

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650184

研究課題名（和文）軸索変性において変化する細胞内シグナル経路の解明

研究課題名（英文）Deciphering changes in intracellular signals during axon degeneration

研究代表者

藤原 武志 (FUJIWARA TAKESHI)

大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・特任准教授（常勤）

研究者番号：50546786

研究成果の概要（和文）：神経軸索が脆弱化するとき軸索で変化するシグナル経路の変化に焦点をあてて本研究を実施し、成果として軸索内のシグナル経路の変化をつかさどるダイニン・ダイナクチン複合体の重要構成タンパク質である p150Glued とダイニン中間鎖 (DIC)、微小管の安定化、そしてがん抑制遺伝子産物 p53 の機能阻害がアルツハイマー病などの神経疾患にみられる軸索の脆弱化を制御することを世界に先駆けて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, our specific aim is to decipher mechanisms and factors that regulate the process of axon degeneration, a hallmark phenotype observed in various neurological disorders including Alzheimer's disease. We developed a glutamate excitotoxicity-induced axon degeneration system in primary neuronal cultures and found that p150Glued and dynein intermediate chain (DIC), both of which are major components of the retrograde transport dynein-dynactin complex, microtubule stabilization, and inhibition of p53 transactivation regulate the process of axon degeneration including axon degeneration. As glutamate excitotoxicity is implicated in various neurological deficits, our findings identify retrograde transport proteins, microtubule dynamics, and tumor suppressor protein p53 as novel intracellular signaling modulators of axon degeneration observed in neurological disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

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：分子神経病理学、軸索変性

1. 研究開始当初の背景

神経軸索は神経伝達物質の放出などを可能とする神経活動の基本構造体である。軸索は微小管やアクチン線維といった細胞骨格により形成制御されており、発生過程において神経ネットワークを構築する際に制御さ

れた進行方向性をもって伸長・枝分かれする。この時、軸索は様々な細胞外栄養因子に応答し細胞内の生存シグナル経路を活性化することで伸長・枝分かれする一方で、ネットワーク形成に不必要な軸索はストレスシグナ

ル経路を活性化して除去されることが明らかにされつつある。アルツハイマー病などの神経変性疾患において軸索の脆弱化（変性）は、神経症状が出る以前の初期に認められる重要な現象である。これまで軸索変性に関わる細胞内タンパク質やシグナル経路は明らかにされてきている。しかし、まだ断片的な理解にとどまり、軸索変性現象を形成する多様なシグナル経路のバランスの変化や破綻などの全体像はいまだ不明である。すでに私どもが過剰なグルタミン酸（グルタミン酸毒性）により誘発される軸索変性過程に軸索逆行性物質輸送経路が関与し得る未発表結果を得ていることから、軸索内の生存およびストレスシグナル経路のバランス変化を軸索逆行性物質輸送タンパク質が担うと仮定して詳細な解析をすることで、軸索変性における細胞内シグナル変化を分子レベルで解明することが可能となる。

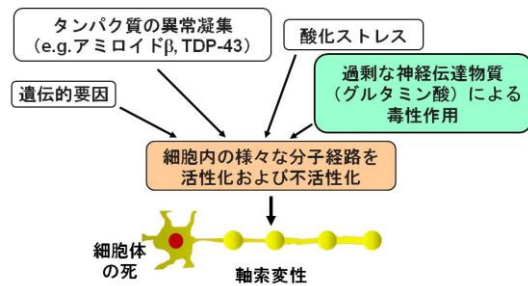
2. 研究の目的

本研究の目的は、グルタミン酸毒性により変性した神経軸索で変化する生存シグナル経路およびストレスシグナル経路のバランス変化を制御するタンパク質を同定することである。それらを突破口にして軸索の正常状態に比べて生存シグナルとストレスシグナルのバランスがどのように変化することで軸索や神経細胞が脆弱化するのかという未解決問題を解明する。軸索の伸長活性や伸長方向性を制御する軸索の生存シグナルあるいはストレスシグナル経路それぞれの解明は進んでいる一方で、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患でみられる軸索変性過程において、それらシグナル経路の活性化あるいは不活性化の状態が何により制御されるのかについてはほとんど不明である。本研究では、生存およびス

トレスシグナル経路のバランス変化を制御し得る軸索輸送タンパク質、特に軸索の逆行性物質輸送に関わるタンパク質に着目して軸索変性における細胞内シグナル変化の制御機構を解明する。

