

核を起点とした軸索制御システムの解明と脳老化予防への応用

代表研究者 島根大学 医学部 神経・筋肉生理学 准教授 桑子 賢一郎
共同研究者 島根大学 医学部 神経・筋肉生理学 講師 長谷川 孝一

【抄録】

本研究では、神経活動制御の中心的役割を担う「軸索起始部 (AIS: Axon Initial Segment)」と細胞骨格制御に重要な「核膜 LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) 複合体」に着目し、“核を起点とした新たな神経活動制御システム”の解明を目指した。

我々は、まず、LINC 複合体が AIS の制御、および AIS を介した神経活動制御に必須であることを明らかにした。また、「LINC 複合体による AIS 制御」を抑制するとマウスの行動異常が惹起されることを見いだした。さらに、加齢に伴って、広範な脳領域のニューロンで LINC 複合体の著しい発現低下と AIS の構造異常が起こることも示した。これらのことから、「LINC 複合体による AIS 制御」が、正常な脳機能の発現に必須であることが強く示唆され、さらに、その破綻が生理的な脳の老化に関与する可能性が考えられた。

1. 研究の目的

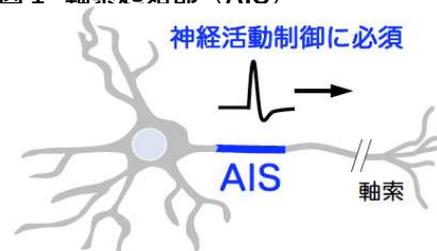
軸索起始部 (AIS) は、特定の電位依存性イオンチャネルが集積した軸索の根もとの構造体で (図 1)、活動電位の生成や調節において必須のはたらきをする。これまでの研究によって、AIS は刺激に応じて自身の長さや位置をダイナミックに変化させる構造的可塑性をもち、これにより局在するイオンチャネル群の種類や量を調整してニューロンの興奮性を制御することが明らかにされた。したがって、AIS の構造的可塑性はニューロンの活動調節の基盤であり、脳機能を制御する極めて重要な役割を担っている。

一方、核膜 LINC 複合体は、内膜を貫通する Sun と外膜を貫通する Nesprin からなる複合体で、細胞質側の Nesprin がアクチンや微小管などの細胞骨格と結合することで核を中心とした細胞骨格ネットワークの起点となる (図 2)。LINC 複合体は、様々な細胞タイプにおいて、その極性や移動などに関与することが示されてきた。また、ハッチンソン・ギルフォード

早老症モデルマウスの線維芽細胞では LINC 複合体の発現異常がみられ、さらにその修正によって老化進行が抑制されることから、LINC 複合体を中心とした核の恒常性の破綻が細胞老化につながる可能性も示唆されている。

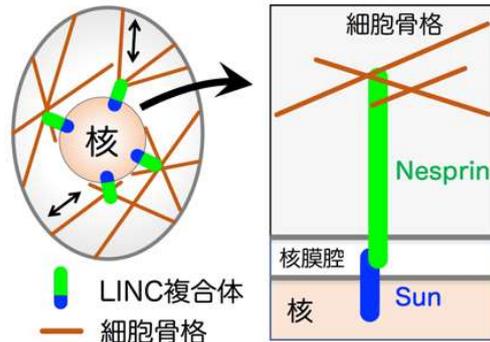
我々は、ニューロンにおける LINC 複合体の機能解析を進めている中で、LINC 複合体が AIS の制御に関わる可能性を見いだした。そこで、「LINC 複合体による AIS 制御」の重要性とメカニズムを明らかにし、さらに、本システムの破綻が生理的な脳老化に関わる可能性を検証することを目的として本研究を行った。

図 1 軸索起始部 (AIS)



- ・ 軸索の根もとの特殊な細胞骨格構造
- ・ 特定の電位依存性 Na^+ , K^+ チャネルが集積
- ・ 活動電位の生成・調節に重要
- ・ 刺激に応じた構造的可塑性

図2 核膜 LINC 複合体



2. 研究方法と経過

2-1 LINC 複合体の機能阻害

細胞質側を大きく欠失して C 末端側の KASH ドメインのみを含む Nesprin 変異体は、Sun タンパク質群とは結合するが細胞骨格との相互作用ができないため LINC 複合体の強力なドミナントネガティブ変異体として機能することが知られていた。そこで、本研究では、Nesprin1 の KASH ドメインのみを含む Nesprin1-KASH (N1-KASH) をニューロンに発現させて LINC 複合体の機能阻害を行った。

2-2 AIS の構造解析

エレクトロポレーション法によって初代培養大脳皮質ニューロン、海馬ニューロン、小脳プルキンエ細胞に N1-KASH を発現させ (対照群は GFP のみを発現)、Ankyrin-G 抗体を用いた免疫染色によって AIS を標識し、その長さを解析した。また、AIS の構造的可塑性の解析では、KCl 添加による脱分極刺激 (対照群は NaCl 処理) を行った。生体脳での AIS の解析では、子宮内エレクトロポレーション法によって胎仔大脳皮質ニューロンに N1-KASH を発現させ生後 3 週齢で組織を固定して、培養ニューロンと同様に Ankyrin-G 抗体による免疫染色を行った。

