

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

福光 甘齋

目次

要旨.....	3
第一章 序論.....	5
第二章 結果.....	13
第三章 考察.....	41
実験方法.....	45
参考文献.....	55
謝辞.....	63

要旨

脳は最もエネルギーを消費する器官であり、心筋梗塞などで引き起こされる虚血に対して過敏性を示すことから、細胞内でのエネルギー状態が厳密に制御される必要があることが示唆されている。脳の神経回路の基本単位である神経細胞は、基本的に樹状突起、軸索、細胞体の3つの区画から構成されている。特に神経細胞はその細胞種により多様な形態の樹状突起を持つことが知られている。このように高度に極性化した形態を形成・維持するために、ゴルジ体をはじめとする細胞内小器官の選択的配置が重要であることが報告されている。しかしながら、主要なエネルギーの担い手であるミトコンドリアや解糖系などの他のエネルギー生産システムがどのように樹状突起を形成・維持するのかについてはほとんど明らかではなかった。

本論文では、中枢神経系細胞の中でも際だって特徴的な樹状突起を持つ小脳プルキンエ細胞をモデルとし、複雑な樹状突起を形成および維持するのに必要なエネルギー供給システムを明らかにすることを目的に研究を行った。私は、ミトコンドリアが樹状突起分岐に特に局在しやすいことを見出し、その局在を人為的に減少させると樹状突起の伸長阻害を引き起こすことを見出した。この表現型はエネルギー供給システムであるクレアチンシャトルを活性化させると回復した。一方、クレアチンシャトルを阻害すると突起伸長が阻害されることを見出した。ATP イメージングの結果、樹状突起ミトコンドリアの減少下およびクレアチンシャトル阻害条件下では樹状突起で ATP 量の減少が観察された。そのような ATP 減少下では、伸長する樹状突起においてアクチン脱重合タンパク質である Cofilin が活性化し、Cofilin 凝集体が形成され、アクチンの代謝が抑制されることを見出した。さらに、Cofilin の構成的活性化変異体をプルキンエ細胞に過剰発現させると、Cofilin 凝集体の形成と樹状突起の矮小化が観察されたことから、Cofilin 凝集体形成が突起伸長に影響を与えることが示唆された。

以上の結果より、樹状突起ミトコンドリアの配置とクレアチンシャトルシステムとの共作用がアクチン代謝を制御することで突起伸長が維持されることが明らかになった。

第一章 序論

脳はそれぞれの機能に応じて、特徴的な神経回路を形成している。神経回路の基本単位である神経細胞は、基本的に木のように複雑に枝分かれした突起である樹状突起と細長い突起である軸索の2種類の突起を持つ。樹状突起および軸索はそれぞれ情報の入力、出力に関わる。軸索には電位依存性 Na^{2+} チャンネルが豊富に局在し、軸索起始部で発生した活動電位が軸索末端まで減衰することなく到達する。一方、樹状突起では複数のシナプスで電位の変化が生じ、それらの入力情報が樹状突起内で統合され、閾値を超えた場合のみ活動電位が生じる。特に樹状突起は神経細胞種により多様な形態をしており、樹状突起の形態の違いはシナプス電位の広がり方や活動電位の発生のしやすさに多大な影響を与えることが知られている (Fig. 1-1)。

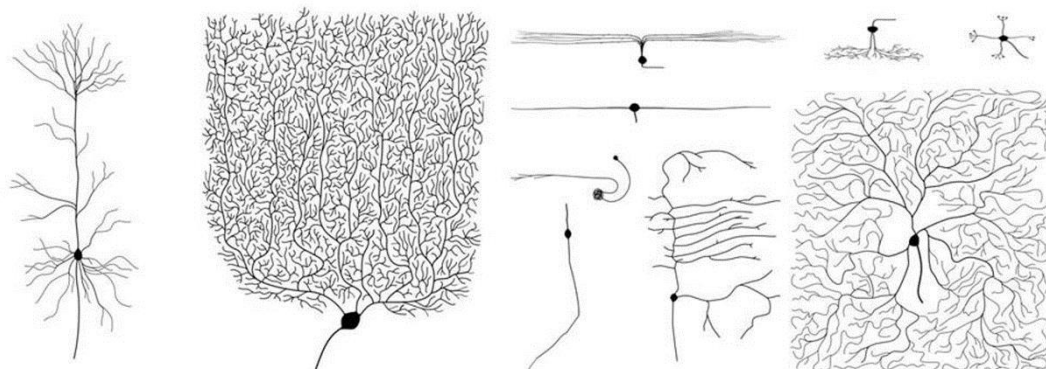


Fig. 1-1 多様な樹状突起形態 (Gao, 2007 を元に改変)

小脳は大脳皮質とも相互作用し、運動の制御のみならず、認知・情動などの高次機能の制御においても重要な役割を果たしていることが近年明らかになりつつあり、小脳の機能障害が自閉症などの精神疾患とも関係している可能性が示唆されている。小脳は小脳皮質とその深部に位置する小脳核から構成される (Fig. 1-2)。小脳での情報処理の中枢を担う小脳皮質は軟膜表面より順に、分子層・プルキンエ細胞層・顆粒細胞層の3層から構成されている。小脳皮質を構成するプルキンエ細胞は、小脳皮質からの唯一の抑制性出力細胞であり、中枢神経系神経細胞の中でも際だって複雑な樹状突起を持つ。その軸索は小脳核にシナプスをつくる。またプルキンエ細胞は、外側網様核などからの苔状線維経

由で小脳皮質顆粒細胞の平行線維を介する入力と、下オリーブ核からの登上線維を介する入力の2系統からの興奮性シナプス入力を受ける。プルキンエ細胞はその大きな扇状の樹状突起で平行線維から10-20万個もの入力を受けるが、登上線維からはプルキンエ細胞1個あたり1つのシナプス入力しか受けない。プルキンエ細胞欠損マウスである **Lurcher** マウスでは小脳学習に異常がみられることから、プルキンエ細胞が運動制御に果たす役割はきわめて大きいと考えられている。小脳皮質ではさらに、顆粒細胞から入力を受けた星状細胞およびバスケット細胞がプルキンエ細胞を抑制することや、顆粒細胞から入力を受けたゴルジ細胞が再び顆粒細胞を抑制することが知られている。このように、他の脳領域に比べ小脳は、その神経回路の配線が明確でよく理解されていることから、非陳述記憶の基盤となるシナプス機構や神経回路形成のメカニズムを研究するのに非常に適していると考えられている。

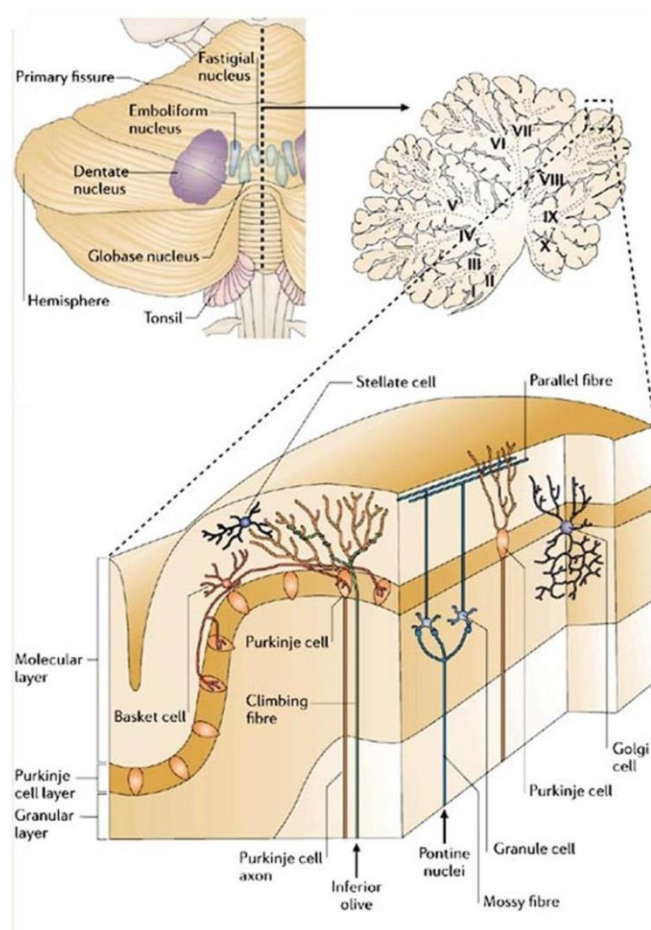


Fig. 1-2 小脳の解剖学的形態とその断面図 (Ramnani et al., 2006 を元に改変)

当研究室では小脳プルキンエ細胞をモデルとし、複雑な樹状突起がどのように作られ、維持されるのかを研究することで神経回路形成の生理学的意義を明らかにすることを目標としている。プルキンエ細胞樹状突起形成過程は主に三段階に分けられることが知られている (Fig. 1-3; Sotelo and Dusart, 2009)。第一段階では細長い尖端突起が形成されるが、いったん退縮した後、複数の短い樹状突起が形成される。第二段階では複数の突起のうち一本が選択されて一次樹状突起ができるとともに、他の突起は退縮する。一次樹状突起は軟膜表面に向かって急速に伸長するとともに多くの分岐が形成される。第三段階ではプルキンエ細胞と平行繊維や登上繊維などの間でシナプスが形成される。

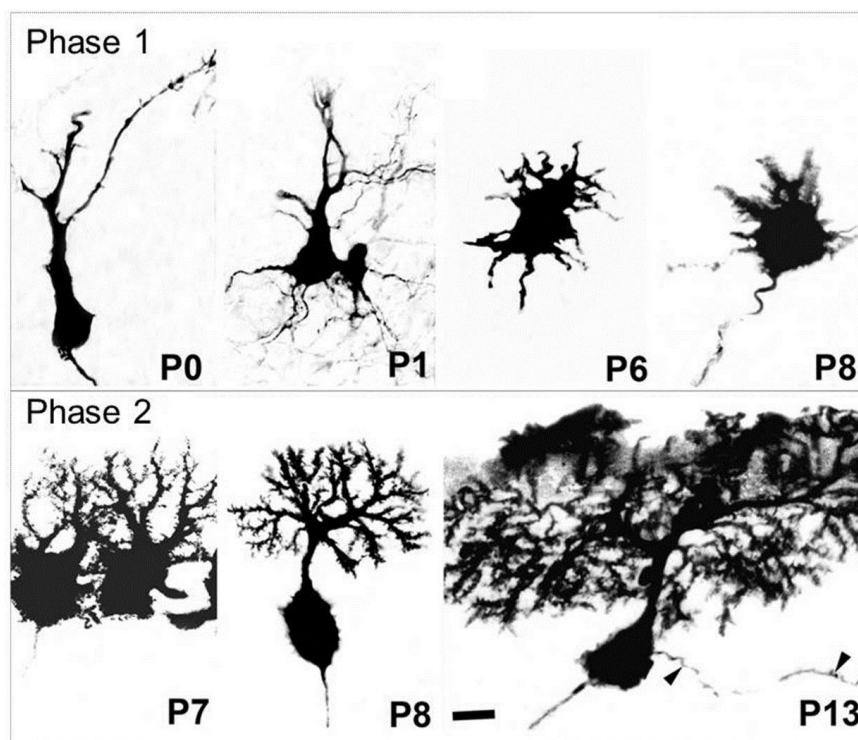


Fig. 1-3 *in vivo* におけるプルキンエ細胞樹状突起形成過程 (Sotelo and Dusart, 2009 を元に改変)

当研究室では特に第二段階の複雑な樹状突起が形成される過程に着目して樹状突起形成・維持の分子メカニズムの研究を行っている。分散培養系を用いたプルキンエ細胞樹状突起伸長過程の経時観察から、突起の伸長、分岐形成、退縮の主に3つのダイナミクスの組み合わせにより複雑な樹状突起形態が形成されることが明らかになった (Fig. 1-4; Tanaka et al., 2006; Fujishima et al., 2012)。

このようにプルキンエ細胞はその樹状突起発生過程が明確に観察できることから、内在の遺伝子プログラムや栄養因子などの細胞外環境因子が樹状突起形成を制御する分子メカニズムを研究するのにすぐれたモデルになると考えられる。

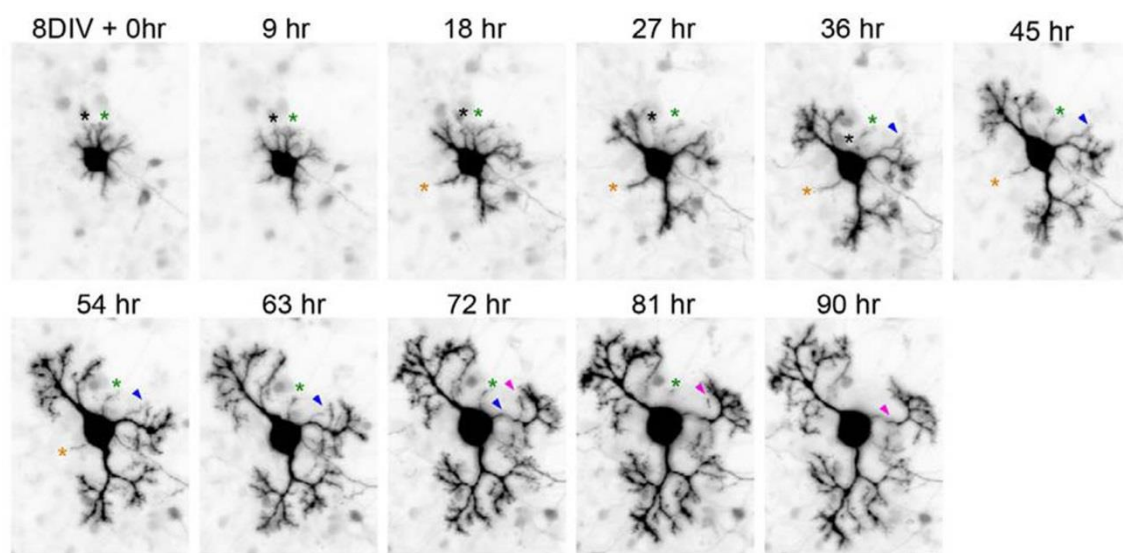


Fig. 1-4 *in vitro* におけるプルキンエ細胞樹状突起発生過程のタイムラプス観察 (Fujishima et al., 2012 より引用)。印のついた樹状突起が退縮する。

樹状突起は分岐点・シャフト・スパインの3つの区画に分けられる。近年、これらの区画化がシナプス入力情報の統合に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。例えば、長期増強などに重要な役割を果たすセカンドメッセンジャーである Ca^{2+} やイノシトールリン酸がスパインに捕捉されることで、これらの因子の分散を制御していることが報告されている (Santamaria et al., 2006)。また、樹状突起の特徴である分岐点は遠位樹状突起で発生したシナプス電位が線形あるいは非線形的に統合される場であり、入力情報の統合にきわめて重要な役割を果たしていることが知られている (Ferrante et al., 2013)。これまでに、これらの区画を形成および機能維持するためにはオルガネラの極性配置とそこでの局所作用が重要であることが明らかになりつつある。例えば、ショウジョウバエの da ニューロンにおいて、分岐点に golgi outpost が局在することが分岐形成に関与していることが報告されている (Ye et al., 2007)。また、樹状突起の分岐点では小胞体の構造が複雑になる傾向がありそこでの局所タンパク質輸送が分岐生成に関与することが報告されている (Cui-Wang et al., 2012)。さ

らに、MyosinVaによりプルキンエ細胞スパインに小胞体が運ばれることが長期抑制に重要であることが報告されている (Wagner et al., 2011)。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化を介したエネルギー生産のみならず、細胞内 Ca^{2+} の制御、シトクローム c を介したアポトーシスの制御、脂肪酸の β 酸化、脂質合成などさまざまな機能を持ち、その機能障害は脂肪酸の蓄積や細胞死などを引き起こす。ミトコンドリアは分裂、融合、輸送、停止の主に4つのダイナミクスの組み合わせによりその形態および機能を細胞内外の環境に応答して変化させる (Fig. 1-5A)。

ミトコンドリアはモータータンパク質である kinesin あるいは dynein 依存的に細胞内の各所へ輸送される。ミトコンドリアとダイニンを連結するアダプタータンパク質はほとんど知られていないが、ダイニンの軽鎖である Tctex1 と結合する VDAC が候補分子と考えられている (Schwarzer et al., 2002)。一方、kinesin とミトコンドリアを連結するアダプタータンパク質はよく知られており、dmiro と Milton がショウジョウバエでのスクリーニングからはじめて同定され、のちに Milton のほ乳類でのホモログとして Trak1/2 が同定された (Fig. 1-5B; Guo et al., 2005; Brickley et al., 2005)。これまでに、ショウジョウバエの神経筋接合部において dmiro の欠損は、軸索末端でのミトコンドリアの局在を減少させ、異常にカルシウム濃度が上昇しやすくなることから、ミトコンドリアのカルシウム取り込みの重要性が報告されている (Guo et al., 2005)。また、ショウジョウバエの視細胞で Milton の変異はミトコンドリアの軸索輸送の阻害とシナプス伝達の異常を引き起こすことが報告されている (Stowers et al., 2002)。

ミトコンドリアの分裂を担う因子として GTPase である Dnm1 (Dynamin-related GTPase) が酵母ではじめて同定され、のちにほ乳類でミトコンドリアの分裂に関わる因子として Drp1 が同定された (Bleazard et al., 1999; Smirnova et al., 2001)。ミトコンドリアの分裂が起きる際、Drp1 はミトコンドリアに集積しながらミトコンドリアを輪状に取り囲み、GTPase 活性により輪状に連結した Drp1 が収縮することで分裂が促進される (Fig. 1-5C; Smirnova et al., 2001)。これまでに、ショウジョウバエの神経筋接合部において、Drp1 の変異により軸索末端にミトコンドリアが局在できなくなった結果、シナプス小胞を放出場所まで移動させるのに必要な ATP が不足し、神経伝達が著しく阻害されることが報告されている (Verstreken et al., 2005)。また、Drp1 の脳特異的欠損下では ATP 生産能およびミ

トコンドリアの膜電位には影響がみられないが、前脳の層構造の異常および大脳皮質神経細胞の突起減少がみられることが報告されている (Ishihara et al., 2009)。

ほ乳類でミトコンドリアの内膜の融合に関わる因子として OPA1 が、外膜の融合に関わる因子として Mfn1/2 がそれぞれ同定され、それぞれの融合タンパク質が2つのミトコンドリア間でホモ結合することで融合が促進される (Fig. 1-5D; Cipolat et al., 2004; Chen et al., 2003; Koshiba et al., 2004)。これまでに、Mfn1/2 および OPA1 の欠損はミトコンドリアの断片化を引き起こし、膜電位の低下や呼吸障害を引き起こすことが報告されている (Chen et al., 2005)。また、プルキンエ細胞で Mfn2 を欠損させると、ミトコンドリアの断片化を引き起こし、ミトコンドリア DNA を持たないミトコンドリアの数が増加する。このとき、ミトコンドリアの膜電位低下や呼吸活性障害などのミトコンドリアの機能低下にともない、プルキンエ細胞の脱落がみられることが報告されている (Chen et al., 2007)。

神経細胞の軸索では両方向に輸送されるミトコンドリアに加え、多くの停止しているミトコンドリアが存在する。軸索でのミトコンドリアの局在パターンはミトコンドリアの輸送停止頻度によって決定されることが示唆されている (Miller and Sheetz, 2004)。これまでに、ミトコンドリアが軸索内で停止するメカニズムとして、 Ca^{2+} が Miro1 の Ca^{2+} 結合ドメインに結合すると kinesin との連結が外れることで、ミトコンドリアが軸索の Ca^{2+} 濃度が高い一定の領域に停止するメカニズムが報告されている (MacAskill et al., 2009a)。さらに、近傍のアクチンフィラメントやニューロフィラメントへの結合によりミトコンドリアが特定の場所に停止することが知られている (Quintero et al., 2009; Sung et al. 2008; Winter et al., 2008)。ミトコンドリアは、軸索末端やランビエ絞輪およびスパインなど特にエネルギーやカルシウムの取り込み機能が必要とされる部位に局在することが知られており、ミトコンドリアが必要とされる部位で止まり、そこに局在することが神経細胞の機能発現に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。例えば、ショウジョウバエ神経細胞においてミトコンドリアの輸送を担う dMiro や Milton、分裂を担う Drp1 の変異により、軸索末端へのミトコンドリアの配置が減少し、神経伝達の異常が引き起こされることが報告されている (Guo et al., 2005; Stowers et al. 2002; Verstreken et al., 2005)。また、軸索分岐でのミトコンドリアの局在がそこでの局所タンパク質合成に寄与することが報告