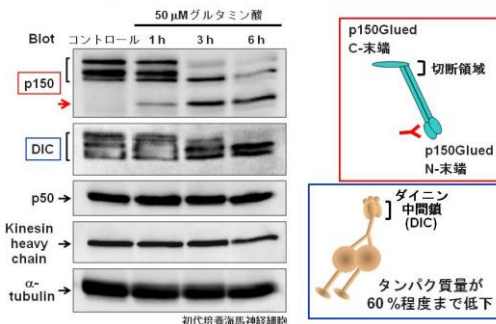
3. 研究の方法

図1 神経細胞の変性を誘発する要因



(1) グルタミン酸は神経活動に必須の神経伝達物質であるとともにアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などに深く関わる神経細胞変性の誘発因子でもある (図1)。私どもはラットおよびマウス海馬神経の初代培養細胞をグルタミン酸で処理し、軸索が神経変性疾患でみられる球体様の構造を示して変性する *in vitro* 実験系を確立し、この系を中心に用いて分子レベルでの解析を行った。私どもはグルタミン酸毒性による軸索変性を軸索逆行性物質輸送経路が制御し得る未発表結果を得ていたことから、最初に生

図2 グルタミン酸毒性によるp150GluedのC末端領域の切断とDIC発現量の低下



学的な解析を詳細に行った。その結果、軸索逆行性物質輸送ダイニン・ダイナクチン複合

体の重要構成タンパク質 p150Glued と DIC の生化学的性状に顕著な変化を認めた (図 2)。p150Glued はグルタミン酸毒性により正常の分子量 150K より小さい約 110K の C 末端領域切断体が生成された。一方で、DIC はグルタミン酸毒性により正常の約 60%程度にまで発現量が低下した。p150Glued と DIC の軸索変性過程への効果を検討する目的で、p150Glued と DIC の cDNA をクローニングし、GFP と融合させた組み換え DNA を神経細胞に導入して強制発現させ、分子細胞生物学的解析を行った。その結果、野生型 p150Glued、野生型 DIC、そしてダイニンとダイナクチン複合体の相互作用を著しく低下させる変異型 DIC (S84D) の強制発現がグルタミン酸毒性による軸索変性を顕著に抑制することを明らかにした。この時、ストレスシグナル経路のアポトーシスも抑制されることを明らかにした。一方で、p150Glued の C 末端領域切断体の強制発現は軸索変性およびアポトーシスを顕著に促進することを明らかにした。さらに、p150Glued の C 末端領域切断体をアルツハイマー病患者の神経変性が認められる脳組織において同定した。

(2) 軸索逆行性物質輸送ダイニン・ダイナクチン複合体は微小管に依存して物質を輸送することから、「レール」の役目をする微小管の安定性が軸索逆行性物質輸送タンパク質と相乗的に軸索変性過程に関わると考

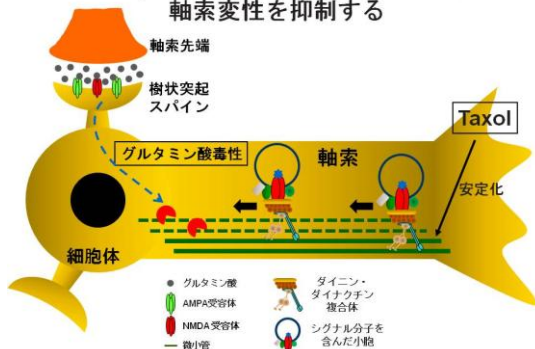
えられた。私どもは野生型 p150Glued を強制発現させた神経細胞を微小管安定化剤である taxol で処理した結果、野生型 p150Glued 強制発現単独あるいは taxol 処理単独の効果に比べて顕著に軸索変性を抑制することを分子細胞生物学的に明らかにした (図 3)。

(3) 軸索逆行性物質輸送ダイニン・ダイナクチン複合体が輸送するタンパク質が生存およびストレスシグナル経路のバランス変化を制御し得ることから、重要構成タンパク質であるとともに輸送物質と相互作用する p150Glued および DIC に結合するタンパク質を免疫沈降法により生化学的に探索した結果、p150Glued と結合するタンパク質としてベータアミロイド前駆タンパク質 APP を、DIC と結合するタンパク質としてがん抑制遺伝子産物 p53 を同定した。APP は p150Glued の C 末端領域に結合し、APP と結合できない p150Glued の C 末端領域切断体を強制発現させた軸索において APP の局在が野生型 p150Glued を強制発現させた場合に比べて異常な軸索内集積を呈することを生化学的・分子細胞生物学的解析により明らかにした。p53 は核内において生存およびストレスシグナル経路のタンパク質の転写・発現に関わる。p53 の転写活性を特異的に阻害する化合物として Pifithrin- α がある。私どもは神経細胞に微小管安定化剤である taxol と Pifithrin- α の同時処理をした結果、taxol 単独処理あるいは Pifithrin- α 単独処理の効果に比べて顕著にグルタミン酸毒性による軸索変性を抑制することを細胞生物学的に明らかにした。