2-3 アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) によるマウス脳への遺伝子導入

血液脳関門を透過可能な PHP.eB セロタイプ、そして、全ニューロンタイプで発現を誘導するヒト Synapsin-1 プロモーターを含む AAV ベク

ターを作成した。そして、作成したウイルスをマウス眼窩静脈叢に注入し、ニューロンに感染させた。これにより、脳全域のニューロンで N1-KASH (対照群は GFP) を発現させ、個体レベルで LINC 複合体の機能不全を誘導した。

2-4 神経活動解析

上述の AAV ベクターを 6 週齢マウスに感染させて N1-KASH (対照群は GFP) を発現させ、12 週齢の時点で脳スライスを作成した。そして、パッチクランプ法により活動電位発生の閾値およびスパイク発火頻度を解析した。

2-5 マウス行動解析

上述の AAV ベクターを 6 週齢マウスに感染させて N1-KASH (対照群は GFP) を発現させて 12 週齢の時点でオープンフィールドテストおよび T-maze テストを行った。これらのテストによって自発活動量、情動性、作業記憶を解析した。

2-6 老齢マウスにおける LINC 複合体の発現解析および AIS の構造解析

若齢 (3 週齢) マウスと老齢 (20 週齢) マウスの大脳皮質やその他の脳領域において、LINC 複合体分子である Sun1、Sun2、Nesprin1、Nesprin2 の発現パターンを免疫組織化学的に解析した。また、Ankyrin-G 抗体による免疫染色によって 3、6、20 週齢マウス大脳皮質で AIS の長さを解析した。

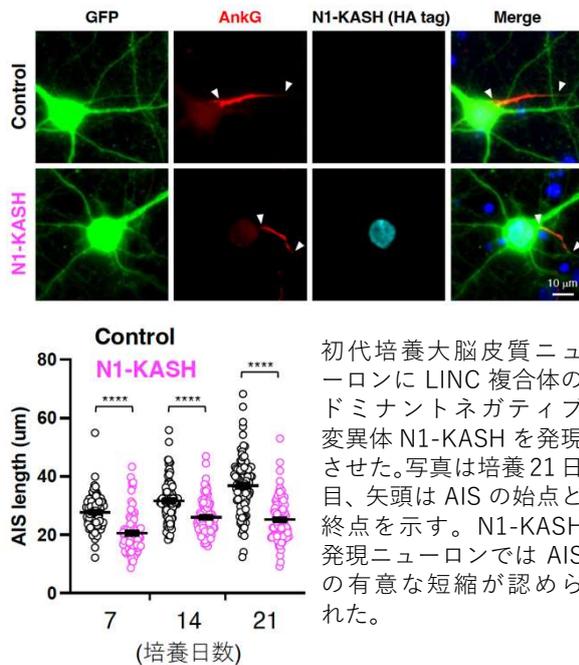
3. 研究の成果

3-1 LINC 複合体による AIS 制御

LINC 複合体の機能阻害が AIS に与える影響を調べるために、初代培養大脳皮質ニューロンに培養初日から N1-KASH を発現させた。その結果、AIS が形成されて間もない培養 7 日目から 21 日目に至るまでいずれの時点でも N1-KASH 発現ニューロンで AIS の明らかな短縮が認められた (図 3)。同様の AIS の短縮は、初代培養海馬ニューロンおよび小脳プルキンエ細胞、さらに生体脳の大脳皮質ニューロンでも観察された。また、大脳皮質ニューロンで

AIS が完全に形成された後の培養 21 日目から N1-KASH の発現誘導を行った場合も AIS の短縮が起こった。これらのことから、LINC 複合体による AIS 制御は多くのニューロンタイプで普遍的な機構であると考えられ、また、LINC 複合体は AIS の形成と維持の両方に必須であると考えられた。

図 3 LINC 複合体阻害による AIS の短縮



さらに、AIS の構造的可塑性に対する LINC 複合体の重要性を調べるために初代培養大脳皮質ニューロンの対照群および N1-KASH 発現群に、KCl 処理による脱分極誘導を行った。その結果、対照群は KCl 処理によって AIS が有意に短縮したが、N1-KASH 発現群では全く変化がみられなかった (図 4)。次に、AAV ベクターを用いて脳全域のニューロンで N1-KASH を発現させたマウス個体から脳スライスを作成し、神経活動解析を行った。その結果、LINC 複合体の機能阻害によって活動電位発生閾値が上昇、つまり活動電位が発生しにくくなり、スパイク発火頻度も低下することが明らかになった (図 5)。これらの結果は、LINC 複合体が、AIS の構造的可塑性の制御において極めて重要な役割を担い、その異常は神経活動異常を引き起こすことを強く示唆している。