されている (Spillane et al., 2013)。樹状突起においては、ミトコンドリアが活動電位依存的にスパインに集積することがスパイン形成に重要であることが報告されている (Li et al., 2004)。しかしながら、樹状突起におけるミトコンドリアの配置が突起伸長を制御するのかや、具体的にミトコンドリアのどのような機能が重要なのかについては不明な点が多い。

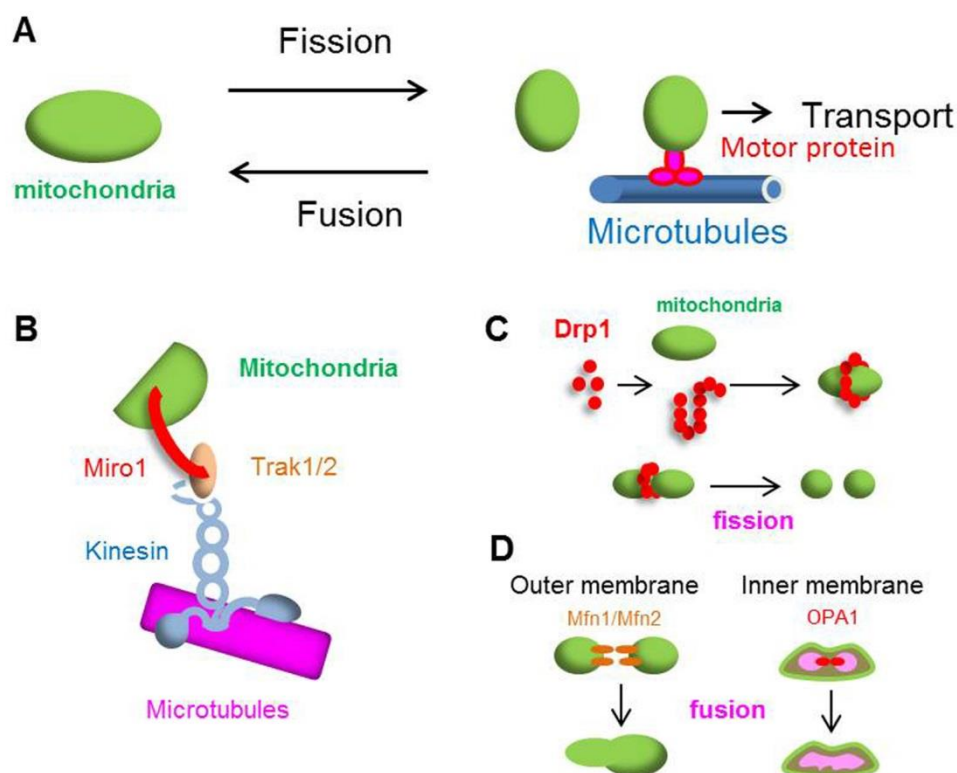


Fig. 1-5 ミトコンドリアの形態および細胞内局在の制御に関わる因子 (A) 主にミトコンドリアの分裂、融合、輸送により制御される。(B) Miro1、Trak1/2 は輸送に関わる。(C) Drp1 は分裂に関わる。(D) Mfn1/2、OPA1 はそれぞれ外膜、内膜の融合に関わる。

生物は常に変化する外界の環境に適応するためにミトコンドリアを中心とした酸素を使う好気呼吸のみならず、解糖系依存である嫌気呼吸など、エネルギー生産の多重システムを発達させている。例えば、神経細胞の軸索輸送の一部は解糖系依存的にエネルギー供給を受け、解糖系の酵素である GAPDH が輸送小胞と相互作用することが報告されている (Zala et al., 2013)。さらに近年、クレアチンシャトルシステムが神経伝達やオートファゴソームの形成など様々な生理反応に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある (Linton et al., 2010; Shin et al., 2007; Kuiper et al., 2008)。クレアチンシャトルはクレアチン (Cr)

を介した一連の化学反応系である(Fig. 1-6; Andres et al., 2008)。クレアチン輸送体により細胞内に取り込まれたクレアチンは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化で生産される ATP を用いてリン酸化され、クレアチンリン酸になる (PCr)。この反応を仲介するのがミトコンドリアに局在するクレアチンキナーゼ (CK_{mito})である。クレアチンリン酸は細胞内で分散し、局所的に ADP 量が増加すると、クレアチンリン酸のリン酸基が ADP に付与されることで ATP が生産される。この反応を仲介するのが細胞質に局在するクレアチンキナーゼ (CK_{cyto})である。

プルキンエ細胞は、エネルギー低下や細胞死をもたらす虚血に弱いことが知られている (Horn and Schlote, 1992)。しかしながら、一過的な弱い酸素不足状態に対応するために複数のエネルギー代謝機構が備わっていることが示唆されているがその機構については不明な点が多い。

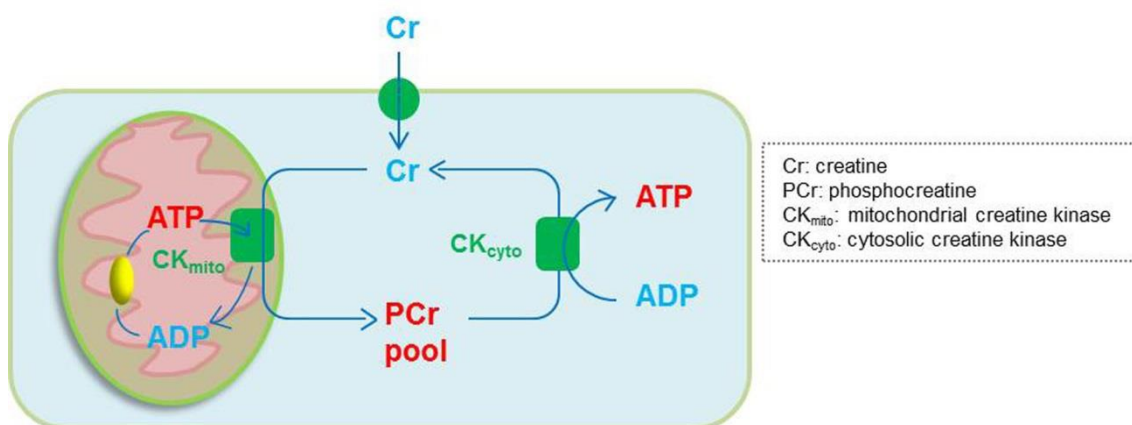


Fig. 1-6 クレアチンシャトルの機構 細胞内に取り込まれたクレアチン (Cr) はミトコンドリアでクレアチンリン酸 (PCr) に変換されて細胞内に分散する。その後、ATPが必要とされる場所でクレアチンキナーゼ (CK) の作用でクレアチンリン酸から ADP にリン酸基が付与される。

本研究ではプルキンエ細胞樹状突起発生を支えるエネルギーシステムを明らかにするために、まず樹状突起に局在する局所ミトコンドリアの生理的意義を検証した。また、ミトコンドリア以外のエネルギー生産システムである解糖系とクレアチンシャトルシステムの樹状突起伸長への寄与を検証した。その結果、樹状突起ミトコンドリアとクレアチンシャトルシステムが相互作用的にアクチン代謝を制御することで突起伸長が促進されることが強く示唆された。

第二章 結果

小脳プルキンエ細胞樹状突起におけるミトコンドリアの局在と輸送

神経細胞は形態形成だけでなく、神経伝達や活動電位の維持などに多くのエネルギーを必要としている。それゆえ虚血などで引き起こされるエネルギー低下に過敏性を示す。ミトコンドリアは、軸索末端、スパイン、ランビエ絞輪などに局在しやすい傾向があり、ミトコンドリアの配置とそこでの局所エネルギー供給がスパイン形成や神経伝達に重要な役割を果たしていることが明らかにありつつある (Li et al., 2004; Hollenbeck and Saxton, 2005)。しかしながら、際だって複雑な樹状突起構造をもつ小脳プルキンエ細胞において、ミトコンドリアの配置やその生理的意義についてはほとんど明らかではなかった。そこでまず、プルキンエ細胞樹状突起におけるミトコンドリアの配置を詳細に調べるために、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus; AAV)を用いてミトコンドリアマーカである Mito-EGFP (cytochrome c oxidase のミトコンドリア移行シグナルを EGFP に融合; Rizzuto et al., 1995)をプルキンエ細胞に発現させるとともに、プルキンエ細胞の形態を可視化するために tdTomato をプルキンエ細胞に発現、あるいはプルキンエ細胞マーカである anti-Calbindin 抗体で免疫染色を行った。その結果、*in vivo*、*in vitro* ともにミトコンドリアが突起の先端部まで局在し、特に分岐点に多く局在しやすい傾向があることが分かった (Fig. 2-1 A,B)。また海馬錐体神経細胞樹状突起におけるミトコンドリアの局在も比較のために観察を行った (Fig. 2-2)。その結果、海馬神経細胞ではミトコンドリアが樹状突起にまばらに点在し、プルキンエ細胞と比較しても樹状突起ミトコンドリアの密度が小さいことが観察できた (Fig 2-2)。

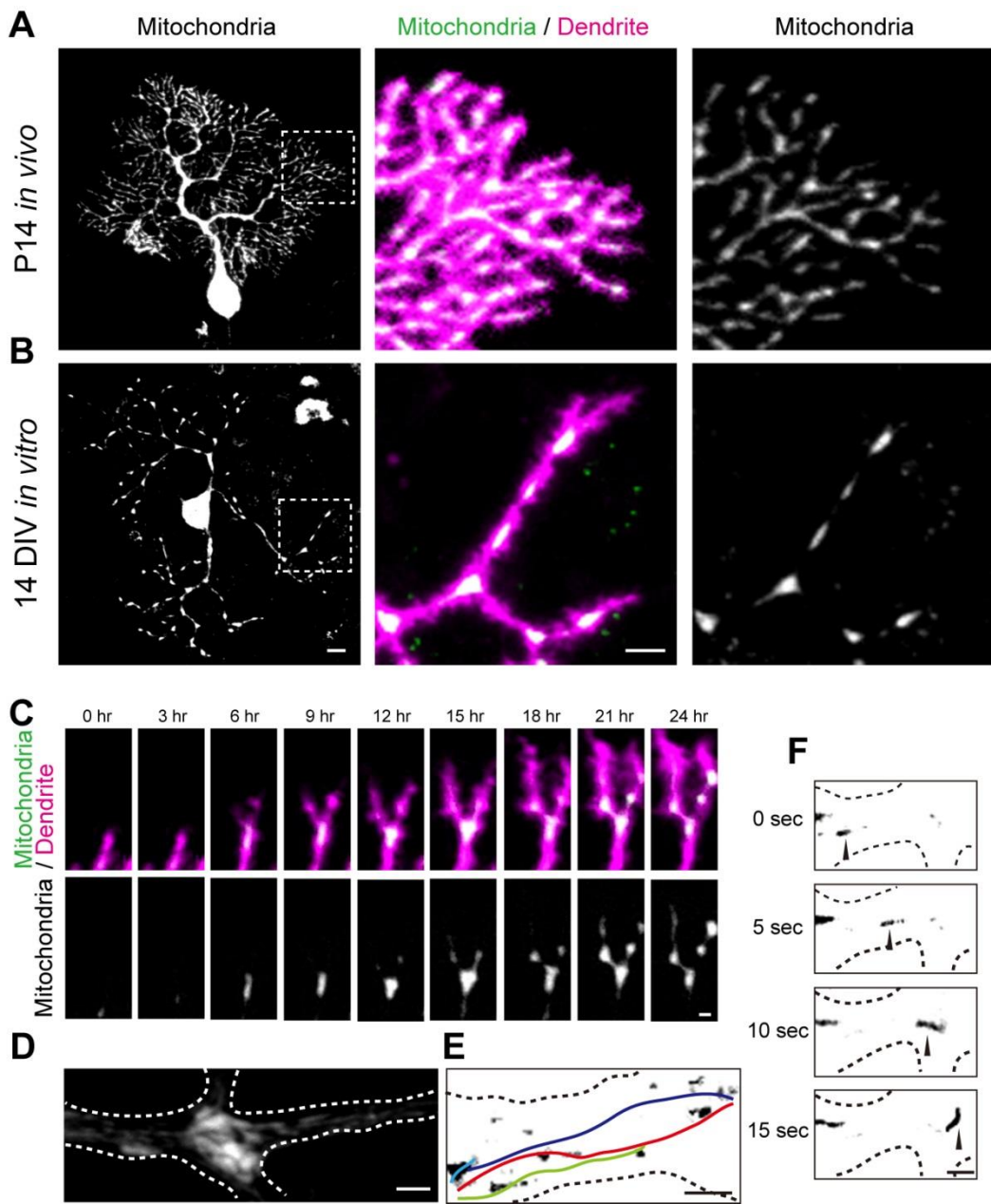
次にプルキンエ細胞に Mito-EGFP と tdTomato を共発現させ、樹状突起伸長過程でのミトコンドリアの局在変化を経時観察した (Fig 2-1 C)。その結果、ミトコンドリアが累積している突起の先端部近傍から分岐が形成されはじめ、分岐形成後も分岐点にミトコンドリアが累積し続け、さらに新たに形成された突起先端部にミトコンドリアが蓄積していく様子が観察できた (Fig 2-1 C)。固定サ

ンプルを用いて分岐点におけるミトコンドリアの形態を高解像度で観察したところ、単一ではなく複数のミトコンドリアが分岐点に集積している様子が観察できた (Fig 2-1 D)。

個々のミトコンドリアの輸送速度は $0.1-1.4 \mu\text{m}/\text{sec}$ であると報告されている (MacAskill and Kittler, 2010)。それに比較して、プルキンエ細胞の樹状突起伸長速度は緩慢で (約 $2.0 \mu\text{m}/\text{hr}$)、3 時間間隔で撮影した局在変化は個々のミトコンドリアの動きを直接反映したものではない。そこで、樹状突起に局在する Mito-EGFP シグナルを光退色することで、高倍で短い時間間隔で細胞体から樹状突起へと輸送されるミトコンドリアの動きを可視化した (Fig 2-1 E,F)。その結果、ミトコンドリアが積極的に樹状突起へと輸送され ($0.25 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{sec}$)、一部のミトコンドリアが一時的に分岐点で停止する様子が観察できた (Fig 2-1 F)。

Fig. 2-1 プルキンエ細胞樹状突起におけるミトコンドリアの局在と輸送 (A, B) *in vitro* および *in vivo* プルキンエ細胞樹状突起におけるミトコンドリアの局在。(A) Mito-EGFP (green) および tdTomato (magenta) をプルキンエ細胞に発現させ、生後 14 日目でミトコンドリアの局在を観察した。(B) 小脳分散培養系でプルキンエ細胞に Mito-EGFP (green) を発現させた。培養 14 日目に細胞を固定、その後 Calbindin 染色 (magenta) を行い、ミトコンドリアの局在を観察した。左端の像で、ボックスで囲った領域を中央に拡大した。スケールバー: $10 \mu\text{m}$ (左端)、 $5 \mu\text{m}$ (中央)。(C) 樹状突起伸長過程でのミトコンドリアの局在。プルキンエ細胞に tdTomato (magenta) および Mito-EGFP (green) を発現させ、培養 8 日目より 3 時間間隔で樹状突起伸長過程におけるミトコンドリアの局在変化を経時観察した。スケールバー: $5 \mu\text{m}$ 。(D) 樹状突起分岐点におけるミトコンドリアの高解像度観察。Mito-EGFP を発現させたプルキンエ細胞を培養 10 日目で固定し、その後 Calbindin 染色 (点線の輪郭) を行った。スケールバー: $5 \mu\text{m}$ 。(E, F) 培養 10 日目における樹状突起へのミトコンドリア輸送の観察。(E) 140 秒間に遠位樹状突起へ輸送される個々のミトコンドリアの軌跡を示した。(F) 5 秒間隔で観察した、輸送過程のミトコンドリアの連続像。スケールバー: $5 \mu\text{m}$ 。

Fig. 2-1



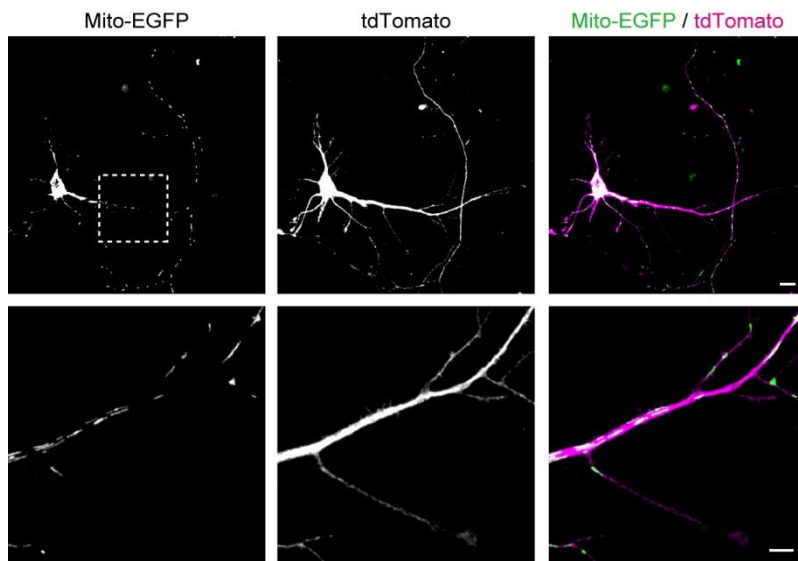


Fig. 2-2 海馬神経細胞樹状突起におけるミトコンドリアの局在 *in vitro* 海馬神経細胞におけるミトコンドリアの局在。Mito-EGFP (green)および tdTomato (magenta) を培養 3 日目に遺伝子導入し、培養 7 日目に観察を行った。上の像で、ボックスで囲った領域を下図に拡大した。スケールバー: 10 μm (上図)、5 μm (下図)。

樹状突起ミトコンドリアは局所的に樹状突起伸長を制御する

プルキンエ細胞におけるミトコンドリア局在の詳細な観察から、樹状突起ミトコンドリアが突起形成あるいは維持に関与することが示唆された。そこで、ミトコンドリアの樹状突起への輸送を阻害したときに、樹状突起形態形成にどのような影響がみられるのかを調べることにした。

Fig. 2-3

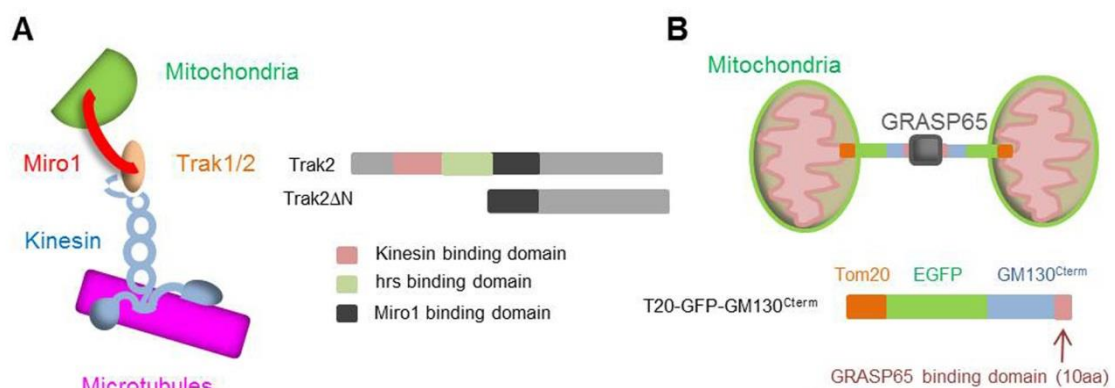


Fig. 2-3 樹状突起ミトコンドリアの局在を減少させる方法 (A) ミトコンドリアの輸送を阻害するために Miro1 と kinesin を連結するタンパクである TRAK2 の kinesin 結合ドメインおよび Hrs 結合ドメインを欠損させた変異体 (TRAK2 ΔN) を作成した。(B)ミトコンドリアの輸送を阻害ために、Tom20 (ミトコンドリアの外膜タンパク質)および GRASP65 結合ドメインである GM130 の C 末を連結させたキメラタンパク質を作成し、GRASP65 を介してミトコンドリア同士を連結させた。