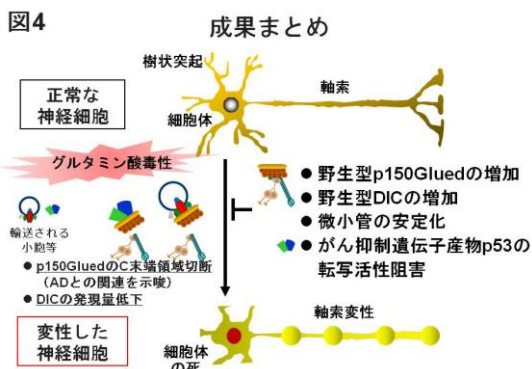
4. 研究成果

本研究を通じてアルツハイマー病などの神経変性疾患に認められる神経細胞の軸索変性を制御する新しい分子機構を、ラットお

図3 野生型p150GluedとTaxolの相乗効果が軸索変性を抑制する



よびマウス海馬神経の初代培養細胞とグルタミン酸毒性の解析系そして生化学および分子細胞生物学の手法を用いて解明した。得られた成果は、軸索変性を制御する因子として軸索逆行性物質輸送に関わる p150Glued と DIC、そして微小管の安定性、がん抑制遺伝子産物 p53 の転写活性の同定があげられる (図4)。特に p150Glued は、グルタミン酸毒



性により生成された C 末端領域切断体が軸索変性およびストレスシグナルのアポトーシスを促進する一方で野生型が軸索変性およびストレスシグナルのアポトーシスを抑制し、さらに p150Glued の C 末端領域切断体をアルツハイマー病患者の神経変性が認められる脳組織において同定したことから、p150Glued を基盤としたアルツハイマー病の新たな病態形成機構を解明する糸口を見出した (Journal of Neurochemistry, 122, 2012)。本研究で同定した p150Glued の結合タンパク質であるベータアミロイド前駆タンパク質 APP の軸索内局在が p150Glued の C 末端領域切断体が障害され、また taxol による微小管の安定化が p150Glued の機能との相乗効果によりグルタミン酸毒性に誘発される軸索変性を顕著に抑制することを明らかにした (Biochemical and Biophysical Research Communications, 424, 2012)。さらに、本研究で同定した DIC 結合タンパク質であるがん抑制遺伝子産物 p53 の転写活性阻害と微小管の安定化の相乗効果がグルタミ

ン酸毒性による軸索変性を顕著に抑制し、p53 を介したストレスシグナルの抑制と生存シグナルの物質輸送を円滑化する微小管機能が軸索変性の抑制に重要であることを明らかにした (Biochemical and Biophysical Research Communications, 427, 2012)。これらの成果は国際的に高評価を得ることができ、最高峰の学会の一つである Keystone Symposia (米国タホ・シティ) において 2013 年 3 月 12 日と 14 日に口頭 (採択) およびポスター発表している。以上の成果から、軸索変性における細胞内シグナル変化を制御する分子を幅広く同定することに成功し、神経変性疾患をアルツハイマー病に絞ることで病態形成機構の解明に向けた研究を今後推進する基盤を確立したといえる。

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 3 件)

- ① Takeshi Fujiwara and Koji Morimoto.
Inhibition of p53 transactivation functionally interacts with microtubule stabilization to suppress excitotoxicity-induced axon degeneration.
Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、427、2012、100-106。
- ② Takeshi Fujiwara and Koji Morimoto.
Cooperative effect of p150Glued and microtubule stabilization to suppress excitotoxicity-induced axon degeneration.
Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、424、2012、

82-88。

- ③ Takeshi Fujiwara, Koji Morimoto,
Akiyoshi Kakita, and Hitoshi
Takahashi.
Dynein and dynactin components
modulate neurodegeneration induced by
excitotoxicity.
Journal of Neurochemistry、査読有、
122、2012、162-174。

[学会発表] (計2件)

- ① Takeshi Fujiwara, Koji Morimoto,
Akiyoshi Kakita, and Hitoshi
Takahashi.
Axonal transport proteins implicated
in the pathology of Alzheimer's
disease.
Keystone Symposia "Growing to
Extremes: Cell Biology and Pathology
of Axons"、2013年3月12&14日、
Granlibakken resort、米国、
タホ・シティ
- ② Takeshi Fujiwara, Koji Morimoto,
Akiyoshi Kakita, and Hitoshi
Takahashi.
Dynein and dynactin components
modulate neurodegeneration induced by
excitotoxicity.
第35回日本神経科学大会、2012年9月
20日、名古屋国際会議場(名古屋)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/organelle-network/jpn/independent/002/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 武志 (FUJIWARA TAKESHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授 (常勤)

研究者番号 : 50546786

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

盛本 浩二 (MORIMOTO KOJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員 (常勤)

研究者番号 : 00599996