

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830019

研究課題名(和文)パラノーダルジャンクションによる神経軸索機能調節機構の解明

研究課題名(英文)The role of myelin sheaths in the regulation of axonal homeostasis

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：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ネル分子の局在化に必須の構造、髄鞘-軸索間結合paranodal axo-glia junction (AGJ)が存在する。このAGJが軸索表面分子の局在だけでなく、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解明されつつある。本研究では、特にカルシウム調節に関与している分子IP3R1やERの軸索内局在に着目し、軸索恒常性維持におけるAGJを中心とした髄鞘の新たな役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Myelin sheaths are attached to axons on both sides of each node of Ranvier by means of highly specialized paranodal axo-glia junctions (PNJs). PNJs play important roles in the organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. To better understand the importance of the PNJs, we investigated cerebroside sulfotransferase (CST) deficient mice that partially lack PNJs. By ultrastructural and immunohistochemical studies we found that the mutant mice showed several axonal alterations before starting neurological symptoms both in the PNS and the CNS. In the CNS, myelinated internodal regions showed many focal swellings, and immunohistochemical analysis by means of the antibody against IP3R1 revealed high immunoreactivity within the swellings, and this IP3R1 accumulation was the first change we observed at the swellings. Therefore, defects of axonal transport appear to be a common phenotype of CST deficient mice and PNJs are important to maintain the axonal homeostasis.

研究分野：神経生物学

キーワード：髄鞘(ミエリン) パラノーダルジャンクション 軸索 IP3R1 カルシウム

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎動物の神経軸索の多くは、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生後発達期に増殖分化し、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絞輪に K チャネルはジャクスタパラノードにクラスターを形成することにより、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ルアクソグリアルジャンクション(AGJ)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(図1)。

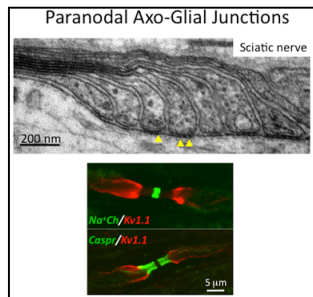


図1

(2) これまでに、軸索表面のチャネルの局在変化・維持にはAGJが必須であることを明らかにしてきた。また、AGJ形成異常を示すマウス cerebroside sulfotransferase(CST)欠損マウスを用いた研究より、AGJ形成異常軸索では、ミトコンドリア・小胞体などの細胞小器官の異常集積、モータータンパク質量の減少など輸送障害が起こり、最終的には軸索変性を来すことを明らかにした。この欠損マウスは脱髄は生じないので、AGJが軸索機能維持に極めて重要であることを示唆している。類似の変化は、他のAGJ異常マウスでも報告されており、またShroffらは(2011)AGJの状態と物質の透過性の関与について形態学的に研究を行っているが、AGJ形成異常における軸索内の分子レベルでの詳細な変化は明らかではない。

(3) CST欠損マウスのAGJ形成異常は、中枢および末梢神経に共通した所見であるが、興味深いことに出現部位に違いがある。中枢軸索では、コンパクトミエリンに覆われたインターノード部分に限局的な軸索腫脹・細胞小器官の集積が多数認められた。特に小脳プルキンエ細胞軸索の変化が顕著であり、軸索腫脹の初期の変化として、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)誘導性Caチャネルである1型IP<sub>3</sub>受容体(IP<sub>3</sub>R1)の局所的な集積がインターノード部位にあることを見出した。

(4) 一方、末梢軸索では腫大したミトコンドリアや小胞などの蓄積は、絞輪やそれに隣接したパラノード部分に認められる。中枢と末梢神経軸索の異常部位がなぜこのように異なるのか不明である。そこで、本研究では軸索と髄鞘が直接接するAGJが、どのようなメカニズムで軸索輸送を含めた機能調節に関わっているのか、分子レベルで明らかにす

ることを目的とする。また中枢神経系と末梢神経系でどのように異なるのかも明らかにする。

### 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AGJ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) 軸索輸送変化を伴う髄鞘異常マウスにおける翻訳後修飾の変化の解析

モータータンパク質と軸索内で運搬される分子や細胞小器官の結合は、局所のリン酸化シグナル調節を受けることが知られている。特に、ニューロン内のキネシンによる輸送はcyclin-dependent kinase 5 (CDK5)によるglycogen synthase kinase 3 (GSK3)の活性調節が関与することが報告されている。またアルツハイマー病における軸索輸送異常にもGSK3が関与しているとの報告がある。しかし、髄鞘と軸索が結合するAGJにおける局所的な調節にこれら分子や他のシグナル伝達系が関するかどうかは不明であり、他のシグナル伝達系を介してリン酸化が局所で調節されている可能性もある。正常およびAGJ欠損マウスから分離した、ランビエ絞輪周辺部ホモジネートを用いてCDK5やprotein phosphatase 1, GSK, tauなど現在軸索輸送に関わることが明らかにされているシグナル分子の変化についてウェスタン解析をおこなった。

(2) AGJ形成不全軸索の光学および電子顕微鏡解析

①坐骨神経のランビエ絞輪部のミトコンドリア腫脹は、他のAGJ形成不全マウスでも認められる共通の所見である。したがって、正常にAGJが維持されることが、軸索のミトコンドリアの分布および性状に極めて重要である可能性が考えられる。しかしながら、パラノードルジャンクション形成が不完全な軸索で、なぜミトコンドリアがランビエ絞輪部に集まり、腫脹するのか原因は明らかではない。そこで、小胞体の分布、軸索骨格の変化などミトコンドリア以外の軸索内変化を詳細に調べるために電子顕微鏡解析をおこなった。

②中枢神経系では、AGJ形成不全マウスの小脳プルキンエ細胞軸索に限局的な腫脹が認められる。軸索腫脹の変化を詳細に調べるために、光学顕微鏡および電子顕微鏡解析を行い、なぜ軸索腫脹が生じるのか原因の手掛かりを得た。

(3) *In vitro* 髄鞘培養系を用いた検討  
 申請者が着目している AGJ は有髄軸索の局限した場所である。AGJ 形成における軸索変化を詳細に観察するためには *in vitro* の髄鞘培養系を用いる必要があると考えた。したがって、マウス後根神経節細胞およびシュワン細胞の共培養、小脳分散培養あるいは小脳スライス系の系を行い、パラノード形成における軸索の変化を経時的に観察する系を立ち上げた。

#### 4. 研究成果

(1) CST 欠損マウス小脳プルキンエ細胞の軸索腫脹の変化

CST 欠損マウス小脳の軸索腫脹を詳細に調べると、日齢を経るに伴い腫脹部分が大きくなり、数も増えることが明らかになった(図2)。この軸索腫脹の変化はパラノード領域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常に観察された。したがって、AGJ がパラノード部分のみならず、有髄軸索全体の恒常性に参与している可能性が示唆された。

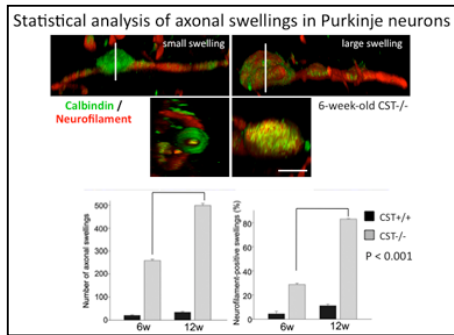


図2

(2) CST 欠損マウス小脳プルキンエ細胞の軸索腫脹と IP<sub>3</sub>R1 の局在

CST 欠損マウス小脳プルキンエ細胞の軸索腫脹をさらに詳細に調べた結果、生後発達期コンパクトミエリン形成に伴い軸索に膨らみが認められることが明らかになった。その軸索腫脹の初期の変化として IP<sub>3</sub> 誘導性のカルシウムチャネルである IP<sub>3</sub>R1 の軸索局在の変化が認められる。すなわち、正常軸索では IP<sub>3</sub>R1 は軸索全体にほぼ均一に染色性が認められる。ところが、CST 欠損マウスのプルキンエ細胞軸索ではわずかであるが、IP<sub>3</sub>R1 が多く集積している部分がある(図3)。

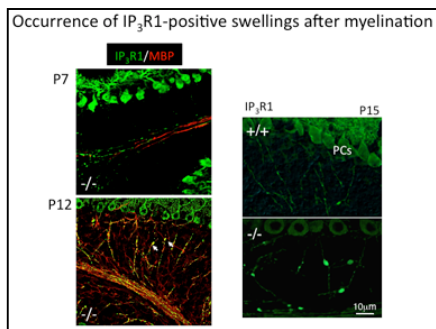


図3

この時期の軸索を電子顕微鏡で観察すると、小胞体が過剰に層を作っている所見が認め

られた。この小胞体の変化は、*in vitro* で IP<sub>3</sub>R1 を過剰発現した細胞で報告されている小胞体の構造変化と類似していた。したがって、CST 欠損マウス小脳プルキンエ細胞軸索の局限した腫脹部分では IP<sub>3</sub>R1 が過剰になり、カルシウム濃度が変化している可能性が強く示唆された。今後腫脹部のカルシウム濃度変化を測定して行く予定である。また IP<sub>3</sub>R1 欠損マウスと CST 欠損マウスを交配することにより、CST/IP<sub>3</sub>R1 ダブル欠損マウスを作製し、これらを解析することにより、IP<sub>3</sub>R1 が軸索腫脹の引き金になっているのか明らかにする。