ミトコンドリアとモータータンパク質である kinesin とを繋ぐアダプタータンパク質として Miro1 および TRAK1/2 が知られている (Fransson et al., 2006; Brickley et al., 2005)。近年、TRAK1 が軸索でのミトコンドリアの輸送に、一方 TRAK2 が樹状突起でのミトコンドリア輸送に関わることが報告された (van Spronsen et al., 2013)。そこで、TRAK2 のキネシン結合ドメインを欠損させた変異体 (TRAK2 ΔN)を作成し、プルキンエ細胞に過剰発現させた (Fig 2-3 A, Fig. 2-4 A-B’’)。その結果、樹状突起ミトコンドリアの局在量が減少したが、軸索におけるミトコンドリアの局在には影響を与えなかった (Fig. 2-4 B’, B’’, D)。また、TRAK2 ΔN 発現により樹状突起が矮小化した (Fig 2-4 B, E,F)。ミトコンドリアの膜間腔とマトリックス間のプロトン勾配により生じるミトコンドリアの膜電位は、ATP 生産などに必要であることから、膜電位の測定・評価はミトコンドリアの機能変化を知る上で重要な指標となる。ミトコンドリア膜電位の指示薬である TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester)の蛍光強度を対照細胞と TRAK2 ΔN 発現細胞で比較した結果、わずかではあるが TRAK2 ΔN の発現によりミトコンドリア膜電位の低下がみられた (Fig 2-5 A)。

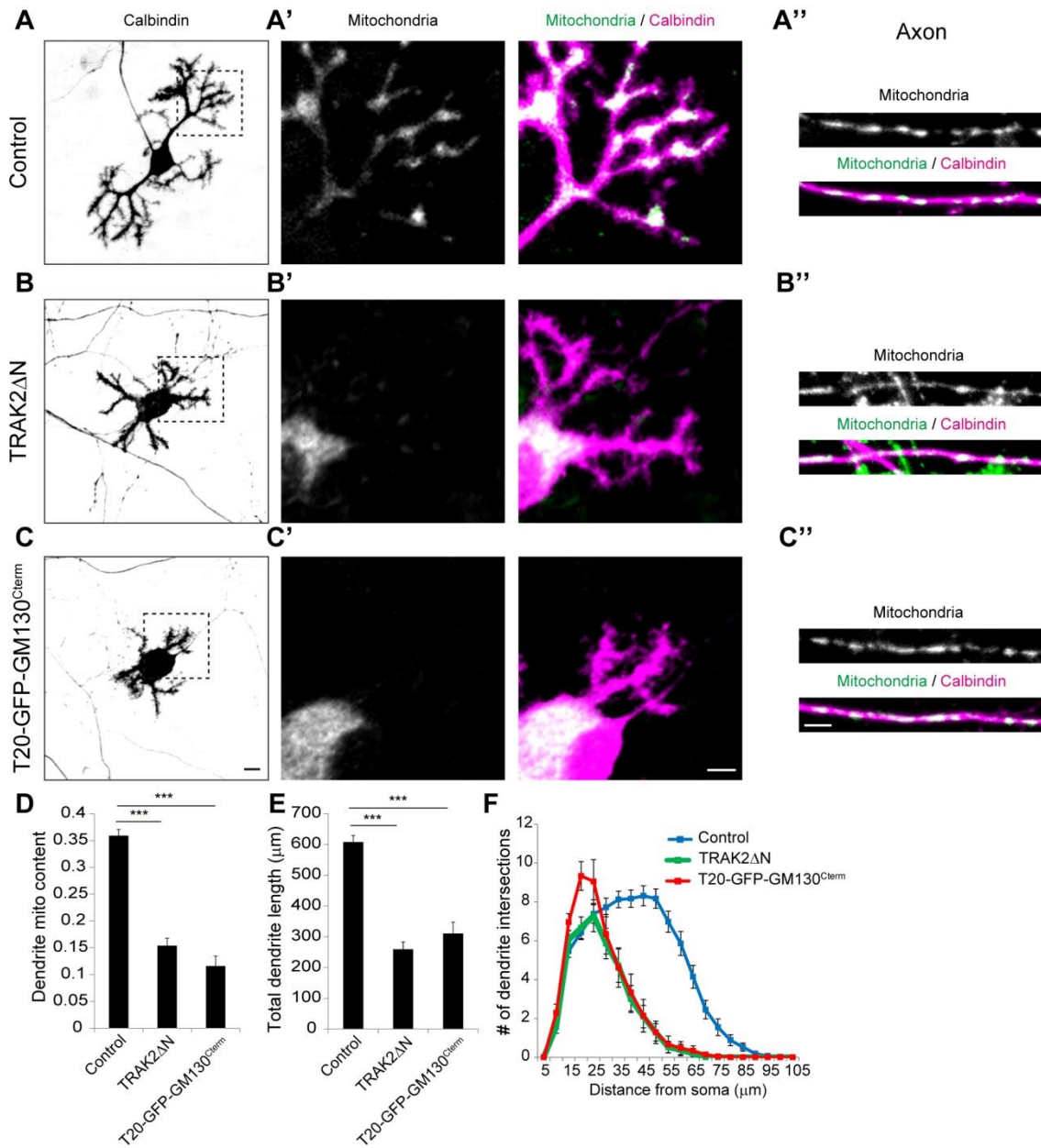
別のメカニズムで樹状突起ミトコンドリアの局在量を減少させるために、ミトコンドリア外膜タンパク質である Tom20 と細胞質に局在する GRASP65 タンパク質の結合ドメインである GM130 の C 末から構成されるキメラタンパク質 (Tom20-EGFP-GM130^{Cterm}; T20-GFP-GM130^{Cterm})に着目した (Fig 2-3 B)。このキメラタンパク質を培養細胞に発現させると、核近傍にミトコンドリア同士が架橋して凝集することが報告されている (Sengupta et al., 2009)。T20-GFP-GM130^{Cterm} をプルキンエ細胞に発現させると樹状突起ミトコンドリアの局在量が減少したものの、軸索においてはミトコンドリアの局在に変化は観察されなかった (Fig 2-4 C’, C’’,D)。また樹状突起の分岐数、全長に減少がみられた (Fig. 2-4 C,E)。

Sholl 解析の結果、T20-GFP-GM130^{Cterm} 発現は近位樹状突起の複雑性には影響を与えなかったことから、樹状突起ミトコンドリアの減少により、遠位樹状突起の形成が阻害れることで樹状突起の分岐と全長が減少することが示された (Fig. 2-4 F)。ミトコンドリアの凝縮がミトコンドリアの機能へ与える影響を検証した。その結果、T20-GFP-GM130^{Cterm} 発現はミトコンドリアの膜電位に影響を与えなかった (Fig. 2-5 A)。また、電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの詳細な形態を観察した (Fig. 2-5 B)。その結果、T20-GFP-GM130^{Cterm} 発現により核近傍にミトコンドリアの凝集がみられたが、個々のミトコンドリアの大きさやクリステなどの内部構造は対照細胞と比較しても影響はみられなかった (Fig. 2-5 B)。すなわち T20-GFP-GM130^{Cterm} 発現はミトコンドリアの機能に影響を与えることなく樹状突起へのミトコンドリアの運搬を阻害することが示唆された。次に、*in vivo* における樹状突起ミトコンドリアの生理的意義を明らかにするために、子宮内電気穿孔法を用いて T20-GFP-GM130^{Cterm} をプルキンエ細胞に遺伝子導入した (Fig. 2-6 A,B)。その結果、樹状突起受容野の著しい減少が観察できた (Fig. 2-6 A,B)。さらに、樹状突起ミトコンドリアが突起伸長に関与するのはプルキンエ細胞に限られた現象であるのかを検証するために、T20-myc-GM130^{Cterm} を海馬神経細胞に発現させた (Fig. 2-7 A-D)。その結果、海馬神経細胞においても T20-myc-GM130^{Cterm} 発現は樹状突起ミトコンドリアの局在減少と樹状突起の総分岐数と全長の減少を引き起こした (Fig. 2-7 A-D)。以上の結果から、樹状突起ミトコンドリアは *in vivo*、*in vitro* 両方において樹状突起伸長に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

Fig. 2-4 ミトコンドリアが樹状突起に局在することが突起伸長に必要である。(A-A'') プルキンエ細胞のミトコンドリアを Mito-EGFP (green) でラベルするとともに、培養 10 日目でプルキンエ細胞の形態 (A)、樹状突起 (A') あるいは軸索 (A'') でのミトコンドリアの分布を観察した。細胞形態を可視化するために Calbindin 染色 (magenta) を行った。(B) プルキンエ細胞に TRAK2 Δ N を発現させると樹状突起が矮小化した。(B-B'') TRAK2 Δ N を発現させたプルキンエ細胞で細胞形態 (B)、樹状突起 (B') あるいは軸索 (B'') でのミトコンドリアの分布を観察した。(C-C'') T20-GFP-GM130^{Cterm} を発現させたプルキンエ細胞で細胞形態 (C)、樹状突起 (C') あるいは軸索 (C'') でのミトコンドリアの分布を観察した。スケールバー: 10 μ m (C)、5 μ m (C', C'')。(D-F) 培養 10 日目のプルキンエ細胞樹状突起でミトコンドリアの密度 (D)、全長 (E)、分岐点の分布 (F)を定量した。合計 20 個以上の細胞画像を取得、

解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。

Fig. 2-4



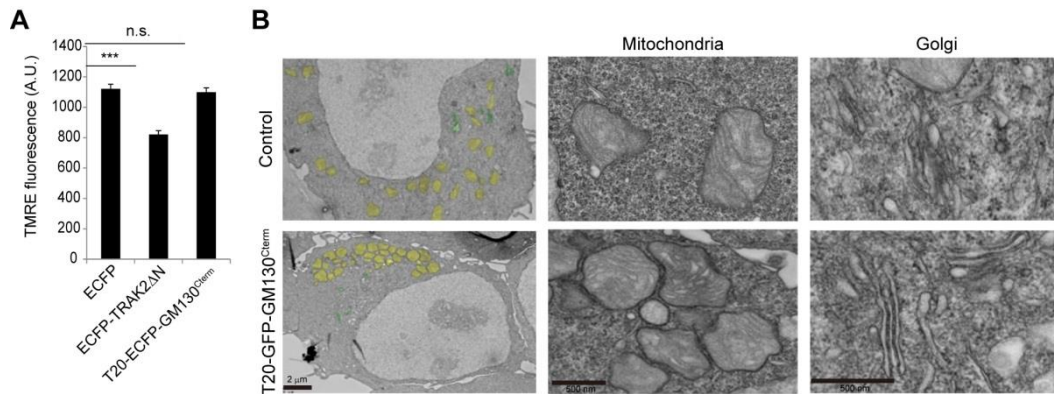


Fig. 2-5 樹状突起ミトコンドリアの局在減少がミトコンドリアの機能および形態に与える影響 (A) HEK293T 細胞に ECFP、ECFP-TRAK2 Δ N、T20-CFP-GM130^{Cterm} を発現させ、ミトコンドリアの膜電位を測定するために TMRE 蛍光強度を定量化した。合計 30 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。 (B) HEK293T 細胞に EGFP、T20-GFP-GM130^{Cterm} を発現させ、電子顕微鏡を用いてミトコンドリア (yellow) およびゴルジ体 (green) の細胞内局在および形態を観察した。左端の像で、ボックスで囲った領域を中央 (ミトコンドリア) および右端 (ゴルジ体) に拡大した。スケールバー: 2 μ m (左端)、500 nm (中央、右端)。(京都大学物質-細胞統合システム拠点の吉村安寿弥博士が撮影)

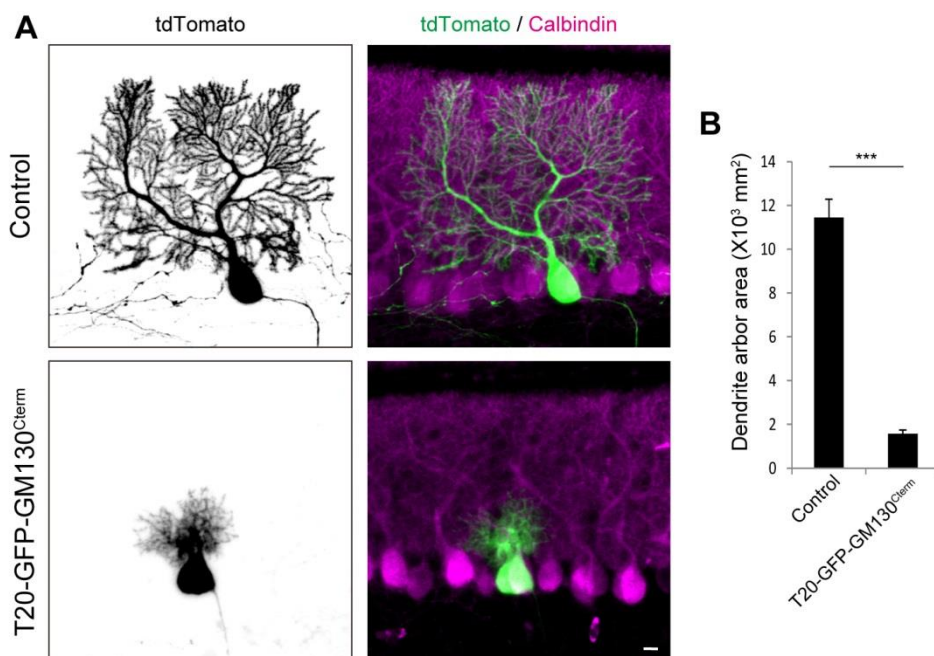


Fig. 2-6 樹状突起ミトコンドリアの局在減少は in vivo プルキンエ細胞において突起伸長を抑制する。 (A) tdTomato (green) および T20-GFP-GM130^{Cterm} を子宮内電気穿孔法で胎生 12.5 日目のマウス胚に遺伝子導入し、生後 14 日目で固定、Calbindin 染色 (magenta) を行い、樹

状突起形態を観察した。スケールバー: 10 μm 。(B) 矢状面から見た樹状突起で囲まれる分子層の領域を定量化した。合計 20 個以上の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (Student's t-test)。

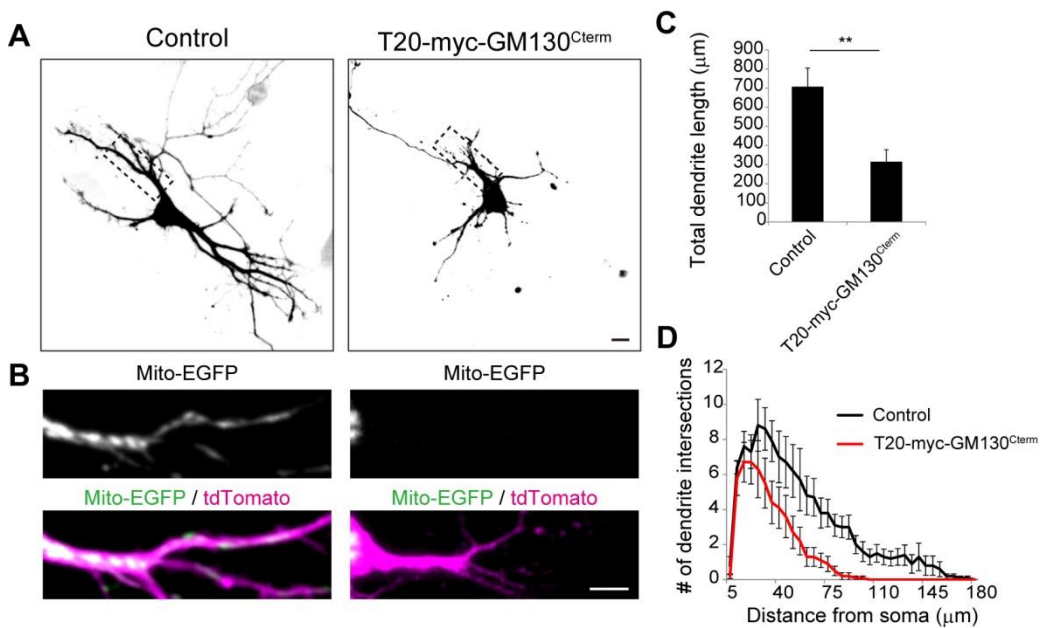


Fig. 2-7 樹状突起ミトコンドリアの局在減少は *in vitro* 海馬神経細胞において突起伸長を抑制する (A, B) 海馬神経細胞に tdTomato (magenta)、Mito-EGFP (green)、T20-myc-GM130^{Cterm} を培養 3 日目に発現させ、細胞形態 (A) および樹状突起ミトコンドリアの局在 (B) を培養 7 日目に観察した。A の像で、ボックスで囲った領域を B 図に拡大した。スケールバー: 10 μm (A)、5 μm (B)。(C, D) 培養 7 日目海馬神経細胞の樹状突起全長 (C)、樹状突起分岐点の分布 (D) を定量化した。合計 10 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。** $p < 0.01$ (Student's t-test)。

樹状突起ミトコンドリアが特異的に突起伸長を制御する

TRAK2 はミトコンドリアのみならず、 K^+ チャネルである Kir2.1、 GABA_A 受容体の B2 サブユニット、エンドソーム輸送に関わる Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) と相互作用することでそれらの輸送に関わることが知られている (Grishin et al., 2006; Beck et al., 2002; Kirk et al., 2006)。実際に GABA_A 受容体がプルキンエ細胞樹状突起形成に関わること、エンドソーム

ム輸送がショウジョウバエ *da* ニューロンの樹状突起形成に関わることが報告されている (Kawaguchi et al., 2010; Satoh et al., 2008)。このことから、TRAK2 ΔN 発現で得られた樹状突起の矮小化は必ずしも樹状突起へのミトコンドリアの輸送阻害のみならず、これら他のタンパク質輸送が阻害されたことにより引き起こされた可能性がある。そこでまず、 K^+ チャネルである Kir2.1 の細胞内局在をプルキンエ細胞で調べた結果、ほとんど発現が観察できなかった (data not shown)。このことから Kir2.1 が関与する可能性は低いと考えられた。次に、GABA_A 受容体 B2 サブユニットの細胞内局在を観察した結果、特に細胞体に強い発現が見られ、過去の知見と一致した (Fig. 2-8 A; Kelley et al., 2013)。この発現パターンは TRAK2 ΔN を発現させても変化はみられなかった (Fig. 2-8 A)。さらにエンドソームマーカーである Rab5a を用いてプルキンエ細胞樹状突起内エンドソームの局在を観察した。その結果、TRAK2 ΔN 発現によりミトコンドリアの細胞内局在は減少したが、エンドソームの局在に変化はみられなかった (Fig. 2-8 B-C)。以上のことから、TRAK2 ΔN による樹状突起の矮小化は他のタンパク質輸送への影響ではなく、樹状突起ミトコンドリアの局在減少により引き起こされたことが強く示唆された。

