

ミトコンドリアの時空間的動態を調節する 新規軸索内機構の解析

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

概要	
	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の原因になると考えられる。これまで輸送制御に関わる分子が明らかにされてきた一方で、軸索内のミトコンドリアが集団としてどのように振る舞うのか、また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制御する新たな機構を明らかにすることを目的とする。昨年度の結果から小脳顆粒神経細胞において軸索内の停止型ミトコンドリアの空間分布が一様分布の傾向を示すことが明らかとなった。本年度は主に分布を決める機構の解析を行った。また神経の種類による違いと疾患との関連を検討するため網膜神経節細胞を用いた解析を行った。
関連キーワード	神経、ミトコンドリア、軸索輸送、神経変性疾患、緑内障

研究の背景および目的

軸索内のミトコンドリアの輸送の異常は、ATP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。これまで輸送に関わるモーター分子であるキネシン・ダイニンや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。一方、軸索内のミトコンドリアの集団としての振る舞いにどのような秩序が存在するのかについては殆ど理解が進んでいない。申請者は軸索の形成・維持機構について研究を行い、細胞内シグナルや軸索輸送の観点から新たな分子機構を見出してきた。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機構を解明する。

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を供給する。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。本研究により、軸索内のミトコンドリアの集団的な振る舞いを決定する新たな細胞内システムを明らかにできると考えられる。特にミトコンドリアを一様に分布させる機構は効率的なエネルギー供給を介して軸索の維持に重要な役割を担うと考えられる。また、速度論的パラメータや空間的分布に対する分散指数の比較により、新たな病態モデルの構築や診断法の確立など臨床応用への可能性が期待される。

これまでの実験により停止型ミトコンドリアの空間分布は、軸索内で一様の分布様式を示すという新たな規則性の存在が示唆された。そこで本年度の研究により、軸索内においてミトコンドリアの分布を制御する機構を明らかにするとともに、これら軸索内ミトコンドリアの動態や空間分布が神経細胞の種類や環境に依存してどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。

研究の内容および成果

まず、小脳顆粒神経細胞において培養日数の変化に依存して停止型ミトコンドリアの割合がどのように変化するかを解析した。その結果、軸索が形成された直後の培養3日目では軸索内のミトコンドリアの約7割が停止型であった。日数とともに割合は上昇し、7日目では約9割が停止型であ

った。次に軸索内のミトコンドリアを一様に分布させる機構として、ミトコンドリア間の相互作用により停止位置が制御される可能性とアンカー因子などにより微小管上の停止位置が固定されているという2つのモデルを想定し、長時間タイムラプス解析により新たに停止型ミトコンドリアが生

じる位置を解析した。イメージング開始におけるミトコンドリアの位置と各観察時間における位置を解析した結果、時間の経過とともに相関係数の低下が見られた。一方、分布の傾向を示す指数である $I\delta$ 指数は、時間の経過に対してほぼ横ばいで 1 未満、すなわち一様分布の傾向を示した。このことから停止ミトコンドリアの位置は決定しているわけではなく、停止場所が変化しながら集団として一様分布が保たれることが示唆された。

ミトコンドリア間で相互に作用する因子の候補として ATP が関与する可能性を考え、軸索内での濃度を測定した。このため ATP センサーである Perceval を神経細胞内に発現させ、軸索内においてミトコンドリアからの距離に依存したシグナルの変化を測定した。その結果、ATP 結合による蛍光シグナルの強度がミトコンドリアからの距離に依存して有意に低下することが示唆され、ATP 濃度がミトコンドリアの位置決定に寄与するという仮説に矛盾しない結果が得られた。

一方、神経の種類に依存した違いを解析するため、網膜神経節細胞の培養系を用いて軸索内のミトコンドリアの動態を解析した。網膜神経節細胞では小脳顆粒神経細胞と比較して停止型ミトコンドリアの割合は低く移動性のミトコンドリアが多いことが観察され、神経の種類に依存した違いが存在することが示された。一方、 $I\delta$ 指数の解析から、停止型ミトコンドリアの空間分布には一様性の傾向が観察された。このことから分布制御に普遍的な機構が関与する可能性が示唆された。

緑内障の発症原因の 1 つとして、網膜神経細胞の軸索におけるミトコンドリアの局在異常が示唆

されている。そこで、緑内障患者の前房水中で上昇することが報告されているサイトカインのミトコンドリア動態への影響を検討したものの、対照群と比較して、顕著な差を観察できなかった。今後、投与するサイトカインの濃度や種類の変更に加え、軸索切断や圧力、酸化ストレスといった他の緑内障関連因子の影響についても検討したいと考えている。

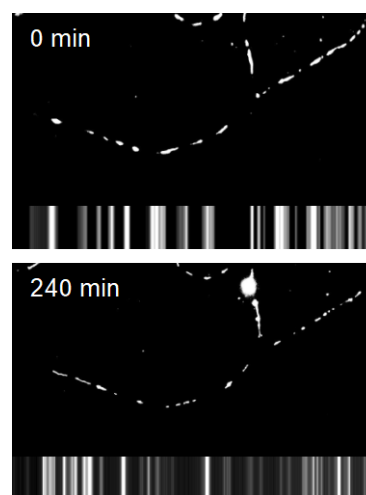


図 1. 軸索内のミトコンドリアの空間的分布。(上) 小脳顆粒細胞 (P5+7DIV) 内の軸索のミトコンドリアと直線化後の位置。(下) 240 分後の位置。大半のミトコンドリアが位置を変化させていることが分かる。

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」

Inami Y, Omura M, Kubota K, Konishi Y. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 reduces extension of the axonal leading process by destabilizing microtubules in cerebellar granule neurons. *Brain Res.* (in press)

Miyake S, Takihara Y, Yokota S, Takamura Y, Inatani M. Effect of Microtubule Disruption on Dynamics of Acidic Organelles in the Axons of Primary Cultured Retinal Ganglion Cells. *Curr Eye Res.* 43, 77-83, 2018.

Konishi Y, Matsumoto N, Hori I, Miyake S. Temporal and spatial regulation of stationary mitochondria in axon. 11th International Symposium on Nanomedicine. 12/13-15, 2018, Sendai (招待講演).

Miyake S, Takihara Y, Yokota S, Takamura Y, Inatani M. Effect of axonopathy on dynamics of acidic organelle in the axon of primary cultured retinal ganglion cells. *Association for Research in Vision and Ophthalmology.* 5/7 -11, 2017, MD, USA.

松本 望、堀 生実、三宅 誠司、小西 慶幸. 神経軸索内におけるミトコンドリアの動態と分布様式の解析. *ConBio2017.* 12/6-9, 2017 神戸

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

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・採択

文部科学省科学研究費・新学術領域研究・2018-2019 年度・シナプス前終末の分布・動態を規定する細胞自律的機構・代表・不採択

ノバルティス研究奨励金・2017 年度・神経軸索内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

文部科学省科学研究費・若手研究 (B)・2016-2018 年度・網膜神経節細胞のミトコンドリア動態と細胞死誘導機構の相関性解明とその臨床応用・代表・採択