

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	福光 甘齋
論文題目	小脳プルキンエ細胞樹状突起形成を支えるエネルギー代謝機構の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>中枢神経系ニューロンは複雑に分岐した樹状突起と軸索を伸展して神経回路を形成する。神経活動の維持には間断ないイオン能動輸送が必要なため、ニューロンは多量の ATP を消費するが、神経細胞の複雑な突起全長に ATP が供給されるメカニズムは十分に理解されておらず、特に脳発達の過程で急激に容積と複雑性が拡大する神経細胞全体に ATP が供給される機構については全く明らかでなかった。本研究では緻密な樹状突起を展開する小脳プルキンエ細胞をモデルとして、樹状突起発達過程におけるエネルギー供給機構を解析した。</p> <p>まず、初代培養した小脳プルキンエ細胞におけるミトコンドリアの挙動をライブ観察し、発達中の樹状突起に活発にミトコンドリアが運搬されることを見出した。ミトコンドリアを人工的に架橋させるカリンカー分子の競合阻害分子を発現させるかの方法で、細胞体でのミトコンドリアの機能を阻害せずに樹状突起への分布を特異的に抑制すると、樹状突起の発達が顕著に抑制された。ATP バイオセンサーを用いて ATP 量を計測すると、ミトコンドリア不在下では樹状突起の ATP 量は減少しており、培養液にクレアチンを添加し ATP 合成を促進させるとミトコンドリア不在下での樹状突起発達不全が有意に回復したことから、ミトコンドリアが樹状突起で ATP を現地生産することが樹状突起発達に必要であることが示唆された。</p> <p>次にミトコンドリア酸素呼吸以外の ATP 供給経路の寄与を検証した。解糖系阻害剤を加えても樹状突起発達には殆ど影響がなかったが、クレアチンキナーゼを阻害すると樹状突起が矮小化した。さらにプルキンエ細胞に発現する 2 種の細胞質クレアチンキナーゼを RNA 干渉で抑制すると <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i> どちらにおいてもプルキンエ細胞樹状突起の発達不全が誘導されたことから、ミトコンドリア由来の ATP のリン酸基をホスホクレアチンに置換して貯蔵するクレアチンシャトルが樹状突起発達に必要であることが明らかになった。</p> <p>最後に ATP の主要な消費経路として、アクチン代謝に注目し、ミトコンドリア不在下またはクレアチンキナーゼ阻害下で樹状突起末端のアクチン動態を解析したところ、有意にターンオーバーが減速していることを見出した。また、アクチン脱重合制御因子であるコフィリンが樹状突起末端でアクチン凝集体を形成していることを観察した。コフィリンは ATP 枯渇下で脱リン酸化し、アクチンを断片化したままその後の脱重合を阻害するという報告がある。そこでコフィリン脱リン酸化型変異体をプルキンエ細胞に強制発現すると、樹状突起でアクチン凝集体を形成し、ミトコンドリア不在下またはクレアチンキナーゼ阻害下で見られるのと同様の樹状突起形成不全が誘導され、さらにアクチン代謝の減速も確認された。</p> <p>以上の結果から、発達中のプルキンエ細胞樹状突起において ATP 濃度が維持されるには、局所ミトコンドリアによる ATP 産生とクレアチンシャトルが必要であり、ATP 存在下でアクチン代謝が正常に維持されることが突起成長を促すことが明らかになった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、発達中のニューロンにおけるエネルギー供給機構に着目し、小脳プルキンエ細胞の長期タイムラプス観察系を主に用いて、ミトコンドリアの挙動と機能解析を行った。

まずミトコンドリアを生細胞標識してその分布を観察したところ、成熟したニューロンの樹状突起には末端までミトコンドリアが配置していること、発達過程では樹状突起伸長に伴い活発にミトコンドリアが輸送されることから、ミトコンドリアの樹状突起局在の重要性が示唆された。そこで個々のミトコンドリア機能に影響を与えずに樹状突起輸送を特異的に阻害する人工分子をプルキンエ細胞に導入し、その影響を観察した。その結果局所ミトコンドリア不在下では樹状突起の成長が阻害され、このとき樹状突起遠位部でATP濃度が減衰していることを見出した。ミトコンドリア不在下での樹状突起発達不全の機構として、樹状突起内Ca²⁺濃度の上昇とATP不足の可能性を検証した。薬剤によるCa²⁺上昇抑制は効果がないが、クレアチン処理によるATP産生の促進は有意に樹状突起形成を回復させたことから、ミトコンドリアによる局所ATP産生が樹状突起成長に必須であることが明らかになった。

次に薬理実験により他のATP供給系の関与を調べ、解糖系の寄与が小さく、代わりにクレアチンキナーゼの機能の重要性を見出した。そこでプルキンエ細胞に発現する2種のクレアチンキナーゼのRNA干渉を行い、樹状突起形成に筋肉型、脳型細胞質クレアチンキナーゼ (M-CK, B-CK) の細胞自律的作用が必須であることを証明した。

ミトコンドリアの局在異常またはクレアチンキナーゼ阻害下で起こる局所ATP不足が樹状突起形成不全を誘導する機構として、申請者はアクチンによる細胞運動制御に着目した。定量的画像解析により、樹状突起ミトコンドリアの減少またはクレアチンシャトルの阻害条件下では、突起末端でアクチン代謝が減速していることを見出した。アクチンの重合・脱重合にはATPが必要であるが、ATP枯渇下で脱重合制御因子コフィリンの脱リン酸化が進んでいることを示し、コフィリンの脱リン酸化変異体を強制発現することで、樹状突起矮小化とアクチン代謝減速の表現型が再現できることを証明した。

以上の結果から、発達中の神経回路において神経細胞は成長する突起にミトコンドリアを運搬してATPを局所産生し、さらにクレアチンシャトルによってATP濃度を細胞全体で一定に保つ機構を備えていることが明らかになった。またATPが枯渇するとコフィリン活性の制御によりアクチン代謝を減速させ、突起伸長によるATPの消費を抑えて細胞機能を維持する機構の存在が示された。これらは神経細胞のエネルギー戦略の一端を明らかにした重要な知見である。

本論文では、申請者の神経細胞生物学に関する高度で幅広い学識と優れた研究遂行能力により、独創的・統合的に精緻な研究が展開されており、生命科学の理解と発展に寄与する発見が論理的に一貫性をもって記述されている。従って博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。平成27年4月1日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日