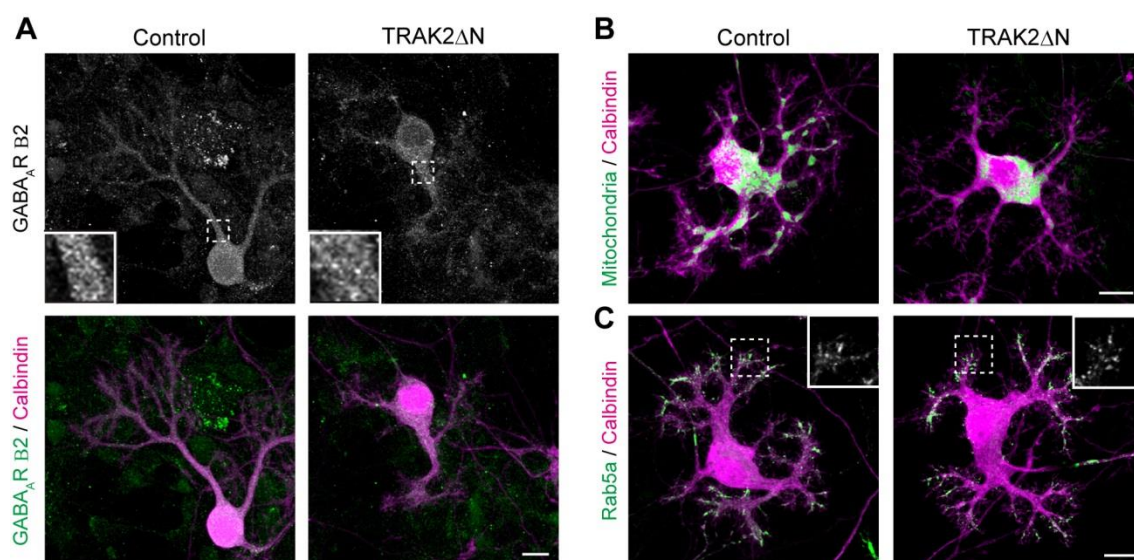


Fig. 2-8 TRAK2 ΔN のミトコンドリア以外の輸送への影響。 (A) TRAK2 ΔN 発現プルキンエ細胞での GABA_A 受容体 B2 サブユニットの局在。培養 10 日目に観察を行った。挿入図はボックスで囲った領域の拡大図。スケールバー: 10 μ m。 (B) 培養 8 日目プルキンエ細胞でのミトコンドリアの局在 (B) と Rab5a の局在 (C)。挿入部分はボックスで囲った領域の拡大図。スケールバー: 10 μ m。

近年、ゴルジ体の機能およびその細胞内局在が樹状突起形成に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。例えば、ゴルジ嚢内での小胞輸送を阻害すると突起伸長が阻害されることが示されており、また樹状突起に局在するゴルジ体である Golgi outpost が局所的に分岐形成を制御することが報告されている (Horton et al., 2005; Ye et al., 2007)。T20-GFP-GM130^{Cterm} コンストラクトの GM130^{Cterm} はゴルジ体嚢胞同士を架橋するのに必要な GRASP65 の結合ドメインである。GM130^{Cterm} を過剰発現させることによって、ゴルジ体で使われる GRASP65 が枯渇してゴルジ体の機能および細胞内局在が影響を受け、最終的に樹状突起形成に影響を与える可能性がある。そこで、GM130^{Cterm} のみを過剰発現 (mCherry-GM130^{Cterm}) およびミトコンドリアではなくペルオキシソームに移行する PEX-mCherry-GM130^{Cterm} を過剰発現させたときの、ゴルジ体の形態および樹状突起形成に与える影響を検証した。その結果、mCherry-GM130^{Cterm}、T20-myc-GM130^{Cterm}、および PEX-mCherry-GM130^{Cterm} の過剰発現はゴルジ体をわずかに分散化させた (Fig. 2-9 A)。しかしながら、mCherry-GM130^{Cterm} および PEX-mCherry-GM130^{Cterm} の過剰発現は樹状突起形態やミトコンドリアの局在に影響を与えなかった (Fig. 2-9 B-D)。一方、PEX-mCherry-GM130^{Cterm} の発現により樹状突起ペルオキシソームの局在は減少した (Fig. 2-9 E)。このことから、T20-GFP-GM130^{Cterm} はゴルジ体ではなくミトコンドリアの局在を変化させることで樹状突起伸長に影響することが強く示唆された。

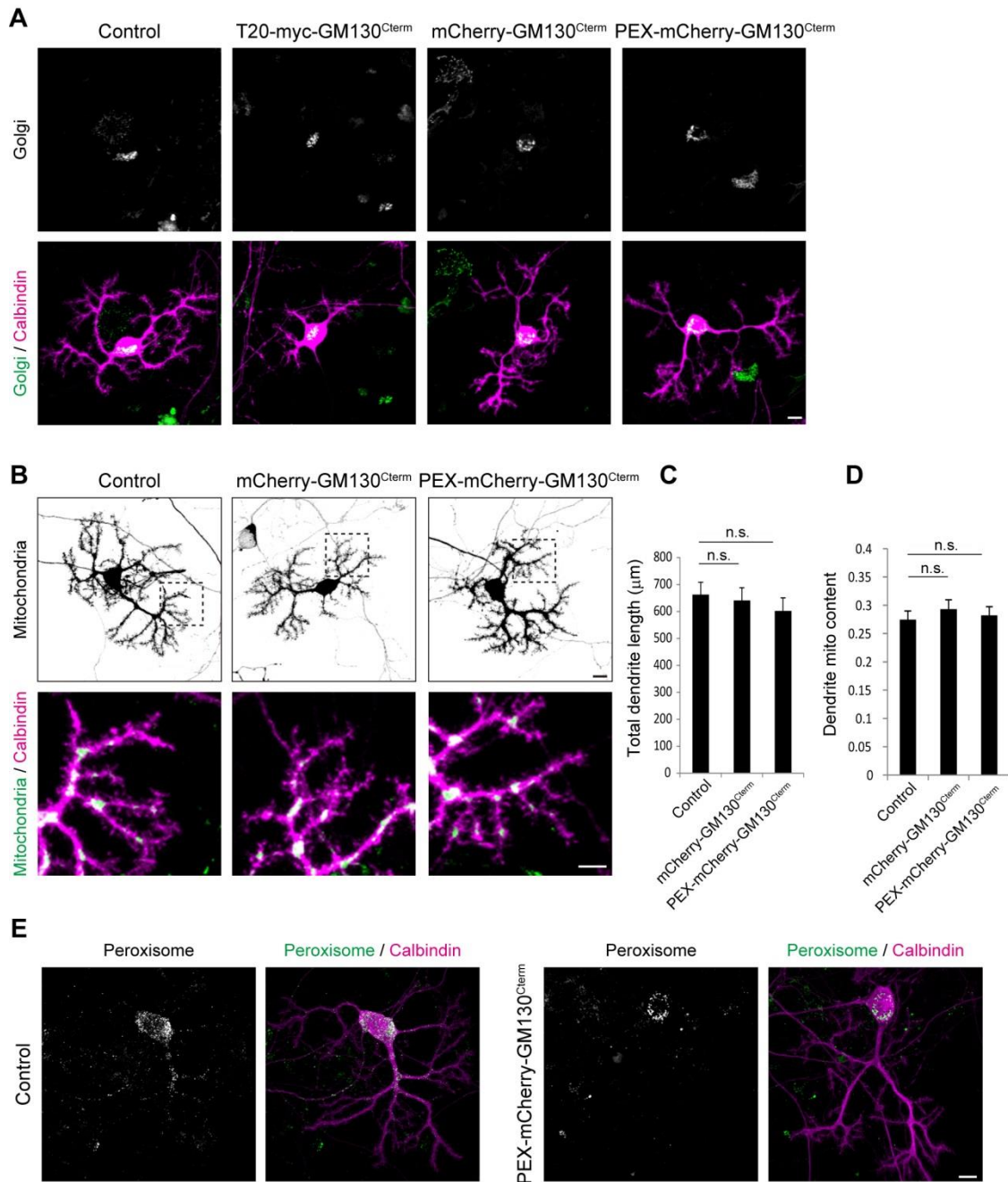


Fig. 2-9 GM130^{Cterm} がゴルジ体の局在および樹状突起形態に与える影響。 (A) T20-myc-GM130^{Cterm}、mCherry-GM130^{Cterm}、PEX-mCherry-GM130^{Cterm} 発現下でのゴルジ体 (golgi-GFP: green) の局在。培養 10 日目でプルキンエ細胞を固定し、Calbindin 染色 (magenta) を行った。スケールバー: 10 μm。 (B) mCherry-GM130^{Cterm}、PEX-mCherry-GM130^{Cterm} 発現下でのプルキンエ細胞樹状突起の形態とミトコンドリア (Mito-EGFP: green) の局在。培養 10 日目でプルキンエ細胞を固定し、Calbindin 染色 (magenta) を行った。スケールバー: 10 μm (上図)、5 μm (下図)。 (C、D) 樹状突起全長 (C) と樹状突起ミトコンドリア密度 (D) を定量化した。合計 20 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示し

た。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。 (E) PEX-mCherry-GM130^{Cterm} 発現下でのペルオキシソーム (EGFP-peroxi: green)の局在。培養 10 日目でプルキンエ細胞を固定し、Calbindin 染色 (magenta)を行った。スケールバー: 10 μm 。

樹状突起ミトコンドリアは Ca^{2+} 濃度の制御ではなく ATP 供給を制御する

ミトコンドリアは ATP 生産のみならず、細胞内 Ca^{2+} 濃度の制御や細胞死の誘導などさまざまな機能を持っている。これまでにショウジョウバエ神経細胞において、モータータンパク質である kinesin とミトコンドリアを連結するアダプタータンパク質として知られている dMiro や Milton の変異により軸索末端でミトコンドリアの局在が減少し、 Ca^{2+} 制御が働かなくなった結果、神経伝達に異常をきたすことが報告されている (Guo et al., 2005; Stowers et al., 2002)。一方、ショウジョウバエの神経筋接合部において、軸索末端でのミトコンドリアの配置がカルシウムの制御よりむしろ ATP の供給に関与すると主張する報告もある (Verstreken et al., 2005)。そこでまず、樹状突起ミトコンドリアが Ca^{2+} 制御に関わる可能性を検証することにした。ミトコンドリアによる Ca^{2+} 制御もミトコンドリア膜電位依存的に行われ、ミトコンドリアの膜電位低下により細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇することが報告されている (Hacker and Medler, 2008)。このことから、BAPTA-AM を用いて細胞内 Ca^{2+} をキレートするか、 Ca^{2+} の主要な流入経路である電位依存性 Ca^{2+} チャネル (この場合 P、Q、L、N、T 型すべて)または細胞内で Ca^{2+} を貯蔵する小胞の Ca^{2+} チャネル (この場合リアノジン受容体と IP_3 受容体)を阻害したときに、T20-GFP-GM130^{Cterm} 発現による表現型から回復がみられるかを観察した。しかしながら、いずれの処理でも T20-GFP-GM130^{Cterm} により引き起こされる突起の矮小化に回復はみられなかった (Fig. 2-10)。

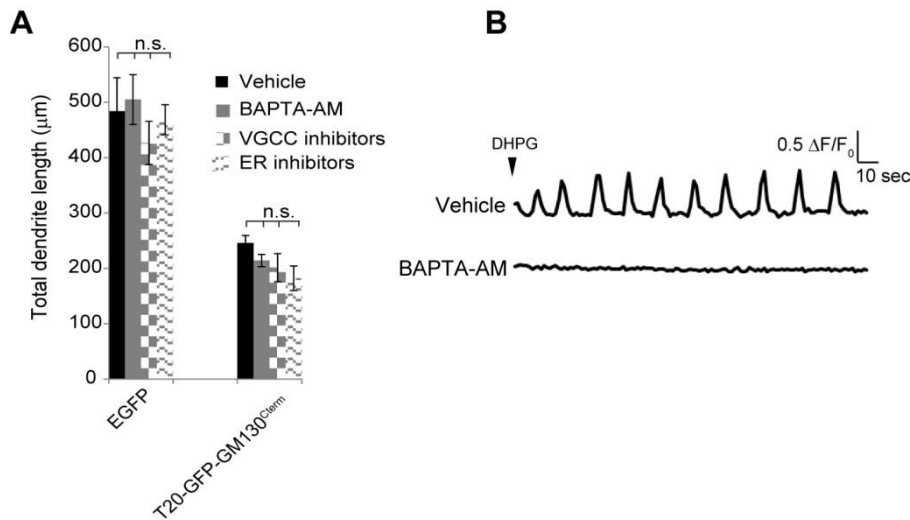


Fig. 2-10 Ca^{2+} キレートによって T20-GFP-GM130^{CTerm}発現で引き起こされる樹状突起の矮小化が回復しない。(A) T20-GFP-GM130^{CTerm}を発現させたプルキンエ細胞に 10 μM BAPTA-AM、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害剤 (10 μM nifedipine、1 μM ω -conotoxin-GVIA、2 μM mibefradil、100 nM ω -agatoxin-IVA)、ER Ca^{2+} 放出阻害剤 (10 μM dantrolene、10 μM 2-APB)を培養 8 日目より処理し、培養 10 日目まで固定、樹状突起の全長を定量化した。合計 10 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。(B) GCaMP3 を発現させた培養 10 日目のプルキンエ細胞に、30 分間 10 μM BAPTA-AM 処理を行った。10 μM DHPG で細胞を刺激後、1 秒間隔で 2 分間 Ca^{2+} 発火を観察した。BAPTA 処理は Ca^{2+} 発火を抑制した。

次に、樹状突起ミトコンドリアが ATP 供給に関わる可能性を検証するため、クレアチンシャトルシステムに着目した。クレアチンシャトルシステムは前述のようにエネルギー供給システムとして働き、低酸素条件下で引き起こされる ATP 低下を抑制する作用があることが報告されている (Fig. 1-6; Willken et al., 2000)。そこで培養プルキンエ細胞を高濃度のクレアチンで処理し、クレアチンシャトルを活性化させた際の樹状突起発達への影響を解析した。その結果、対照細胞にクレアチンを処理しても突起伸長に影響はみられなかった (Fig. 2-11 A,B,H)。一方、TRAK2 ΔN および T20-GFP-GM130^{CTerm} 発現細胞にクレアチンを処理すると、突起伸長に顕著な回復がみられた (Fig. 2-11 C-F,H)。興味深いことに、樹状突起内ミトコンドリアの局在は回復しなかったにも関わらず、樹状突起伸長に回復が観察された (Fig. 2-11 G,H)。一方、プルキンエ細胞にシクロクレアチン (CyCr)を処理してクレアチンシャトルを阻害した影響を解析した。シク

ロクレアチンはクレアチンと似た化合物であり、ミトコンドリアクレアチンキナーゼ (CK_{mito})によりリン酸化されてシクロクレアチンリン酸 (PCyCr)に変換されるが、PCyCrは非常に安定な化合物であるためにATPに変換されない (Fig. 2-11 I)。シクロクレアチン処理の結果、樹状突起は顕著に矮小化した (Fig. 2-11 J,K)。以上の結果から、樹状突起ミトコンドリアは Ca^{2+} の制御ではなくATPの供給源としての機能により、樹状突起発達を促進することが明らかになった。さらに、クレアチンシャトルシステム自体が樹状突起形成に関わる可能性が示唆された。

Fig. 2-11

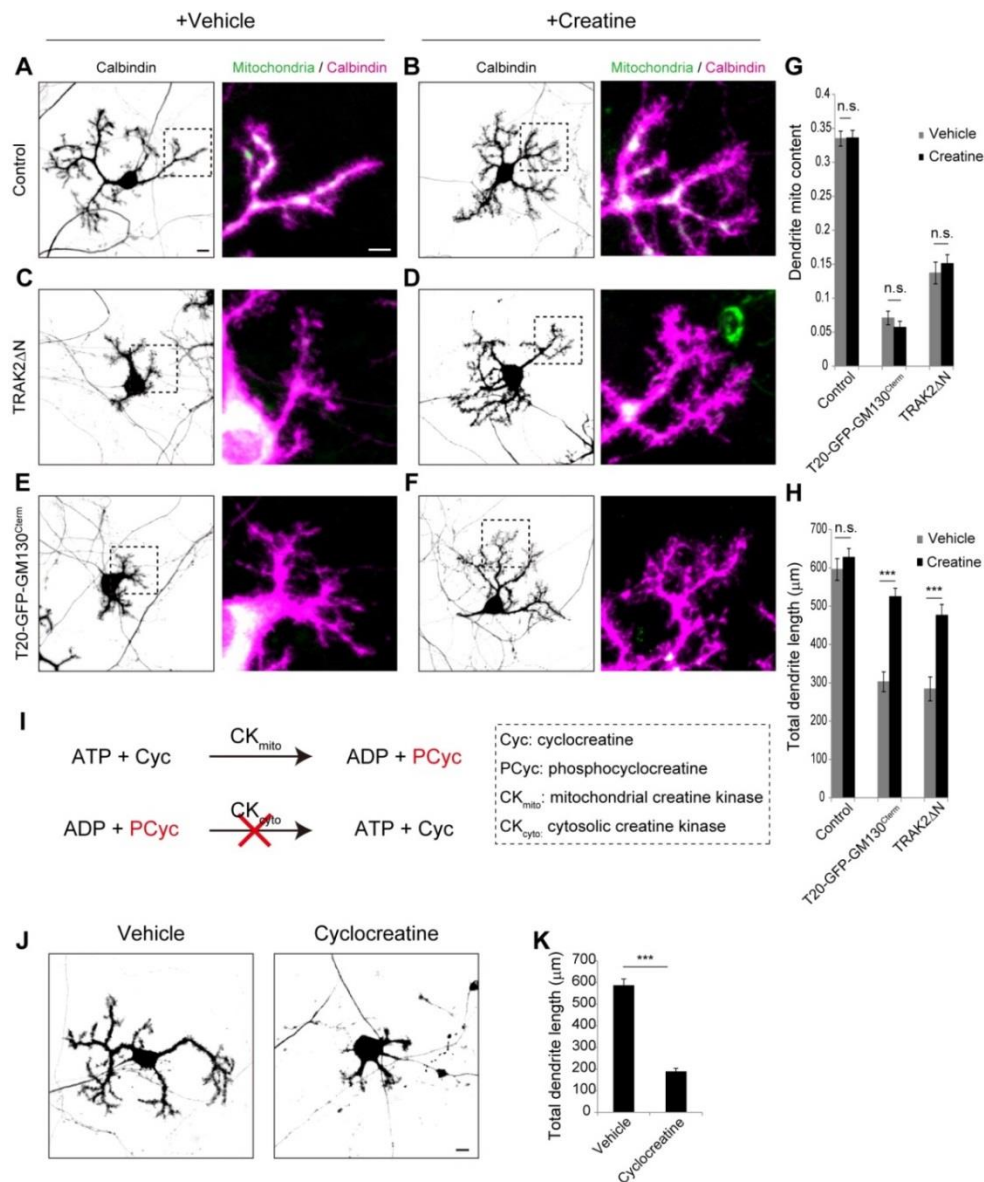


Fig. 2-11 クレアチンによって樹状突起ミトコンドリア欠損で引き起こされる樹状突起の矮小化が回復する。(A-H) TRAK2 Δ N (C, D)および T20-GFP-GM130^{Cterm} (E, F)をプルキンエ細胞に発現させ、培養 7 日目より 20 mM クレアチンを処理した (B, D, F)。培養 10 日目で細胞を固定、Calbindin 染色後、樹状突起の形態 (magenta)とミトコンドリアの局在 (green)を観察した。スケールバー: 10 μ m (左図)、5 μ m (右図)。(G, H) 樹状突起ミトコンドリアの密度 (G)と樹状突起の全長 (H)を定量化した。合計 20 個以上の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。(I) シクロクレアチンの作用メカニズム。シクロクレアチンリン酸は非常に安定な化合物であるので、ADP にリン酸基を受け渡すことができない。(J, K) 培養 8 日目よりプルキンエ細胞に 5 mM シクロクレアチンを処理し、培養 10 日目に固定、Calbindin 染色を行った。スケールバー: 10 μ m。(K) 樹状突起の全長を定量化した。合計 30 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (Student's t-test)。

クレアチンシャトルシステムは樹状突起発達を制御する

細胞内で必要とされるエネルギーの大部分はミトコンドリアを中心とした好気呼吸により生産される。しかしながら、癌細胞などにおいては好気呼吸よりも解糖系を中心とする嫌気呼吸によりエネルギーが生産される (Masson and Ratcliffe, 2014)。近年、内皮細胞の突起伸展には酸化的リン酸化よりもむしろ解糖系からエネルギー供給を受けていることが報告されている (Bock et al., 2013)。また、神経細胞の軸索輸送の一部は解糖系依存的であることが報告されている (Zala et al., 2013)。そこで、解糖系によるエネルギー生産が樹状突起伸長に及ぼす影響を調べるために、解糖系の阻害剤である 2DG (2-Deoxy-D-glucose)をプルキンエ細胞に処理した。その結果、解糖系の阻害は突起伸長に影響を与えないことが分かった (Fig. 2-12 A,B)。この結果より、プルキンエ細胞樹状突起形成は解糖系非依存的であることが示唆された。

クレアチンシャトルシステムの突起伸長への関与を詳細に調べるために、クレアチンキナーゼの選択的阻害剤として知られている FDNB (1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene)をプルキンエ細胞に処理した。その結果、樹状突起の矮小化が観察された (Fig. 2-12 A,B)。クレアチンキナーゼのアイソフォームとして主に脳に発現している脳型 (CK-B)と、主に筋肉に発現している筋肉型

(CK-M)の2種類が知られている。プルキンエ細胞には2種類のクレアチンキナーゼの両方が発現していることが知られており、実際にそれぞれの抗体を用いて免疫染色を行った結果、プルキンエ細胞に強い局在が認められた (Fig. 2-12 C,D, Allen Brain Atlas)。

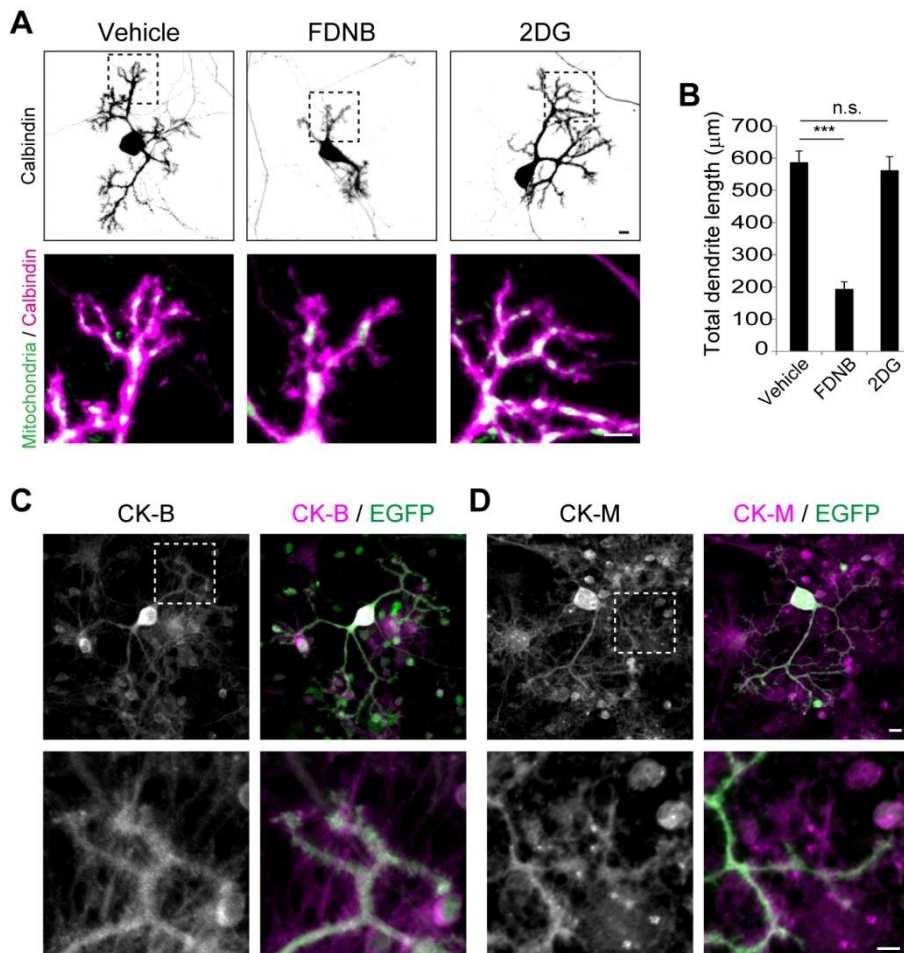
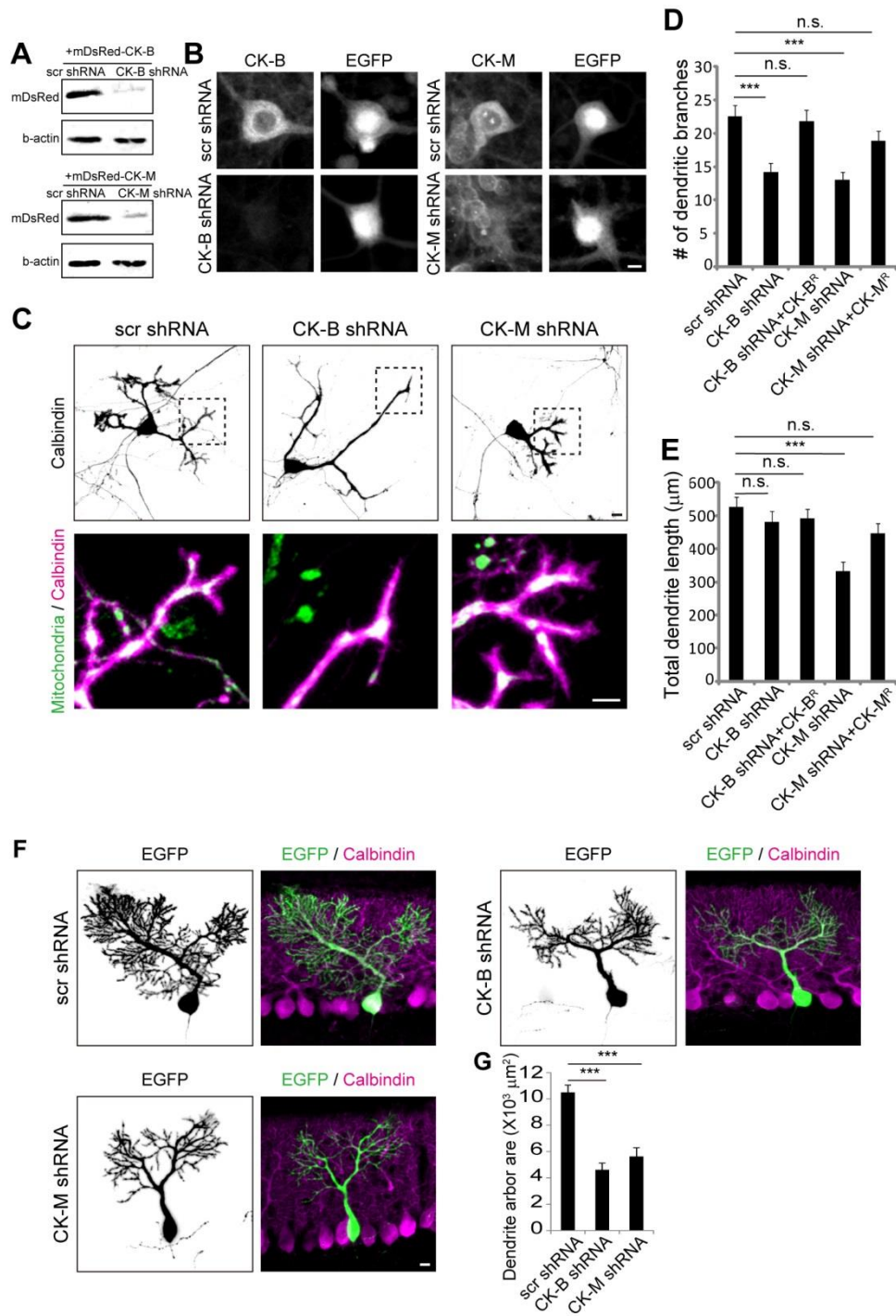


Fig. 2-12 クレアチンキナーゼの局在と作用。(A、B) Mito-EGFP を発現させたプルキンエ細胞に培養 8 日目より 5 μM FDNB あるいは 10 mM 2DG を処理し、培養 10 日目で固定、Calbindin 染色を行い、樹状突起形態 (magenta)およびミトコンドリアの局在 (green)を観察した。スケールバー: 10 μm (上図)、5 μm (下図)。(B) 樹状突起の全長を定量化した。合計 20 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。(C、D) EGFP を発現させたプルキンエ細胞を培養 10 日目で固定、anti-CK-B 抗体 (C)および anti-CK-M 抗体 (D)で抗体染色を行った。スケールバー: 10 μm (上図)、5 μm (下図)。

クレアチンキナーゼの樹状突起形成への関与を調べるために、shRNA (short-hairpin RNA)を用いてクレアチンキナーゼの発現を抑制した。その結果、shRNAにより細胞内在性・外在性両方のクレアチンキナーゼの発現が抑制された (Fig. 2-13 A,B)。CK-Bの発現抑制下では、意外なことに樹状突起の全長は変わらなかったが、分岐数は減少した (Fig. 2-13 C-E)。一方、CK-Mの発現抑制下では樹状突起総突起数、全長とも有意な減少がみられた (Fig. 2-13 C-E)。また、CK-B、CK-M両方の発現を抑制するとさらに強い樹状突起発達の阻害が観察された (data not shown)。さらに子宮内電気穿孔法を用いて *in vivo* プルキンエ細胞でクレアチンキナーゼの発現を抑制した。その結果、CK-B、CK-Mそれぞれの発現抑制下では樹状突起受容野の減少が観察され、特に近位樹状突起の複雑性に減少がみられた (Fig. 2-13 F,G)。以上の結果から、*in vitro*、*in vivo* 両方においてクレアチンキナーゼが樹状突起形成に関与することが強く示唆された。

Fig. 2-13 クレアチンキナーゼが樹状突起伸長を制御する。(A) mDsRed-CK-BあるいはmDsRed-CK-Mを発現するHEK293T細胞にそれぞれのshRNAベクターを発現させた。anti-DsRedおよびanti-B-actin抗体を用いてウエスタンブローディングを行い、CK-BあるいはCK-Mの発現抑制を確認した。(B) それぞれのshRNAをプルキンエ細胞に発現させ、培養10日目で固定、anti-CK-Bあるいはanti-CK-M抗体で抗体染色を行い、内在性クレアチンキナーゼの発現抑制を確認した。(C-E) プルキンエ細胞にそれぞれのshRNAを発現させると共に、shRNA耐性変異体(CK-B^RあるいはCK-M^R)を発現させた。培養10日目で細胞を固定、Calbindin染色を行い、樹状突起形態(magenta)とミトコンドリアの局在(green)を観察した。スケールバー: 10 μm(上図)、5 μm(下図)。(D、E) 樹状突起の分岐数(D)と全長(E)を定量化した。合計20個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。(F、G) 子宮内電気穿孔法を用いてそれぞれのshRNAをプルキンエ細胞に発現させ、生後14日目で固定、Calbindin染色(magenta)を行い、樹状突起形態(green)を観察した。スケールバー: 10 μm。(G) 矢状面から見た、樹状突起で囲まれる分子層の領域を定量化した。合計19個以上の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。

Fig. 2-13



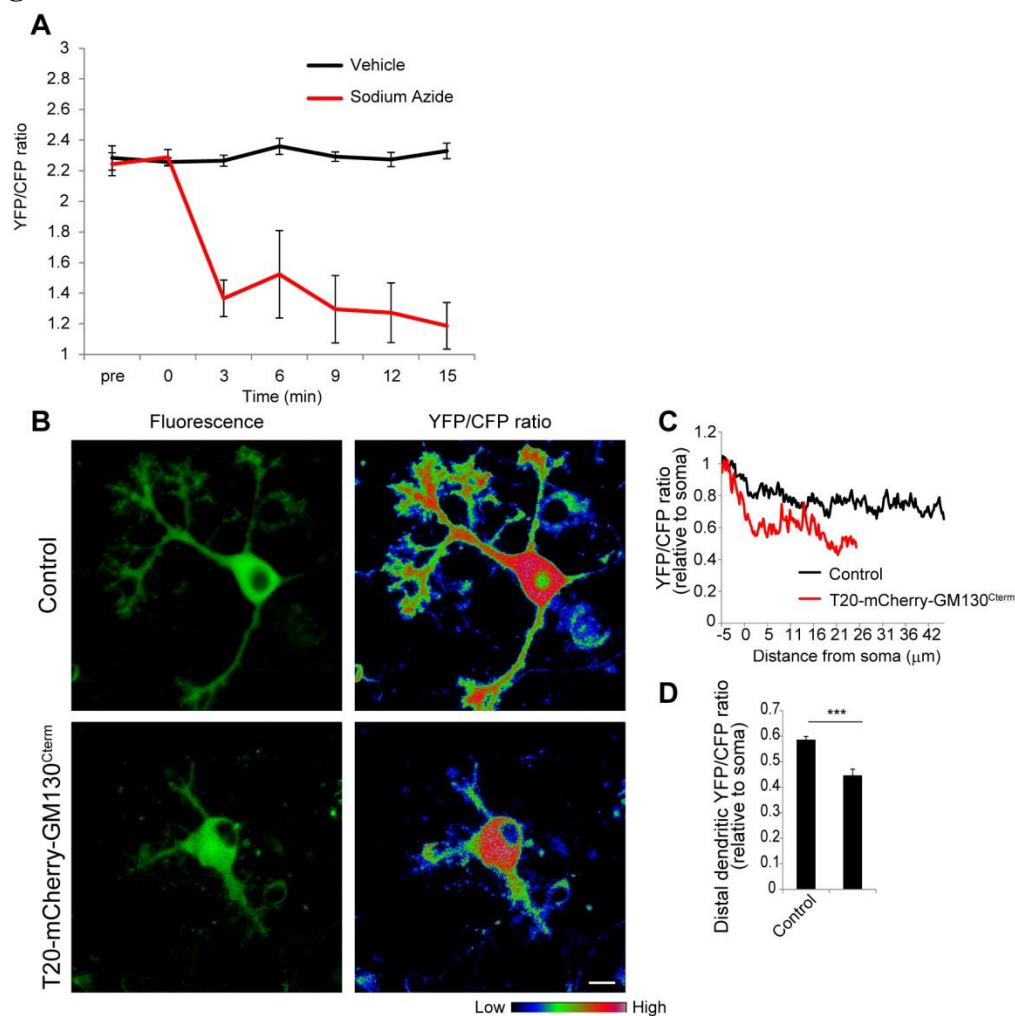
プルキンエ細胞における ATP の可視化

ここまでの結果より、樹状突起ミトコンドリアとクレアチンキナーゼが協調的に突起伸長に必要なエネルギーを供給していることが示唆された。次に、より直接的にこの可能性を検証するために、ATP センサーとして知られる ATeam を用いて細胞内 ATP 量の可視化をおこなった。FRET プローブである ATeam は蛍光タンパクである CFP と YFP の間に ATP 合成酵素の ϵ サブユニットが挿入された構造をしている。ATP が ϵ サブユニットに結合すると CFP-YFP 間の距離が近くなり、CFP 励起によって FRET (Fluorescence resonance energy transfer) が生じる (Imamura et al., 2009)。よって、YFP (FRET)/CFP 比を計算することで細胞内 ATP 量の時空間的变化が測定できる。まず、ATP 減少を検出できるのかを確認するために、酸化リン酸化の阻害剤であるアジ化ナトリウムをプルキンエ細胞に処理した前後の細胞内 ATP 量の変化を測定した。その結果、酸化リン酸化の阻害により細胞内 ATP 量の著しい低下が観察された (Fig. 2-14 A)。そこで、ATeam をプルキンエ細胞に発現させ、対照細胞と T20-mCherry-GM130^{Cterm} 発現細胞において ATP の細胞内分布の違いを検証した。その結果、対照細胞では遠位樹状突起でも高い ATP 量を測定できた (Fig. 2-14 B)。一方、T20-mCherry-GM130^{Cterm} 発現細胞においては細胞体と比較して樹状突起では ATP 量が低下していた (Fig. 2-14 B-D)。

Fig. 2-14 樹状突起ミトコンドリアは樹状突起内 ATP 量の維持に必要である。(A) 酸化リン酸化の阻害前後でのプルキンエ細胞内 ATP 量の変化を観察した。Time 0 で 5mM アジ化ナトリウムを処理し、3 分間隔で観察を行った。合計 4 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。(B-D) プルキンエ細胞に ATeam および T20-mCherry-GM130^{Cterm} を発現させ、細胞内 ATP 分布を培養 10 日目で観察した。それぞれのパネルは蛍光像 (左図) および YFP/CFP ratio 像 (右図) を示す (B)。(C) 対照細胞 (black) および T20-mCherry-GM130^{Cterm} (red) 発現細胞で、細胞体から樹状突起に沿った平均の YFP/CFP ratio のラインスキャンを行った。細胞体の YFP/CFP ratio に対して平均化を行った。(D) 対照細胞 および T20-mCherry-GM130^{Cterm} で細胞体に対する突起末端での ATP 量の比較

を行った。合計 19 個以上の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。 *** $p < 0.001$ (Student's *t* test)。

Fig. 2-14



さらに、選択的阻害剤である FDNB を用いてクレアチンキナーゼの活性を阻害した結果、細胞内 ATP 量の低下が観察された (Fig. 2-15 A,B)。以上の結果から、酸化リン酸の担い手であるミトコンドリアが局所的に樹状突起に ATP を供給するとともに、クレアチンキナーゼの活性は定常状態での細胞内 ATP 量の維持に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

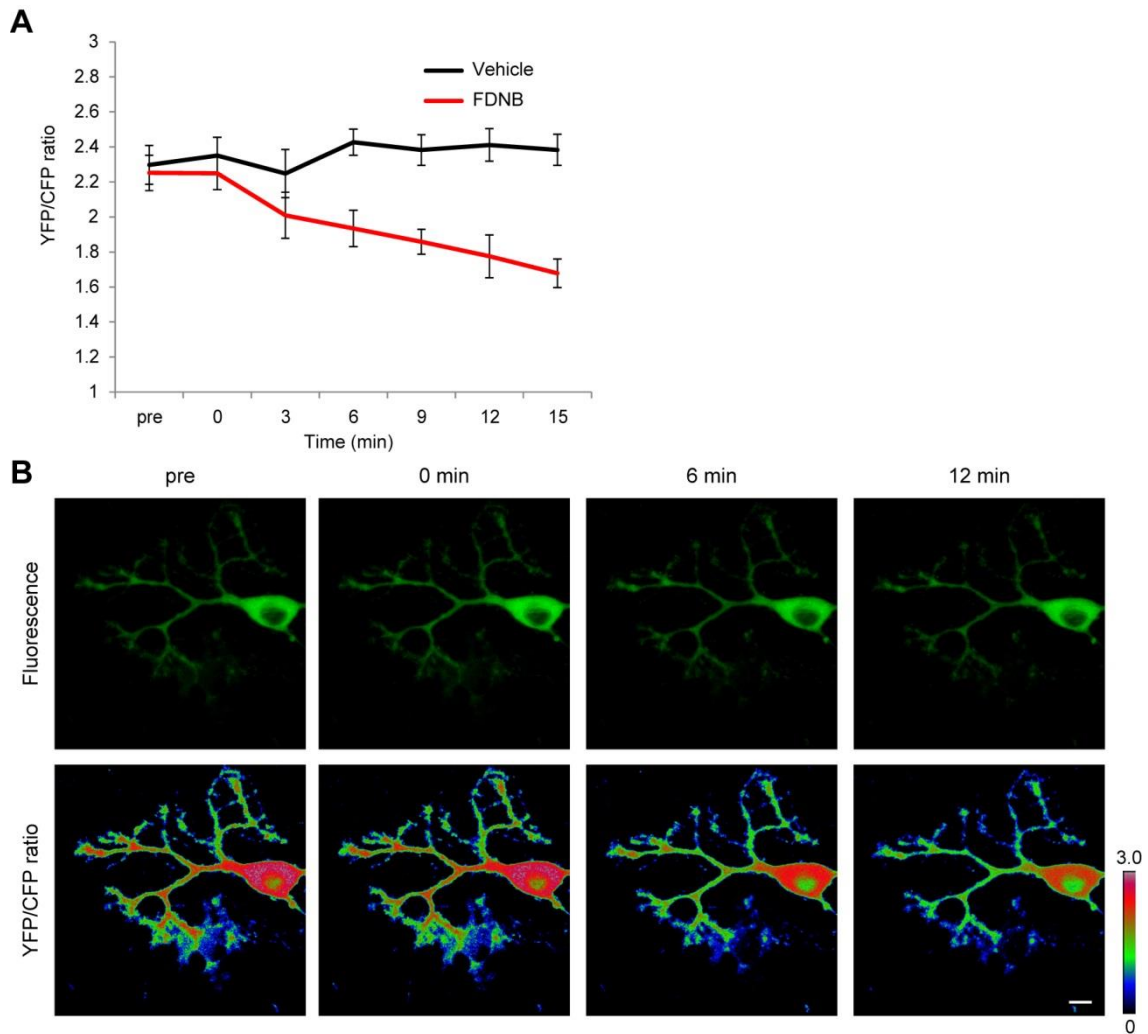


Fig. 2-15 クレアチンキナーゼの作用は樹状突起内 ATP 量の維持に必要である。(A,B)クレアチンキナーゼ活性の阻害前後でのプルキンエ細胞内 ATP 量の変化を観察した。Time 0 で 10 μ M FDNB を処理し、3 分間隔で観察を行った。合計 4 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。(B) プルキンエ細胞に FDNB を添加する前、0、6、12 分後での蛍光像 (上図)および疑似色で示した YFP/CFP ratio 像 (下図)。スケールバー: 10 μ m

樹状突起ミトコンドリアとクレアチンシャトルは相互作用的にアクチン代謝を制御する

次に、樹状突起ミトコンドリアの欠損およびクレアチンキナーゼの阻害条件下で引き起こされる ATP 量低下がなぜ樹状突起発達を抑制するのかを明らかにするために、アクチンの代謝に着目した。脳におけるエネルギーの多くはアク

チンの代謝に使われることが報告されている (Bernstein and Bamburg, 2003)。また、ATP とアクチンとの関係に関しては、低 ATP 条件下において Cofilin の凝集体 (Cofilin-rod)がみられることが報告されている (Minamide et al., 2000)。Cofilin はアクチン脱重合酵素であり、その活性は ATP 依存的に制御される (Suurna et al., 2006)。ATP 量が多い条件下では、Cofilin の脱リン酸化酵素である Chronophin (CIN)とヒートショックタンパクである Hsp90 が結合し、CIN の活性が抑制されている。一方、ATP 量が少ない条件下では CIN が Hsp90 から放出されて Cofilin を脱リン酸化することで Cofilin が活性化し、Cofilin 凝集体が形成される (Fig. 2-16; Huang et al., 2008)。

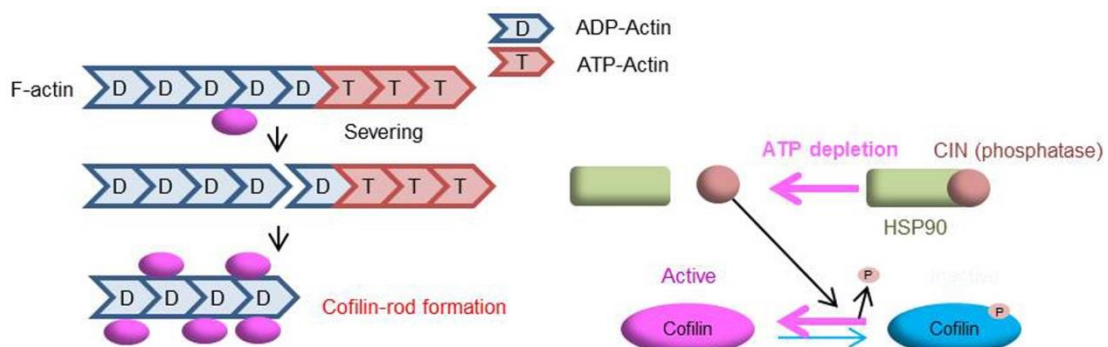
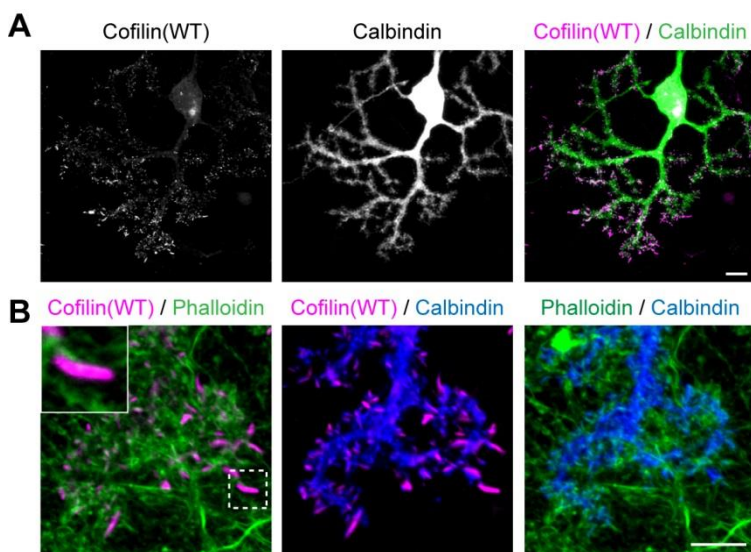


Fig. 2-16 Cofilin 凝集体形成メカニズム。細胞内 ATP 減少下では、CIN が HSP90 から放出され Cofilin を脱リン酸化する。脱リン酸化・活性化 Cofilin は ADP-actin に結合することで Cofilin 凝集体が形成される。

実際に野生型 Cofilin をプルキンエ細胞に発現させ、酸化リン酸化の阻害剤であるアジ化ナトリウムを処理して細胞内 ATP 量を低下させると、突起の先端部に多くの Cofilin 凝集体が形成された (Fig. 2-17 A,B)。

Fig. 2-17 酸化リン酸化条件下で生じる Cofilin の異常活性化。(A、B) プルキンエ細胞に Cofilin (WT)-mCherry を発現させ、培養 10 日目で酸化リン酸化阻害剤 (5mM アジ化ナトリウム、10 分間)を処理後、Calbindin 染色および 488 phalloidin 染色を行った。(A) 多くの Cofilin 凝集体 (magenta)が突起末端部に形成された。スケールバー: 10 μm 。(B) プルキンエ細胞樹状突起 (blue)において、Cofilin 凝集体 (magenta)は phalloidin (green)と共局在しなかった。挿入図はボックスで囲った領域の拡大図。スケールバー: 5 μm 。

Fig. 2-17

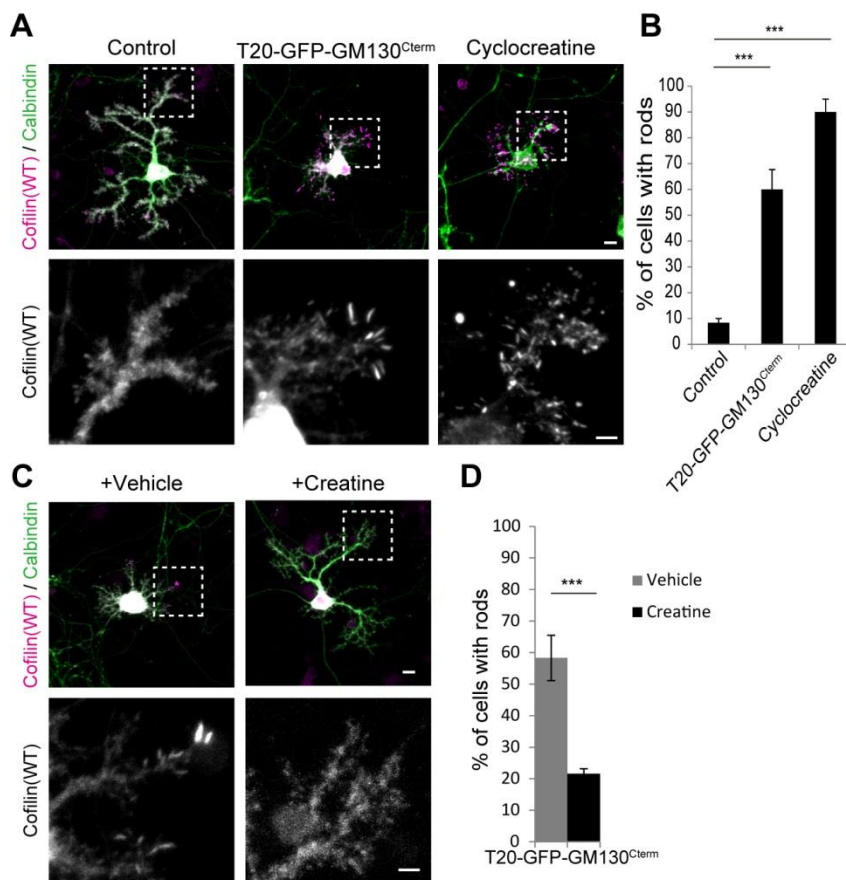


次に、樹状突起ミトコンドリアの欠損下またはクレアチンシャトル阻害条件下において Cofilin 凝集体が形成されるのかを調べるために、プルキンエ細胞に野生型 Cofilin を発現させ、それとともに T20-GFP-GM130^{Cterm} コンストラクトを共発現あるいはシクロクレアチン処理を行った。その結果、対照細胞では Cofilin 凝集体の形成はほとんどみられなかったが、T20-GFP-GM130^{Cterm} 発現下およびシクロクレアチン処理下においては樹状突起先端に多くの Cofilin 凝集体が形成されることが分かった (Fig. 2-18 A,B)。さらに T20-GFP-GM130^{Cterm} 発現細胞にクレアチンを処理すると Cofilin 凝集体の形成が抑制された (Fig. 2-18 C,D)。

Fig. 2-18 樹状突起ミトコンドリア欠損およびクレアチンシャトル阻害下で生じる Cofilin の異常活性化。(A) Cofilin(WT)-mCherry (magenta)発現プルキンエ細胞に T20-GFP-GM130^{Cterm} を共発現あるいはシクロクレアチン処理 (5mM、培養 8 日目から 10 日目まで)を行った。培養 10 日目で細胞を固定、Calbindin 染色 (green)を行い Cofilin 凝集体の形成を観察した。スケールバー: 10 μ m (上図)、5 μ m (下図)。(B) Cofilin 凝集体 (Cofilin-rod)を形成するプルキンエ細胞の割合を定量化した。それぞれの処理群に対して、独立した 3 回の実験から合計 20 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。(C) Cofilin(WT)-mCherry (magenta) および T20-GFP-GM130^{Cterm} を発現するプルキンエ細胞にクレアチン (20 mM、培養 7 日目

から培養 10 日目まで)を処理、培養 10 日目で固定、Calbindin 染色 (green)後、Cofilin 凝集体の形成を観察した。上の像で、ボックスで囲った領域を下図に拡大した。スケールバー: 10 μm (上図)、5 μm (下図)。(D) Cofilin 凝集体 (Cofilin-rod)を形成するプルキンエ細胞の割合を定量化した。独立した 3 回の実験から合計 20 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。*** $p < 0.001$ (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。

Fig. 2-18



これまでに Cofilin の 3 番目のセリン残基のリン酸化状態がその活性に関わることが報告されており、リン酸化されると Cofilin は不活性化し、一方脱リン酸化されると活性化する (Agnew et al., 1995)。Cofilin の 3 番目のセリン残基をアラニンに変換した構成的活性化変異体 (Cofilin-S3A)を作成しプルキンエ細胞に発現させると、突起の先端部位に多くの Cofilin 凝集体が形成され、樹状突起が矮小化した (Fig. 2-19 A-D)。一方、Cofilin の 3 番目のセリン残基をグルタミン酸

に置換したリン酸化模倣不活性化変異体 (Cofilin-S3E)をプルキンエ細胞に発現させると、Cofilin凝集体の形成はみられず、樹状突起形成への影響もみられなかった (Fig. 2-19 A-D)。このことから、Cofilin凝集体形成自体が突起伸長へ影響を与えることが示された。

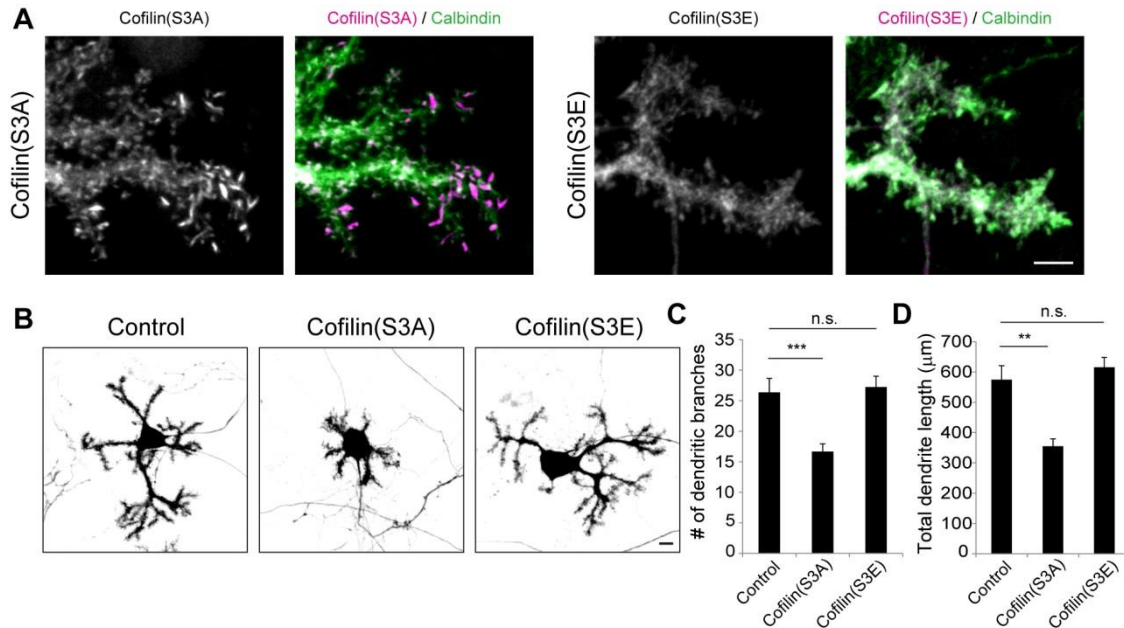


Fig. 2-19 Cofilin の異常活性化は突起伸長を抑制する。 (A) プルキンエ細胞に脱リン酸化、リン酸化模倣変異型 Cofilin (magenta)を発現させ、培養 10 日目で固定、Calbindin 染色 (green)を行い、Cofilin凝集体の形成を観察した。Cofilin-S3A 発現により多くの Cofilin凝集体が形成された。スケールバー: 5 μm。 (B) それぞれの変異型 Cofilin を発現したときに、プルキンエ細胞樹状突起形態に及ぼす影響。培養 10 日目で観察を行った。スケールバー: 10 μm。 (C、D) 樹状突起の分岐数 (C)、全長 (D)を定量化した。合計 20 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。 **p<0.01、***p<0.001 (ANOVA with Tukey's HSD post-hoc analysis)。

これまでに初期の Cofilin凝集体の形成によりアクチンの代謝が抑制されることが報告されている (Bernstein et al., 2006)。そこで、樹状突起ミトコンドリア欠損およびクレアチンシャトルシステムの障害がアクチン代謝に与える影響を検証するために GFP-actin をプルキンエ細胞に発現させ、突起先端部で GFP-actin

の FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) 解析を行った。その結果、T20-mCherry-GM130^{Cterm} 発現下およびシクロクレアチン処理下においては GFP-actin シグナルの回復が遅れることが分かった (Fig. 2-20 A,B)。さらに、構成的活性化 Cofilin (Cofilin-S3A) の強制発現下においても GFP-actin シグナルの回復が遅れることが観察できた (Fig. 2-20 B)。以上の結果より、樹状突起ミトコンドリアの欠損下およびクレアチンシャトルの機能阻害条件下では、Cofilin の活性化によって Cofilin 凝集体が形成され、最終的にアクチン代謝が低下し、樹状突起伸長が抑制されることが示唆された。

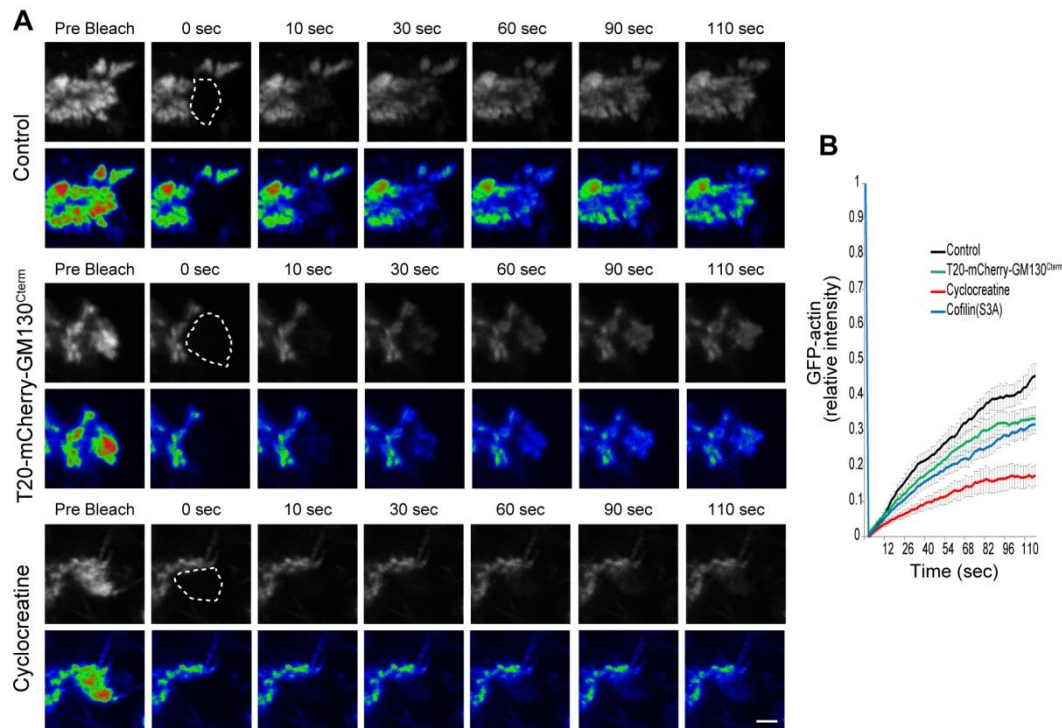


Fig. 2-20 樹状突起ミトコンドリア欠損およびクレアチンシャトル阻害下ではアクチン代謝が低下する。(A) GFP-actin を発現させたプルキンエ細胞に T20-mCherry-GM130^{Cterm} あるいは Cofilin-S3A を共発現あるいはシクロクレアチン処理 (5 mM、培養 9 日目から 10 日目まで) した。培養 10 日目で突起先端部の GFP-actin を蛍光退色後、蛍光シグナルの回復を 2 秒間隔で観察した。疑似色は GFP-actin の蛍光強度を示す。スケールバー: 2 μ m。(B) GFP-actin の蛍光シグナルの回復をグラフに示した。合計 15 個の細胞画像を取得、解析し、平均値をグラフ、標準誤差をエラーバーで示した。

第三章 考察

樹状突起伸長を支えるエネルギー代謝

脳は最もエネルギーを消費する臓器であり、その重量が体重の約2%しか占めないにもかかわらず体全体で必要とされるエネルギーの20%も消費する。脳の主要な構成要素である神経細胞はミトコンドリアで行われる好気呼吸（酸素を使う呼吸）により必要とされるエネルギーの大半を生産している。それゆえ脳は心筋梗塞などにより引き起こされる虚血に対して障害を受けやすい。しかしながら生物は日常的に引き起こされる軽い酸素不足状態に対応するためにミトコンドリアを中心としたエネルギー生産システムのみならず解糖系を中心とした嫌気呼吸（酸素を用いない呼吸）、クレアチン・アルギニンを介したエネルギーシャトルシステムなどのエネルギー生産の多重システムを発達させており、一つのシステムが機能しなくなっても他のシステムで補償しようとする。神経細胞前駆体の誕生、神経細胞への分化、目的地への細胞移動、突起伸展といった一連の神経細胞の発生過程は神経回路形成にとって非常に重要であり、それぞれの過程において必要とされるエネルギーを賄うために神経細胞がどのようなエネルギー戦略をとるのかについて近年明らかになりつつある。例えば、海馬軸索形態の維持にミトコンドリアの分岐点への配置が重要であることが報告されている (Spillane et al., 2013)。また、小脳顆粒細胞の神経新生に解糖系が関わるということが報告されている (Gershon et al., 2013)。しかしながら、樹状突起形成過程のような神経細胞の発達過程において神経細胞がどのようなエネルギー生産様式を用いて必要とされるエネルギーを供給するのかについてはほとんど明らかではなかった。本研究では、中枢神経系神経細胞の中でも際だって複雑な樹状突起形態を持つ小脳プルキンエ細胞をモデルとし、そのように複雑な分岐構造を形成・維持するために必要とされるエネルギー生産機構を明らかにすることを第一の目的とし、検証を行った。その結果、好気呼吸の中心であるミトコンドリアは樹状突起に不均一に、特に分岐点に多く局在し、その局在は樹状突起伸長に重要な役割を果たすことが明らかになった (Fig. 3-1)。また、ミトコンドリアの樹状突起への配置だけでは必要とされるエネルギーを賄うことには不十分であり、クレアチンシャトルを介したエネルギー生産と共作用するこ

とで突起形成が維持されることが明らかになった (Fig. 3-1)。さらに樹状突起へのミトコンドリアの局在減少により引き起こされるエネルギー不足はクレアチンシャトルシステムを活性化させることで補償されることを明らかにした。解糖系を阻害しても樹状突起形成に影響がみられなかったことから、樹状突起伸長は解糖系非依存的であることが示唆された。近年、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患では最終的に神経細胞のエネルギー低下・細胞死が引き起こされることが報告されている (Manczak et al., 2011)。本研究で得られた知見はエネルギー代謝疾患で引き起こされる神経変性の分子メカニズムを理解することにつながると考えられる。

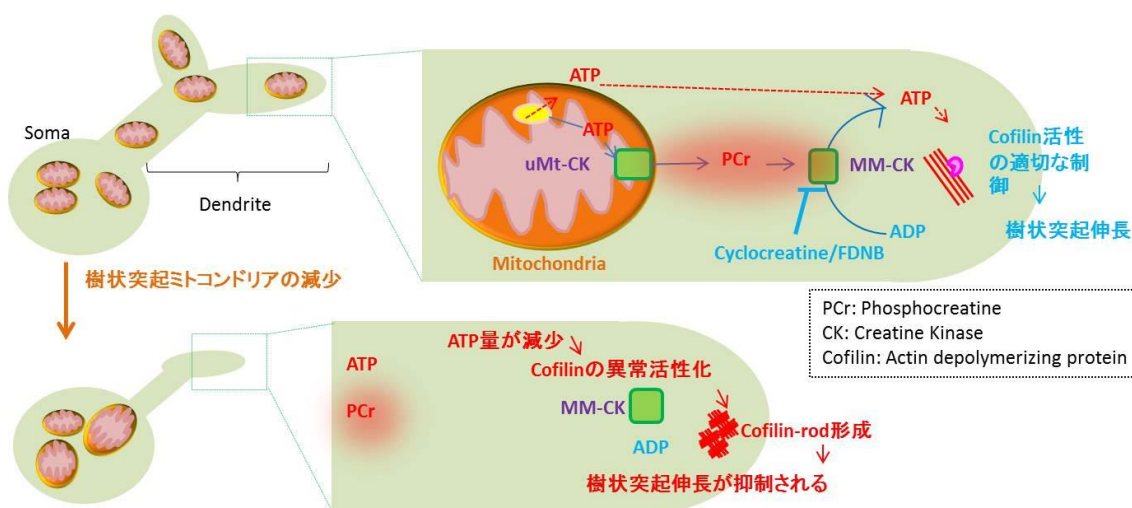


Fig. 3-1 樹状突起ミトコンドリアのクレアチンシャトルが相互作用的にアクチン代謝を制御する。詳細は本文を参照。

近年クレアチンシャトルシステムが細胞遊走や一部の神経細胞において神経伝達などの生理反応に関わることが報告されている (Kuiper et al., 2008; Linton et al., 2010)。しかしながら、これまでのクレアチンキナーゼのノックアウトマウスの解析では顕著な表現型が得られないことが報告されていることから、*in vivo*におけるクレアチンシャトルシステム的作用に関しては議論の余地がある。クレアチンキナーゼ欠損下においてミトコンドリアの電子伝達系を司るCOXなどの発現やミトコンドリアの軸索輸送が増加していることが報告されており、クレアチンキナーゼ欠損により引き起こされるエネルギー不足がミトコンドリアの活性を高めることで補償される可能性が示唆されている (Linton et al., 2010;

Kuiper et al., 2008)。本研究ではクレアチンキナーゼの活性を薬剤および RNAi によって阻害すると樹状突起形成が異常になることを *in vivo*、*in vitro* 両方において明らかにした。このことは、急速にクレアチンシャトルシステムを阻害するとうまく補償システムが働かなくなり、表現型が得られたと考えられる。

プルキンエ細胞は機能的にはほぼ同じである脳型と筋肉型の二種類のクレアチンキナーゼが発現している(Fig. 2-12)。本研究ではそれぞれのクレアチンキナーゼをノックダウンした時の表現型が異なることを明らかにしたが、どのようなメカニズムでその差異が生じるのかについては明らかではなかった。今後、それぞれのクレアチンキナーゼの細胞内局在や発現時期の詳細な解析を通して明らかにしていきたいと考えている。

アクチンの代謝による樹状突起伸長の制御

アクチンフィラメントは微小管、中間径フィラメントと並び、細胞骨格を構成するタンパク質のひとつとして数えられており、特に神経細胞において突起の成長円錐やスパインなどに豊富に含まれており、突起伸展に重要な役割を果たしていることが知られている。アクチンフィラメントは微小管と同じく極性をもっており、ATP-actin のプラス端への会合と ADP-actin のマイナス端からの解離を繰り返すことでその形態をダイナミックに変化させている。近年、重合核形成タンパク質や切断タンパク質などさまざまなアクチン結合タンパク質がアクチンフィラメントの代謝制御に関わることが明らかになりつつある。本研究では特に細胞内の ATP 量でその活性が変わるアクチン脱重合タンパク質である Cofilin に着目し、樹状突起ミトコンドリアとクレアチンシャトルシステムの欠損下において Cofilin の凝集が生じること、さらにアクチンの代謝が抑えられることを明らかにした。Cofilin はその 3 番目のセリン残基のリン酸化状態により活性が変化し、その活性化状態は突起伸展に影響を与えることが報告されている (Agnew et al., 1995)。例えば、神経細胞の突起末端では Cofilin が活性化しており、Cofilin の欠損下ではアクチンフィラメントの密度が著しく増加することで突起伸展が抑制される (Garvalov et al., 2007; Flynn et al., 2012)。このように、Cofilin の活性化はアクチンフィラメントの代謝を促進し突起伸展を促す。しか

しながら、細胞内の ATP 枯渇下では Cofilin の脱リン酸化/活性化により Cofilin の凝集体が神経突起の先端部に生じ、逆にアクチンフィラメントの代謝を抑制、微小管やオルガネラの突起先端部への輸送が阻害されることが報告されている (Minamide et al., 2000; Bernstein et al., 2006; Cichon et al., 2012)。さらに、初期の Cofilin 凝集体の形成下では神経突起末端での ATP 消費およびミトコンドリアの膜電位低下が抑制されることが報告されている (Bernstein et al., 2006)。以上のことを考え合わせると、樹状突起ミトコンドリアとクレアチンシャトルの欠損下において生じる Cofilin 凝集体の形成は突起伸展を抑制し、さらなる ATP 消費を抑えることで、少なくとも細胞死を防ごうとする生物の適応メカニズムであると考えられる。

実験手法

動物

本研究では ICR 系妊娠マウスおよび子 (日本 SLC) を用いた。動物実験の取り扱い、京都大学における動物実験等の実施に関する基本方針に従った。

試薬

本研究で用いた試薬は以下である。

クレアチン (Sigma-Aldrich)、シクロクレアチン (Sigma-Aldrich)、FDNB (1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene; Sigma-Aldrich)、2-DG (2-deoxy-D-glucose; Sigma-Aldrich)、アジ化ナトリウム (Nakalai Tesque)、BAPTA-AM (Calbiochem)、Dantrolene (Sigma-Aldrich)、2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate; Sigma-Aldrich)、nifedipine (Calbiochem)、w-agatoxin-IVA (Calbiochem)、w-conotoxin -GVIA (Peptide Institute)、mibefradil (Sigma-Aldrich)、488-phalloidin (Invitrogen)。

プラスミドの構築

pAAV-CAG-EGFP/DsRed は EGFP あるいは DsRed の配列を pAAV-CAG ベクターに組み込んだ (Kaneko et al., 2011)。pAAV-CAG-Mito-EGFP/DsRed はミトコンドリア移行シグナルを EGFP あるいは DsRed の N 末に持つように pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。pAAV-EGFP-Rab5a はマウス脳 cDNA ライブラリー由来の Rab5a cDNA の N 末に EGFP を持つように pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。ATeam1.03 は京都大学の今村博臣博士から頂き、pAAV-CAG ベクターに組み込んだ (Imamura et al., 2009)。GCaMP3 は京都大学の田川義晃博士から頂き、pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。GFP-actin および golgi-GFP の配列はそれぞれ pAcGFP1-Actin、pAcGFP1-GFP-golgi (Clontech) に由来し、pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。pAAV-CAG-T20-GFP-GM130^{Cterm} の作成にあたっては、マウス脳 cDNA ライブラリー由来の Tom20 cDNA (1-47aa)、EGFP および GM130^{Cterm} cDNA (900-999aa) を pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。T20-GFP-GM130^{Cterm} の

EGFP 配列は、pmCherry-N1 (Clontech)に由来する mCherry 配列、pECFP-C1 (Clontech)に由来する ECFP 配列、Myc epitope タグと入れ替え、それぞれ T20-mCherry-GM130^{Cterm}、 T20-ECFP-GM130^{Cterm}、 T20-myc-GM130^{Cterm} を作成した。pAAV-CAG-PEX-EGFP-GM130^{Cterm} の作成のために、T20-GFP-GM130^{Cterm} の Tom20 配列を Pex3 cDNA (1-42aa)と入れ替えた。pAAV-CAG-Lifeact-EGFP は Lifeact 配列 (酵母 Abp140p に由来する 17aa)を EGFP の N 末に持つように pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。pAAV-myc-TRAK2 ΔN は kinesin 結合ドメインを欠損させた TRAK2 の変異体 (476-913aa.; MacAskill et al., 2009b)の N 末に Myc epitope タグを持つように pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。pAAV-CAG-ECFP-Trak2 ΔN 作成のために、pAAV-myc-TRAK2 ΔN の Myc epitope タグを ECFP に入れ替えた。pAAV-Cofilin(WT)-mCherry はヒト cDNA ライブラリー由来の Cofilin(WT) cDNA の C 末に mCherry を持つように pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。Cofilin (S3A)および Cofilin (S3E)の作成にあたっては、PCR で 3 番目のセリン残基をアラインあるいはグルタミン酸に変換した。CK-B および CK-M cDNA はマウス脳 cDNA ライブラリーに由来し、それらの shRNA 耐性変異体を作成するために、shRNA の標的配列のうち 3 か所に変異を入れた。shRNA 耐性変異体の N 末に mDsRed を持つように pAAV-CAG ベクターに組み込んだ。shRNA に用いた標的配列は以下の通りである。

CK-B shRNA (5'-GAGAGTTACGACGTATTCAAG)

CK-M shRNA (5'-GAGTTCAAGGGCAAGTACTAC)

これらの標的配列は siDirect (<http://sidirect2.rnai.jp/>)を用いて作成し、ループ配列として 5'- tgtgctt、shRNA 発現ベクターとして pAAV-hH1(pAAV-CAG-EGFP の EGFP 配列の下流に pBAsi-hH1 の humanH1 プロモーターを挿入したベクター)を用いた。対照としてスクランブル shRNA (5'-GACTCGCTAGAGAACGTAGTA)を用いた。

アデノ随伴ウイルスの作成

細胞密度が 4×10^4 cells/cm² となるように 6 枚の 15 cm 培養皿に HEK293T 細胞を培養した {10% FBS を含む DMEM high glucose (Invitrogen)}。翌日、目的遺伝子を発現する AAV コンストラクト、pAAV-RC、pAAV-Helper ベクターを、

リン酸カルシウム法を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後にウイルス感染した細胞を回収し、AAV 精製キット (Virapur) を用いてウイルス精製を行い、 10^9 - 10^{10} plaque-forming unit まで濃縮を行った。

プルキンエ細胞の初代培養

生後 0 日目のマウスの脳から小脳を切り出し、神経細胞分散液 (住友ベークライト) を用いて小脳細胞を分散した。その後、分散小脳細胞をプレーティング溶液 {10% FBS を含む DMEM/F12 (Invitrogen)} に再懸濁し、poly-D-lysine (0.4 mg/ml; Sigma) コートした 35 mm ガラスボトムディッシュ (直径 35 mm; MATSUNAM) あるいはカバーガラス (直径 12 mm; MATSUNAM) に 1.5 個小脳 / 1.1 cm^2 となるようにガラス面に細胞を接着させた。1-3 時間後、メンテナンス溶液を添加し、任意の時期まで 37 °C、5% CO₂ インキュベータ内で培養した。アデノ随伴ウイルスは基本的に培養 0 日目に添加した {AAV-Cofilin(WT)-mCherry は培養 3 日目}。

メンテナンス溶液の組成は以下に示す。

メンテナンス溶液の組成 :

DMEM/F12 (Invitrogen)、0.1 mg/ml bovine serum albumin (SIGMA)、2.1 mg/ml glucose (SIGMA)、3.9 mM glutamine (SIGMA)、8 μM progesterone、20 μg/ml insulin、100 μM putresine、30 nM selenium dioxide、1% penicillin-streptomycin

海馬神経細胞の初代培養

生後 0 日目のマウスの脳から海馬を切り出し、神経細胞分散液 (住友ベークライト) を用いて海馬神経細胞を分散した。その後、分散した細胞をプレーティング溶液に再懸濁し、poly-D-lysine (0.4 mg/ml; Sigma) コートしたカバーガラス (直径 12 mm; MATSUNAMI) に 1.6×10^5 cells/cm² となるようにガラス面に細胞を接着させた。3 時間後、メンテナンス溶液に交換し、任意の時期まで 37 °C、5% CO₂ インキュベータ内で培養した。培養 3 日目に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入を行った。

プレーティングメディウムおよびメンテナンス溶液の組成は以下に示す。

プレーティング溶液の組成 :

{MEM (Gibco)、10% Horse Serum、1mM Sodium Pyruvate、0.6 % D-glucose、1 % Penicillin Streptomycin}

メンテナンス溶液の組成:

Neurobasal (Gibco)、0.5 mM L-glutamine (Sigma)、 B-27 supplement (Gibco)、 1 % Penicillin Streptomycin

免疫細胞染色

カバーガラス上のプルキンエ細胞および海馬培養細胞を 4% パラホルムアルデヒドで室温にて 5 分間固定した。その後、PBST (0.2% tween20 を含む PBS) で 5 分間 3 回洗浄を行い、ブロッキング液 {2% スキムミルク (Difco Skim milk, BD) を含む PBST} を用いて一次抗体反応を行った (室温 1 時間あるいは 4°C 一晩)。一次抗体を PBST で 5 分間 3 回洗浄した後、ブロッキング液を用いて二次抗体反応を行った (室温 1 時間あるいは 4°C 一晩)。その後、二次抗体を PBST を用いて 5 分間 3 回洗浄を行い、洗浄したサンプルを ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probe) を用いてスライドガラス (MATSUNAMI) に封入した。

実験に用いた抗体を以下に示す。

・一次抗体

ウサギポリクローナル抗体 Anti-DsRed (1:1000, Clontech)
ウサギポリクローナル抗体 Anti-Myc-tag (1:500, MBL)
マウスモノクローナル抗体 Anti-Calbindin D-28K (1:1000, swant)
ニワトリポリクローナル抗体 Anti-GFP (1:1000, Millipore)
ヒツジポリクローナル抗体 Anti-GABAA_R B2 (1:200, Santa Cruz)
ヒツジポリクローナル抗体 Anti-CK-B (1:200, Santa Cruz)
マウスモノクローナル抗体 Anti-CK-M (1:200, Santa Cruz)

・二次抗体

Alexa Flour 488 anti-mouse, rabbit, chicken IgG (1:400, Molecular Probe)
Alexa Flour 568 anti-rabbit, mouse, goat IgG (1:400, Molecular Probe)

Alexa Flour 647 anti-mouse, rabbit IgG (1:400, Molecular Probe)

免疫組織染色

アデノ随伴ウイルスを小脳にインジェクションあるいは子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入したマウスの脳は、生後 14 日目で、4% パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液を用いて還流固定した。還流固定後のサンプルは 4% パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液中に一晩浸し、翌日 PBS 溶液と交換した。固定されたサンプルを、3%の低融点アガロースゲル (Nacalai Tesque) に包埋し、マイクロスライサー (D.S.K) を用いて脳切片 (厚さ 100 μ m) を作成した。スライスされた脳切片は、PBST (0.5% Triton X-100 を含む PBS) で 5 分間 3 回洗浄を行い、ブロッキング液 (2% スキムミルクを含む PBST) を用いて一次抗体反応を行った (4 $^{\circ}$ C一晩)。次に一次抗体を PBST で 5 分間 3 回洗浄を行い、ブロッキング液を用いて二次抗体反応を行った (4 $^{\circ}$ C一晩)。その後、二次抗体を PBST を用いて 5 分間 3 回洗浄を行い、洗浄したサンプルを CC/Mount (Diagnostic Bio systems)を用いてスライドガラスに封入した。

実験に用いた抗体を以下に記す。

・一次抗体

マウスモノクローナル抗体 Anti-Calbindin D-28K (1:1000, swant)

ウサギポリクローナル抗体 Anti-Myc-tag (1:500, MBL)

ウサギポリクローナル抗体 DsRed (1:1000, Clonteck)

ニワトリポリクローナル抗体 Anti-GFP (1:1000, Millipore)

・二次抗体

Alexa Flour 488 anti-chicken IgG (1:1000, Molecular Probe)

Alexa Flour 568 anti-rabbit IgG (1:1000, Molecular Probe)

Alexa Flour 647 anti-mouse IgG (1:1000, Molecular Probe)

アデノ随伴ウイルスの小脳へのインジェクション

生後 0 日目マウスを、3 分間氷上麻酔を行った後、マウスの後頭部の皮膚と筋肉を切開し、小脳の真上に相当する頭蓋骨に切れ込みを入れた。その切れ目にアデノ随伴ウイルス(Td-tomato:Mito-EGFP=1:1) を装填した注射針 (33-gauge needle, Ito)を挿入し、1 μ -2 μ l のウイルス溶液 (10^9 - 10^{10} plaque-forming units) を小脳分子層へインジェクションした。傷口が固まるまで 3 時間以上 37 °C でマウスを保温し、元のケージへ戻した。

子宮内電気穿孔法

妊娠 12,5 日目のマウスにソムノペンチル (共立)を腹腔注射することで麻酔を行い、マウス腹部の皮膚および腹膜を切開して子宮を取り出した。吸引チューブ (Drummond)に微小ガラス針 {ガラス管 (直径 2mm, NARISHIGE)をプレーで 2 段引きして作成}に取り付け、0.1% Fast Green で着色した DNA 溶液 (1 μ g/ μ l) を装填した。微小ガラス管を胎生 12.5 日目の胎児の第四脳室に刺入し、DNA 溶液を注入、ピンセット型電極 (CUY650P3, NepaGene)で胎児頭部を挟み、電気パルスを与えた {CUY21, NepaGene、(電圧:33 V、パルス幅:30 ms、パルス間隔: 970 ms を計 5 回) }。遺伝子導入後、胎児を腹腔内に戻し、腹膜と皮膚を縫合、ケージに戻した。

