the mouse during development. *J Comp Neurol*, 520, 479-494, 2012.
doi: 10.1002/cne.22705.
- ② Kiryu-Seo S, Kiyama H. The nuclear events guiding successful nerve regeneration. *Front Mol Neurosci*, 4, 53, 2011.
doi: 10.3389/fnmol.2011.00053.
- ③ Luo X, Prior M, He W, Hu X, Tang X, Sheng W, Yadav S, Kiryu-Seo S, Miller R, Trapp B, Yan R. Cleavage of neuregulin-1 by BACE1 or ADAM10 produces differential effects on myelination. *J Biol Chem*, 286, 23967-23964, 2011.
doi: 10.1074/jbc.M111.251538.
- ④ Ohno N, Kidd G, Mahad D, Kiryu-Seo S, Avishai A, Komuro H, Trapp BD, Myelination and axonal electrical activity modulate the distribution and motility of mitochondria at CNS nodes of Ranvier. *J Neurosci*, 31, 7249-7528, 2011.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0095-11.

- ⑤ Nagata K, Kiryu-Seo S, Maeda M, Yoshida K, Morita T, Kiyama H. Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuro-muscular junctions. *J Neurosci*, 30, 6954-6962, 2010.
doi: 10.1523/JNEUROSCI.4521-09.2010.
 - ⑥ Kiryu-Seo S, Ohno N, Kidd GJ, Komuro H, Trapp BD. Demyelination increases axonal stationary mitochondrial size and the speed of axonal mitochondrial transport. *J Neurosci*, 30, 6658-6666, 2010.
doi: 10.1523/JNEUROSCI.5265-09.
 - ⑦ Jeong YH, Ishikawa K, Someya Y, Hosoda A, Yoshimi T, Yokoyama C, Kiryu-Seo S, Kang MJ, Tchibana T, Kiyama H, Fukumura T, Kim DH, Saeki S. Molecular characterization and expression of the low-density lipoprotein receptor-related protein-10, a new member of the LDLR gene family. *Biochem Biophys Res Commun*, 391,110-115, 2010.
doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.033.
- [学会発表] (計5件)
- ① 桐生寿美子、木山博資、「損傷神経細胞の再生能力に関わる分子メカニズム」(シンポジウム)、第118回日本解剖学会全国学術集会(かがわ国際会議場、香川)、2013.3.30
 - ② 桐生寿美子、松本早紀子、木山博資、「DINE欠損は軸索-シュワン細胞相互作用に影響を及ぼし軸索ブランチング形成異常を引き起こす(DINE deficiency affects axon-Schwann cell interactions, leading to failure of nerve terminal arborization)」第35回日本神経科学学会(名古屋国際会議場、名古屋)、2012.9.19
 - ③ 桐生寿美子、大野伸彦、Grahame J. Kidd、小室仁、Bruce D. Trapp、「脱髄軸索におけるミトコンドリアダイナミクスの変化」、第71回日本解剖学会中部支部学術集会(名古屋大学、名古屋)、2011.10.15
 - ④ 桐生-瀬尾寿美子、大野伸彦、Grahame J. Kidd、小室仁、Bruce D. Trapp、

「Demyelination alters axonal stationary mitochondrial size and the speed of axonal mitochondrial transport 脱髄による軸索内ミトコンドリアのサイズと輸送速度の変化」、Neuro2010 (神戸コンベンションセンター、神戸)、2010.9.4

- ⑤ 桐生・瀬尾寿美子、大野伸彦、Grahame J. Kidd、小室仁、Bruce D. Trapp、「脱髄軸索におけるミトコンドリアの動態変化」、第25回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 (大阪市立大学、大阪)、2010.5.22

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Anatomy2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桐生寿美子 (瀬尾寿美子)

(KIRYU-SEO SUMIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70311529

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし