

## 軸索変性の機序の理解と診断へ向けた、ミトコンドリアの動的秩序に関わる新規パラメーターの導出

研究代表者： 小西 慶幸（工学系部門・准教授）  
共同研究者： 三宅 誠司（医学系部門・助教）

概要	
	ミトコンドリアの機能異常は様々な神経疾患に関わることが示されている。特に神経細胞は軸索輸送と微小管への係留を介して複雑な軸索全体にミトコンドリアを供給する必要があり、このシステムの破綻は軸索変性を介して神経細胞死を引き起こすと考えられる。これまでの研究で、ミトコンドリア輸送に関わるモーター分子や係留分子がなど多くの制御因子が報告されて来た一方で、集団的な秩序がどのようにして制御されるのかは不明である。本研究ではミトコンドリアの空間依存的分布および時間依存的変化を定量的に解析し、集団的な振る舞いを決定するパラメーターを導出する。本年度は主に顆粒神経細胞を用いて軸索内の停止型ミトコンドリアの空間分布についての解析を行った。また、網膜神経節細胞を用いた軸索内輸送イメージングについての解析を行った。
関連キーワード	神経、軸索、ミトコンドリア、軸索輸送、神経変性疾患

### 研究の背景および目的

ミトコンドリアの機能異常は様々な疾患に関わることが示されている。神経細胞においては、軸索輸送によりミトコンドリアを各部位に輸送することで軸索の機能維持に必要な ATP を供給する。また、機能の低下した異常ミトコンドリアは軸索輸送により正常なものと同様に交換される必要がある。軸索内のミトコンドリアの輸送システムの破綻は、局所的なエネルギーの欠乏や異常なミトコンドリアの蓄積を介して軸索機能を低下させ、様々な神経変性疾患の原因となると考えられる。このため、ミトコンドリアの軸索輸送機構はこれまで精力的に研究され、順行性・逆行性輸送に関わる微小管モーター分子であるキネシン・ダイニンの機能 (Hirokawa et al., Neuron 2010) や Milton/Miro、Syntabulin などのミトコンドリアとモーター分子の相互作用に関わるアダプター分子の機能が解明されてきた。(Sheng and Cai, Nat Rev Neurosci 2012)。

軸索内のミトコンドリアは上記の分子を介して軸索内を輸送されるもの (移動型ミトコンドリア) と微小管への係留により停止したもの (停止型ミトコンドリア) が存在し、局所的な ATP 供給には停止型ミトコンドリアが重要な役割を担っていると考えられている。軸索内のミトコンドリアの存在部位については、以前より軸索末端やランビエ絞輪などエネルギー需要の高い特定の構造に高頻

度で存在することが知られてきた。大脳皮質神経細胞を用いた研究により、無髄の状態において軸索全体に定常的に多くのミトコンドリアが停止型として存在することが報告されている。近年、微小管への係留因子としてアンカー分子である Syntaphilin が同定され (Kang et al., Cell 2008)、係留を制御するシグナル因子についての解析が進められている。さらに、停止型ミトコンドリアは軸索の分岐形成の位置決定に関わる可能性があると共に (Spillane et al., Cell Rep 2013)、その割合の低下は軸索の形態異常 (Courchet et al., Cell 2013) を引き起こすことが示されている。

中枢神経の軸索内のミトコンドリアは多くが停止型であり、これが広く分布することで各部位に必要な ATP を供給している。局所的な ATP の欠乏は軸索の変性を起こすと考えられることから、ミトコンドリアを軸索内に広く分布させる機構や、機能の低下を防ぐためターンオーバーを制御する機構など未知の細胞内システムが存在すると考えられる。本研究では停止型ミトコンドリアの空間的分布および時間依存的変化を定量的に解析し、集団的な振る舞いを決定する機構を解明する。さらにこのようなミトコンドリアの動態を制御する細胞内システムの破綻が神経変性疾患に寄与する可能性を検証する。

### 研究の内容および成果

長時間のタイムラプス解析により、小脳顆粒神

経細胞では軸索内のミトコンドリアの約 8 割が停

止型であること、また、停止型ミトコンドリアが比較的短時間で移動型に切り替わり位置を変化させる(半減期 110min) ことを発見した。停止型ミトコンドリアの密度やターンオーバーは分岐した軸索の枝などの領域に依存せず一定であり、停止型と移動型が一定確率で頻繁に切り替わることで複雑かつ可変的な軸索内に広く分配が行われることが示唆された。一方、区画化法によりミトコンドリアの空間分布を解析した結果、ミトコンドリアを軸索内に一様に分配させる未知の機規則性が存在することを見出した。ミトコンドリアがランダムに分布すると仮定すると、区画あたりのミトコンドリア数を示すグラフはポアソン分布と一致すると考えられる。実験ではポアソン分布と有意な差が検出され、平均密度に相当する位置にピークが検出された(図1)。ランダムな分布では局所的なエネルギーの欠乏が生じる確率が高くなるため、均一にミトコンドリアを配置させる細胞内システムが存在すると考えられる。次に個体群密度の研究で利用される手法を用いて、軸索内ミトコンドリア分布を定量的に解析した。一様分布、ランダム分布、凝集分布の3パターンを想定した。ランダム分布では、分散指数である  $I\delta$  指数を導出することで、停止型ミトコンドリアが実際に一様分布を示すか否かを解析を行った。一様分布、ランダム分布、凝集分布において  $I\delta$  指数はそれぞれ1未満、1、1以上の値をとるが、小脳顆粒細胞においては殆どの軸索内で1未満の値をとり、ミトコンドリアの分布が一様分布の傾向を示すことが明らかになった。今後、経時的な分布の変化を解析し、分布を決定する機構の解析を進めるとともに、

網膜神経節細胞など異なる細胞種や発生段階の違いによる影響について解析を行う予定である。

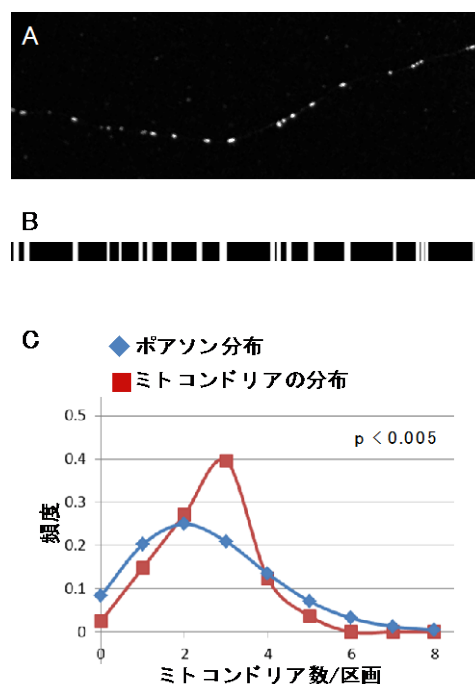


図1. 軸索内のミトコンドリアの空間的分布. (A) 小脳顆粒細胞 (P5+7DIV) 内の軸索の蛍光染色像. (B) 直線化、および2値化した画像. (C) 区画化法により解析した結果. ポアソン分布とは有意に異なる分布が検出された ( $p < 0.005$ ).

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

- Ikeno T, Konishi Y. Differential retraction of axonal arbor terminals mediated by microtubule and kinesin motor. *Commun. Integr. Biol.* e1288771 (2017). (corresponding author)
- Uryu D, Tamaru T, Suzuki A, Sakai R, Konishi Y. Study of local intracellular signals regulating axonal morphogenesis using a microfluidic device. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 17:1, 691-697 (2016). (corresponding author)
- Seno T, Ikeno T, Mennya K, Kurishita M, Sakae N, Sato M, Takada H, Konishi Y. Kinesin-1 sorting in axons controls the differential retraction of arbor terminals. *J Cell Sci.* 29:3499-510 (2016). (corresponding author)
- Seiji Miyake, Yuji Takihara, Satoshi Yokota, Yoshihiro Takamura, and Masaru Inatani. Effect of axonopathy on dynamics of acidic

organelles in the axons of primary cultured retinal ganglion cells. *Experimental Eye Research* (投稿中).

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 山田科学振興財団・研究助成・2017年度・神経細胞におけるミトコンドリア動態の集団的規則性の研究・代表・不採択
- 武田科学振興財団・ライフサイエンス研究奨励・2017年度・神経細胞におけるミトコンドリア動態の集団的規則性の研究・代表・申請中
- 文部科学省科学研究費・基盤研究(C)・2017-2019年度・分岐軸索内における区画標識としてのチューブリン修飾の機能解明・代表・申請中