ウェスタンブロッティング

mDsRed-CK-B および mDsRed-CK-M 発現 HEK293T 細胞に shRNA コンストラクトを共発現させ、24 時間後、細胞を破碎、サンプル調製した。タンパク質を SDS-PAGE で分離後、ニトロセルロースメンブレン(Amersham Biosciences)に転写した。転写後、ブロッキング液 (2% スキムミルクを含む PBST) を用いて 1 時間ブロッキング後、一次抗体反応を行った (4°C 一晚)。次に一次抗体を PBST で 5 分間 3 回洗浄を行い、ブロッキング液を用いて二次抗体反応を行った (4°C 一晚)。その後、二次抗体を PBST を用いて 5 分間 3 回洗浄を行い、DAB 染色キット (ImmPACT DAB, Vector Laboratories)を用いてペルオキシダーゼ反応を検出した。

実験に用いた抗体を以下に記す。

- ・一次抗体

ウサギポリクローナル抗体 DsRed (1:1000, Clontek)

マウスモノクローナル抗体 Anti- β -actin (1:1000, Sigma)

- ・二次抗体

mouse anti-HRP IgG (1:1000, Millipore)

rabbit anti-HRP IgG (1:1000, Invitrogen)

顕微鏡画像の取得とデータ解析

固定サンプルの観察では共焦点顕微鏡を用いた (Olympus FV1000)。観察倍率は 40 倍の乾燥系対物レンズと 100 倍の油浸対物レンズを用いて観察を行った。取得した 3 次元画像は ImageJ (NIH) を用いて Z 方向に重ね合わせた。樹状突起の形態のトレース、全長、分岐数の定量化および Sholl 解析は NeuroLucida (MBF Bioscience) を用いて行った。樹状突起ミトコンドリアの密度を定量化するにあたり、Mito-EGFP あるいは Mito-DsRed でラベルし、二値化した樹状突起ミトコンドリアの領域を樹状突起領域で割ることで算出した。

プルキンエ細胞突起伸長過程の長期間経時観察

プルキンエ細胞樹状突起伸長過程を観察するにあたり、標識したプルキンエ細胞を培養 8 日目より 3 時間あるいは 1 時間間隔でインキュベーター顕微鏡 (Olympus LCV100) を用いて観察を行った。観察倍率は 20 倍の乾燥系対物レンズを用いて観察を行った。

ミトコンドリアの輸送過程の経時観察

プルキンエ細胞の形態およびミトコンドリアをそれぞれ tdTomato および Mito-EGFP で標識した。培養 10 日目で樹状突起 Mito-EGFP シグナルを 488 nm レーザを用いて 10 秒間蛍光退色し、その後共焦点顕微鏡 (Olympus IX81) を用いて、5 秒間隔で細胞体から樹状突起へと輸送されるミトコンドリアの動きを観察

した。観察倍率は 100 倍の油浸対物レンズを用いて観察を行った。ミトコンドリアの輸送速度を計算するために、ImageJ の manual tracing プラグインを用いた。

ATP イメージング

細胞内 ATP 濃度の分散および時間変化を観察するために、共焦点顕微鏡 (Olympus IX81)を用いて ATeam1.03 を発現させたプルキンエ細胞を 458 nm レーザーで励起し 2 つの検出フィルター (CFP: 475-520 nm、YFP(FRET): 515-615 nm) で CFP および YFP(FRET)画像を取得した。観察倍率は 60 倍の油浸対物レンズを用いて観察を行った。YFP/CFP Ratio は FV10-ASW (Olympus)を用いて算出した。取得した 4 次元画像は ImageJ (NIH)の maximum projection を用いて Z 方向に重ね合わせた。Ratio 画像のノイズの低減のために median filter (ImageJ)を用いた。細胞体から樹状突起に沿った ATP 分布の定量のために、細胞体と樹状突起の境目から 10 μ m 細胞体内の部分から樹状突起シャフトの中心に沿って 1 ピクセル幅でラインスキャンを行い、Ratio 値を基準化するために細胞体での Ratio 値を用いた。樹状突起末端部での Ratio 値を算出するために、突起先端部から近位樹状突起方向に向けて、長さ 10 μ m、幅 1 ピクセルの線分を引き、その平均値を算出した。樹状突起先端部の Ratio 値を基準化するために細胞体での Ratio 値を用いた。薬剤処理後の ATP 濃度変化を定量するために、細胞体から 10 μ m 離れた樹状突起部位内で ROI を作成し、その領域での平均の Ratio 値の時間変化を算出した。

GFP-actin の FRAP 解析

プルキンエ細胞に GFP-actin を発現させ、共焦点顕微鏡 (Olympus IX81)を用いて培養 10 日目に FRAP 解析を行った。観察倍率は 60 倍の油浸対物レンズを用いて観察を行った。突起先端部の GFP-actin シグナルを 488 nm レーザーを用いて 1 秒間蛍光退色させ、その後の蛍光シグナルの回復を 2 秒間隔で 2 分間観察を行った。

Ca²⁺イメージング

プルキンエ細胞に GCaMP3 を発現させ、共焦点顕微鏡 (Olympus IX81)を用いて培養 10 日目に Ca²⁺イメージングを行った。10 μ M DHPG でプルキンエ細胞を刺激後、488 nm レーザーで GCaMP3 を励起することで、1 秒間隔、2 分間 Ca²⁺ 発火を観察した。観察倍率は 60 倍の油浸対物レンズを用いて観察を行った。GCaMP3 蛍光シグナルの時間変化は、 $\Delta F/F_0$ {(時刻 t の値-時刻 0 の値)/時刻 0 の値}で算出した。

ミトコンドリア膜電位の測定

HEK293T 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ(直径 35 mm; IWAKI)に播種し、24 時間後、ECFP、ECFP-TRAK2 del N、T20-ECFP-GM130Cterm および ECFP-Drp1-DN を、Lipofectamine2000 を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後、ミトコンドリアの膜電位の指示薬である 600 nM TMRE 溶液で 37°C、20 分間反応後、指示薬の平衡化のために 150 nM TMRE 溶液に入れ替えた。TMRE の蛍光は 515 nm レーザーで励起し、530-630 nm の励起光を検出した。TMRE 蛍光の定量化にあたっては、1 細胞あたり 3 ケ所のミトコンドリアの領域内で ROI を作り平均化し、その平均輝度を核領域から得られたバックグラウンド蛍光で引いた。

電子顕微鏡観察

Aclar coverslip (Nisshin EM)上に培養した HEK293T 細胞に EGFP あるいは T20-GFP-GM130^{Cterm} を Lipofectamine 2000 を用いて発現させた。遺伝子導入 1 日後に一次固定液 {2% glutaraldehyde を含む NaHCO₃ buffer (100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ を含む 30 mM HEPES buffer pH 7.4) }を用いて室温で 2-24 時間細胞を固定した。さらに、二次固定液{0.25% OsO₄、0.25% K₄Fe(CN)₆ を含む 100 mM cacodylate buffer pH 7 (2 mM CaCl₂ を含む) }を用いて室温、30 分間細胞を固定した。その後、一次染色液 (1% タニン酸を含む 100 mM cacodylate buffer pH 7)で軽く処理した後、すぐに 2 次染色液 (1% uranyl acetate を含む 50mM acetate buffer pH5.2.)で染めた。次にエタノール、続いて酸化プロピレンで脱水後、アダラル

イト 502 エポキシ樹脂にサンプルを包埋した。サンプルを 65°C で 2 日間重合させた後、マイクロトーム (Leica FC6) を用いて厚さ 70nm の切片を作成した。切片をフォルムバーコートグリッドに乗せ、Reynolds クエン酸鉛で 5 分間処理し、80KV 透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1400) を用いて観察を行った。

統計解析

統計的有意差の検定には、多重検定を行うために統計ソフト R を使い、Student's t 検定を行うために Excel を用いた。

参考文献

- Agnew, B.J., Minamide, L.S., and Bamburg, J.R. (1995). Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J. Biol. Chem.* 270, 17582–17587.
- Andres, R.H., Ducray, A.D., Schlattner, U., Wallimann, T., and Widmer, H.R. (2008). Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 76, 329–343.
- Beck, M., Brickley, K., Wilkinson, H.L., Sharma, S., Smith, M., Chazot, P.L., Pollard, S., and Stephenson, F.A. (2002). Identification, molecular cloning, and characterization of a novel GABAA receptor-associated protein, GRIF-1. *J. Biol. Chem.* 277, 30079–30090.
- Bernstein, B.W., and Bamburg, J.R. (2003). Actin-ATP hydrolysis is a major energy drain for neurons. *J. Neurosci.* 23, 1–6.
- Bernstein, B.W., Chen, H., Boyle, J.A., and Bamburg, J.R. (2006). Formation of actin-ADF/cofilin rods transiently retards decline of mitochondrial potential and ATP in stressed neurons. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C828–39.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1, 298–304.
- De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Cantelmo, A.R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., et al. (2013). Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651–663.
- Brickley, K., Smith, M.J., Beck, M., and Stephenson, F.A. (2005). GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J. Biol. Chem.* 280, 14723–14732.

- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* *160*, 189–200.
- Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* *280*, 26185–26192.
- Chen, H., Mccaffery, J.M., and Chan, D.C. (2007). Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell* *130*, 548–562.
- Cichon, J., Sun, C., Chen, B., Jiang, M., Chen, X.A., Sun, Y., Wang, Y., and Chen, G. (2012). Cofilin aggregation blocks intracellular trafficking and induces synaptic loss in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* *287*, 3919–3929.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15927–15932.
- Cui-Wang, T., Hanus, C., Cui, T., Helton, T., Bourne, J., Watson, D., Harris, K.M., and Ehlers, M.D. (2012). Local zones of endoplasmic reticulum complexity confine cargo in neuronal dendrites. *Cell* *148*, 309–321.
- Ferrante, M., Migliore, M., and Ascoli, G.A. (2013). Functional impact of dendritic branch-point morphology. *J. Neurosci.* *33*, 2156–2165.
- Flynn, K.C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., Stern, S., Garvalov, B.K., Gurniak, C., Shaw, A.E., et al. (2012). ADF/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. *Neuron* *76*, 1091–1107.
- Fransson, S., Ruusala, A., and Aspenström, P. (2006). The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *344*, 500–510.
- Fujishima, K., Horie, R., Mochizuki, A., and Kengaku, M. (2012). Principles of branch dynamics governing shape characteristics of cerebellar Purkinje cell dendrites. *Development* *139*, 3442–3455.

Gao, F.-B. (2007). Molecular and cellular mechanisms of dendritic morphogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 525–532.

Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamburg, J.R., and Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J. Neurosci.* *27*, 13117–13129.

Gershon, T.R., Crowther, A.J., Tikunov, A., Garcia, I., Annis, R., Yuan, H., Miller, C.R., Macdonald, J., Olson, J., and Deshmukh, M. (2013). Hexokinase-2-mediated aerobic glycolysis is integral to cerebellar neurogenesis and pathogenesis of medulloblastoma. *Cancer Metab.* *1*, 2.

Grishin, A., Li, H., Levitan, E.S., and Zaks-Makhina, E. (2006). Identification of gamma-aminobutyric acid receptor-interacting factor 1 (TRAK2) as a trafficking factor for the K⁺ channel Kir2.1. *J. Biol. Chem.* *281*, 30104–30111.

Guo, X., Macleod, G.T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M.P., Atwood, H.L., and Zinsmaier, K.E. (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron* *47*, 379–393.

Hacker, K., and Medler, K.F. (2008). Mitochondrial calcium buffering contributes to the maintenance of Basal calcium levels in mouse taste cells. *J. Neurophysiol.* *100*, 2177–2191.

Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* *118*, 5411–5419.

Horn, M., and Schlote, W. (1992). Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia. *Acta Neuropathol.* *85*, 79–87.

Horton, A.C., Rácz, B., Monson, E.E., Lin, A.L., Weinberg, R.J., and Ehlers, M.D. (2005). Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* *48*, 757–771.

Huang, T.Y., Minamide, L.S., Bamburg, J.R., and Bokoch, G.M. (2008). Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation. *Dev. Cell* *15*, 691–703.

- Imamura, H., Nhat, K.P.H., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., and Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15651–15656.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y.-I., et al. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* *11*, 958–966.
- Kaneko, M., Yamaguchi, K., Eiraku, M., Sato, M., Takata, N., Kiyohara, Y., Mishina, M., Hirase, H., Hashikawa, T., and Kengaku, M. (2011). Remodeling of monopolar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. *PLoS One* *6*, e20108.
- Kawaguchi, K., Habara, T., Terashima, T., and Kikkawa, S. (2010). GABA modulates development of cerebellar Purkinje cell dendrites under control of endocannabinoid signaling. *J. Neurochem.* *114*, 627–638.
- Kelley, M.H., Ortiz, J., Shimizu, K., Grewal, H., Quillinan, N., and Herson, P.S. (2013). Alterations in Purkinje cell GABA_A receptor pharmacology following oxygen and glucose deprivation and cerebral ischemia reveal novel contribution of β 1-subunit-containing receptors. *Eur. J. Neurosci.* *37*, 555–563.
- Kirk, E., Chin, L.-S., and Li, L. (2006). GRIF1 binds Hrs and is a new regulator of endosomal trafficking. *J. Cell Sci.* *119*, 4689–4701.
- Koshihara, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* *305*, 858–862.
- Kuiper, J.W.P., Pluk, H., Oerlemans, F., van Leeuwen, F.N., de Lange, F., Fransen, J., and Wieringa, B. (2008). Creatine kinase-mediated ATP supply fuels actin-based events in phagocytosis. *PLoS Biol.* *6*, e51.
- LLi, Z., Okamoto, K.-I., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* *119*, 873–887.

Linton, J.D., Holzhausen, L.C., Babai, N., Song, H., Miyagishima, K.J., Stearns, G.W., Lindsay, K., Wei, J., Chertov, A.O., Peters, T.A., et al. (2010). Flow of energy in the outer retina in darkness and in light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8599–8604.

MacAskill, A.F., and Kittler, J.T. (2010). Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol.* *20*, 102–112.

Macaskill, A.F., Rinholm, J.E., Twelvetrees, A.E., Arancibia-Carcamo, I.L., Muir, J., Fransson, A., Aspenstrom, P., Attwell, D., and Kittler, J.T. (2009a). Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* *61*, 541–555.

MacAskill, A.F., Brickley, K., Stephenson, F.A., and Kittler, J.T. (2009b). GTPase dependent recruitment of Grif-1 by Miro1 regulates mitochondrial trafficking in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *40*, 301–312.

Manczak, M., Calkins, M.J., and Reddy, P.H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 2495–2509.

Masson, N., and Ratcliffe, P.J. (2014). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab.* *2*, 3.

Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J. Cell Sci.* *117*, 2791–2804.

Minamide, L.S., Striegl, A.M., Boyle, J.A., Meberg, P.J., and Bamberg, J.R. (2000). Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell Biol.* *2*, 628–636.

Quintero, O.A., DiVito, M.M., Adikes, R.C., Kortan, M.B., Case, L.B., Lier, A.J., Panaretos, N.S., Slater, S.Q., Rengarajan, M., Feliu, M., et al. (2009). Human Myo19 is a novel myosin that associates with mitochondria. *Curr. Biol.* *19*, 2008–2013.

Ramnani, N. (2006). The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 511–522.

Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M., and Pozzan, T. (1995). Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr. Biol.* *5*, 635–642.

Santamaria, F., Wils, S., De Schutter, E., and Augustine, G.J. (2006). Anomalous diffusion in Purkinje cell dendrites caused by spines. *Neuron* *52*, 635–648.

Satoh, D., Sato, D., Tsuyama, T., Saito, M., Ohkura, H., Rolls, M.M., Ishikawa, F., and Uemura, T. (2008). Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1164–1171.

Schwarzer, C., Barnikol-Watanabe, S., Thinner, F.P., and Hilschmann, N. (2002). Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *34*, 1059–1070.

Sengupta, D., Truschel, S., Bachert, C., and Linstedt, a. D. (2009). Organelle tethering by a homotypic PDZ interaction underlies formation of the Golgi membrane network. *J. Cell Biol.* *186*, 41–55.

Shin, J.-B., Streijger, F., Beynon, A., Peters, T., Gadzala, L., McMillen, D., Bystrom, C., Van der Zee, C.E.E.M., Wallimann, T., and Gillespie, P.G. (2007). Hair bundles are specialized for ATP delivery via creatine kinase. *Neuron* *53*, 371–386.

Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N., and van der Bliet, A.M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* *143*, 351–358.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliet, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2245–2256.

Sotelo, C., and Dusart, I. (2009). Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience* *162*, 589–600.

Spillane, M., Ketschek, A., Merianda, T.T., Twiss, J.L., and Gallo, G. (2013). Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis. *Cell Rep.* *5*, 1564–1575.

- Van Spronsen, M., Mikhaylova, M., Lipka, J., Schlager, M.A., van den Heuvel, D.J., Kuijpers, M., Wulf, P.S., Keijzer, N., Demmers, J., Kapitein, L.C., et al. (2013). TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron* 77, 485–502.
- Stowers, R.S., Megeath, L.J., Górska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A., and Schwarz, T.L. (2002). Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron* 36, 1063–1077.
- Sung, J.Y., Engmann, O., Teylan, M.A., Nairn, A.C., Greengard, P., and Kim, Y. (2008). WAVE1 controls neuronal activity-induced mitochondrial distribution in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3112–3116.
- Suurna, M. V, Ashworth, S.L., Hosford, M., Sandoval, R.M., Wean, S.E., Shah, B.M., Bamburg, J.R., and Molitoris, B.A. (2006). Cofilin mediates ATP depletion-induced endothelial cell actin alterations. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290, F1398–407.
- Tanaka, M., Yanagawa, Y., Obata, K., and Marunouchi, T. (2006). Dendritic morphogenesis of cerebellar Purkinje cells through extension and retraction revealed by long-term tracking of living cells in vitro. *Neuroscience* 141, 663–674.
- Verstreken, P., Ly, C. V, Venken, K.J.T., Koh, T.-W., Zhou, Y., and Bellen, H.J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47, 365–378.
- Wagner, W., Brenowitz, S.D., and Hammer, J.A. (2011). Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nat. Cell Biol.* 13, 40–48.
- Wilken, B., Ramirez, J.M., Probst, I., Richter, D.W., and Hanefeld, F. (2000). Anoxic ATP depletion in neonatal mice brainstem is prevented by creatine supplementation. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 82, F224–7.
- Winter, L., Abrahamsberg, C., and Wiche, G. (2008). Plectin isoform 1b mediates mitochondrion-intermediate filament network linkage and controls organelle shape. *J. Cell Biol.* 181, 903–911.

Ye, B., Zhang, Y., Song, W., Younger, S.H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2007). Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* *130*, 717–729.

Zala, D., Hinckelmann, M.-V., Yu, H., Lyra da Cunha, M.M., Liot, G., Cordelières, F.P., Marco, S., and Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* *152*, 479–491.

謝辞

本研究を行うにあたり、懇切なるご指導を賜りました京都大学大学院生命科学研究所神経発生学分野教授、見学美根子先生に深く感謝致します。終始温かいご指導を賜りました京都大学物質—細胞統合システム拠点助教の藤島和人先生に心から感謝致します。さらに副指導教官として適切なる御助言を賜りました、生体システム学分野教授、根岸学先生ならびに生体制御学分野教授、松田道行先生に深く感謝致します。電子顕微鏡観察にご協力頂きました、京都大学物質—細胞統合システム拠点教授、Heuser John 先生ならびに同研究員、吉村安寿弥先生に感謝致します。海馬神経細胞を用いた実験にご協力頂きました、見学研究室博士課程の呉攸君に感謝致します。子宮内電気穿孔によるプルキンエ細胞への遺伝子導入方法を懇切丁寧にご教授頂きました、慶応義塾大学医学部教授、柚崎通介先生ならびに同助教、竹尾ゆかり先生に感謝致します。ATP イメージングのご指導を頂きました、京都大学白眉センター准教授、今村博臣先生に感謝致します。本研究を行うにあたり親切なるご支援、ならびにご指導を頂きました神経発生学分野の皆様感謝致します。最後に私の研究生活を支えていただいた、父 克明、母 幾子ならびに亡き祖父母に心より感謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Kansai Fukumitsu, Kazuto Fujishima, Azumi Yoshimura, You Kure Wu, John Heuser and Mineko Kengaku

Synergistic action of dendritic mitochondria and creatine kinase maintains ATP homeostasis and actin dynamics in growing neuronal dendrites

The Journal of Neuroscience, in press, 2015