

主論文の要旨

**Close association of polarization and LC3,
a marker of autophagy,
in axon determination in mouse hippocampal neurons**

（マウス海馬ニューロンの軸索決定における分極と
オートファジー・マーカーLC3の密接な関連性）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

世木 直喜

【緒言】

オートファジーは、細胞内小器官、高分子などの細胞内クリアランスシステムであり、細胞の恒常性維持だけでなく、分化などのより活発な細胞活動を行うために不可欠なものである。ニューロン軸索の伸長過程では、オートファジーは成長円錐で優先的に起こり、その破綻は中枢神経系における損傷後の軸索再生不能と密接に関連している。しかし、ニューロン成長過程におけるオートファジーの役割は不明な点が多く、特にニューロンの極性獲得、すなわち軸索決定にオートファジーが関与しているかどうかは不明である。本研究の目的は、ニューロンが形態的極性を獲得する際のオートファジーの生物学的意義を検討することであり、このためにオートファジーのマーカーである LC3 (MAP1LC3: Microtubule-associated protein light chain 3) を利用した。

【対象及び方法】

C57BL/6J マウスまたは GFP-LC3 トランスジェニックマウス胎児 (E17 または 18) の初代培養海馬ニューロンを用いた。ニューロンは poly-D-lysine と laminin で処理した glassbase dish 上で、B-27 Plus、GlutaMAX、Antibiotic-Antimycotic を加えた Neurobasal Plus 培地にて培養し実験に使用した。

免疫細胞化学では、ニューロンを 10 分間 4%PFA 固定し、1 分間 -30°C メタノール透過処理してから間接蛍光抗体法による標識を行った。ニューロン特異的クラス III β チューブリン (Tuj1)、LC3、および軸索のマーカーである Tau の染色を行った。画像は共焦点レーザー顕微鏡 TiEA1R (Nikon) で撮影し、Plan Apo VC 60 \times A WI DIC N2 水浸対物レンズ (N.A.=1.2、Nikon) を使用した。

生細胞イメージングは TiEA1R、Plan Apo 40 \times DIC M N2 対物レンズ (N.A.=0.95、Nikon) を用い、5 分毎に連続撮影した。取得したデジタル画像は、ImageJ (NIH) を用いて処理・解析した。

【結果】

初代培養ニューロンにおいてオートファゴソームのマーカーである LC3B の免疫染色を行った。未熟なステージ 1 のニューロンでは、LC3B は均等に分布していた (図 1A)。対称形で軸索が定まっていないステージ 2 ニューロンでは、LC3B の局在に関して、極性化したもの (図 1A、中段) と極性化していないもの (図 1A、下段) が観察された。約 20% を占めた極性化したものでは、LC3B は単一の突起に濃縮されていた (図 1B から図 1D)。

GFP-LC3 トランスジェニックマウスから得られたニューロンを生細胞イメージングで観察すると、ステージ 2 ニューロンでは LC3 が神経突起間を振動的に分布していることがわかった。しかしある時、単一の突起に GFP-LC3 シグナルの急激な増大 (LC3 サージ) が発生し、LC3 の急増に伴ってその突起が伸長し、ニューロンが極性を獲得することがわかった (図 2A、B)。また、軸索マーカー Tau による免疫染色によって、LC3 サージ後に伸長した突起が軸索に分化したことが確認された。さらに、ステージ 2 神

経突起の GFP-LC3 相対輝度を解析した結果、将来の軸索はその他の突起よりも有意に高い輝度を有していることが示された(図 2C)。

ニューロンのオートファジーを強制的に活性化するため、天然由来の二糖であるトレハロースを利用した。ステージ 2 ニューロンを 25mM トレハロースで処理し、神経突起のオートファジーが誘導されることを確認した。最長突起および 2 番目に長い突起の長さの比によって表したニューロンの形態では、トレハロースは最長突起の伸長を有意に促進した(図 3A)。対照的に、リソソームとオートファゴソームの融合を阻害することでオートファジーを阻害するバフィロマイシン A1 でニューロンを処理すると、最長突起の伸長が抑制され、トレハロースによる伸長も打ち消された(図 3A~C)。さらに、突起の生物学的特性を評価するため、Tau の polarity index (PI) を算出した。PI = (Id-Ia) / (Id+Ia) [Id: 樹状突起の平均輝度、Ia: 軸索の輝度] で、PI > 0 または PI < 0 は、それぞれ樹状突起または軸索への分極を示す。トレハロースは PI を有意に減少させ、バフィロマイシン A1 は PI を有意に増加させた。さらに、トレハロースの効果はバフィロマイシン A1 によって打ち消された(図 3D)。

【考察】

これまでの研究で我々は軸索損傷後のオートファジーの役割を明らかにした。すなわち、コンドロイチン硫酸が受容体 PTP σ を活性化させ、コータクチンのチロシン脱リン酸化を誘導し、オートファゴソームとリソソーム間の融合が減少することによって、切断された軸索遠位端にオートファゴソームが異常に蓄積し、再生活性の低い状態に変化する。これらの知見から、より未熟なニューロンの軸索決定におけるオートファジーの役割について調査した。

この問題のために、初代培養海馬ニューロンという確立されたモデルを利用した。GFP-LC3 トランスジェニックマウス由来のニューロンについての生細胞イメージングに基づくと、単一の突起に GFP-LC3 が特異的に集積し数時間持続し、その後その突起が軸索へと伸長することがわかった(図 2)。この結果から、軸索の決定には突起におけるオートファジーの非対称的な活性化が関与していることが示唆された。

オートファジーがどのように 1 本の突起を軸索に決定したか、今回の研究では明らかにならなかった。ひとつの仮説は、オートファジーが軸索決定に必要な局所ポジティブシグナルを調節しているというものである。例えば、Trk ファミリータンパク質は突起先端に局在し、NT-3 や BDNF などのニューロトロフィンによる活性化が、Ras 経路や PI3K-AKT 経路を介して軸索決定を促す。エンドサイトーシスされた Trk は、微小管上を逆行性に輸送されるが、この Trk の逆行性輸送が Trk の活性化に重要であることが示されている。また、BDNF で活性化された TrkB がエンドサイトーシスされたのちにオートファゴソームにトランスロケーションされることが、ニューロンが生体内で複雑性を獲得するために重要であることが明らかになった。したがって、軸索決定時の Trk シグナルの制御には、局所的なオートファジーとその逆行性輸送が関与している可能性がある。

【結語】

軸索が決定する前のステージ 2 ニューロンでは突起間でオートファゴソームの偏在があること、GFP-LC3 トランスジェニックマウスニューロンの生細胞イメージングにより「LC3 サージ」が単一の未熟神経突起の軸索への分化を促進することを示した。さらに、トレハロースとバフィロマイシン A1 によるオートファジーの薬理的活性化および阻害は、それぞれ軸索の決定を加速および遅延させた。以上のことから、発達中のニューロンにおいて、オートファジー、そのマーカーである LC3 と軸索決定が密接に関連していることが明らかとなった。