(3) CST 欠損マウス坐骨神経軸索の変化

一方、AGJ 形成を呈する末梢軸索では、中枢神経系と異なり、ランビエ絞輪部分に異常が生じる。以前ミトコンドリアの腫大は報告しているが(図4、左上)、今回絞輪部の軸索径およびパラノード領域のミトコンドリアの数に注目し解析した。末梢神経軸索は通常、ランビエ絞輪部はインターノード部分の軸索径よりも細くなっている(図4、右上)。これは、コンパクトミエリンが形成されるに伴い軸索骨格タンパク質のニューロフィラメントのリン酸化が促進され軸索径が大きくなるためである。ところが、CST 欠損マウスでは、ランビエ絞輪部分の軸索径が優位に大きくなっていた(図4、右下)。この結果、AGJ 形成不全を呈する軸索(図4、左下)では、ミトコンドリアの分布のみならず軸索径も異常になることが分かった。

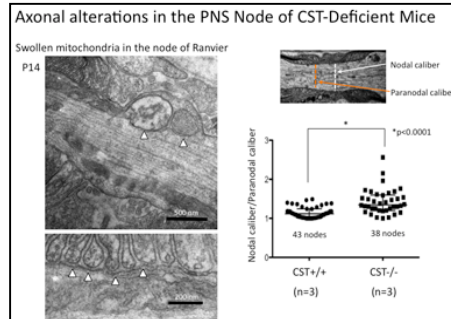


図4

(4) CST 欠損マウス坐骨神経のミトコンドリアの数と軸索のモータータンパク質の変化

さらに、詳細に電子顕微鏡で坐骨神経を観察すると、絞輪部のミトコンドリアの腫脹だけではなく、パラノード部分のミトコンドリアの数も有意に多くなっていることが明らかになった(図5、左)。

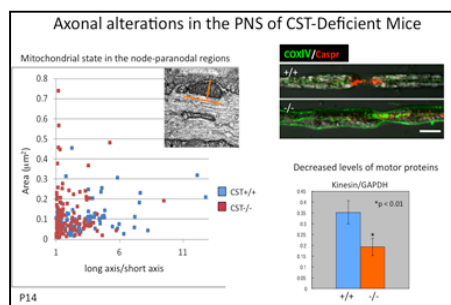


図5

また、このミトコンドリアの分布の変化は免疫組織化学的解析においても同様の結果が得られた(図5、右上)。軸索内のミトコンドリアは微小管の上を走るモータータンパク質に結合して輸送されることが知られている。そこで、CST 欠損マウスの坐骨神経ホモジネートを作製し、モータータンパク質量を調べると、正常マウス坐骨神経に比較して順行性も逆行性のモータータンパク質も共にタンパク量が有意に減少していた(図5、右下)。したがって、AGJ 形成不全軸索では軸索輸送障害が生じていることが示唆された。今後、確立した *in vitro* 髄鞘培養系を用いてミトコンドリアの変化を調べる予定である。

#### 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3件)

① Ishibashi T, Kodama A, Baba H. (2015) Disruption of paranodal axo-glial interaction and/or absence of sulfatide causes irregular type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor deposition in cerebellar Purkinje neuron axons. *J Neurosci Res*. 93:19-27.

② Yamazaki R, Ishibashi T, Baba H, Yamaguchi Y. (2014) Unconventional myosin ID is expressed in myelinating oligodendrocytes. *J Neurosci Res*. 92:1286-1294.

③ Kajigaya H, Tanaka KF, Hayashi A, Suzuki A, Ishibashi T, Ikenaka K, and 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

[学会発表] (計3件)

① Ishibashi T, Hinohara K, Mizuno J, Takahashi S, Mikoshiba K, Baba H. The role of myelin sheaths in the regulation of axonal homeostasis. 第58回日本神経化学会 2015年9月11-13日 埼玉・大宮ソニックシティ

② Ishibashi T Axonal alterations in disruption of paranodal axo-glial junctions (髄鞘異常と軸索内動態について) 第57回日本神経化学会 2014年9月29日-10月1日 奈良・奈良県文化会館/奈良県新公会堂

③ Ishibashi T, Koizumi A, Baba H. The importance of paranodal axo-glial junctions in Purkinje neurons during early development. 第56回日本神経化学会 2013年6月20-23日 京都・国立京都国際会館

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 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：