図 4 LINC 複合体阻害による AIS の構造的可塑性の消失

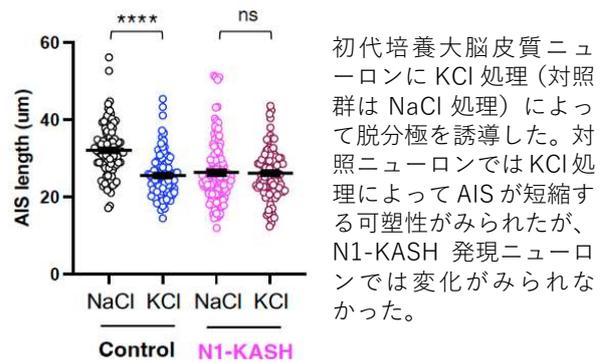
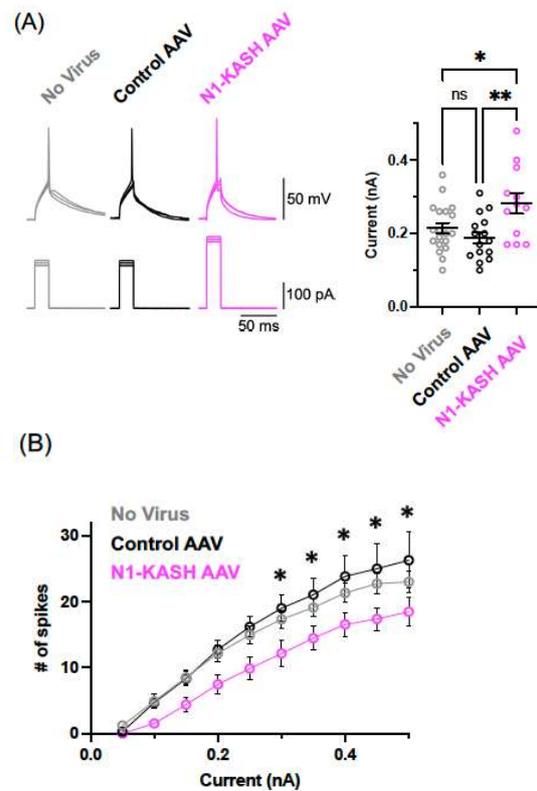


図 5 LINC 複合体阻害による神経活動異常

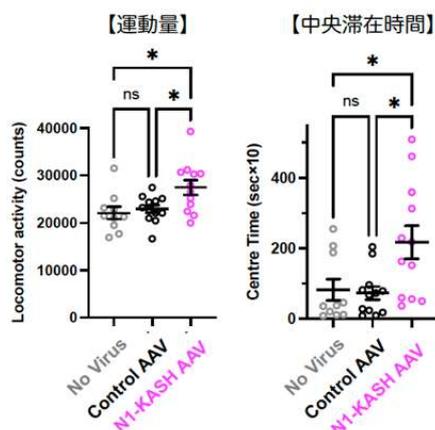


3-2 LINC 複合体の阻害による行動異常

AAV ベクターを用いた N1-KASH の導入により、ニューロンで特異的に LINC 複合体の機能を阻害したマウスを用いて行動解析を行った。まず、オープンフィールドテストでは N1-KASH 群で運動量の増加と不安様行動の低下がみられた (図 6)。一方、T-maze テストによ

る作業記憶の解析では、N1-KASH 群と対照群で有意な差はみられなかった。

図6 LINC 複合体阻害による行動異常



オープンフィールドテスト：
N1-KASH 群では運動量が増加し、不安様行動が低下 (= 中央滞在時間の増加) した。

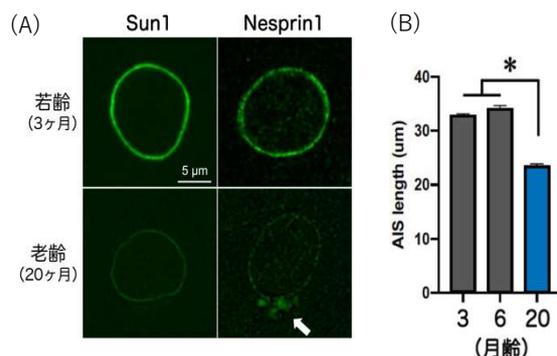
3-3 老化による LINC 複合体と AIS の異常

若齢 (3 ヶ月齢) マウスと老齢 (20 ヶ月齢) マウスにおいて LINC 複合体分子の発現を調べたところ、老齢マウスでは、大脳皮質を含む様々な脳領域のニューロンで核膜上の Sun1 や Nesprin1、Nesprin2 の発現が著しく低下していることが明らかになった (図7(A))。このことは、老齢ニューロンでは LINC 複合体が正常に機能していない可能性を強く示唆している。

また、加齢に伴う AIS の構造的変化を調べたところ、大脳皮質前頭前野および感覚野、運動野のニューロンにおいて、3 ヶ月齢と 6 ヶ月齢では、AIS の長さに変化はみられなかったが、20 ヶ月齢では有意に短縮していることが明らかになった (図7(B))。

これらのことから、加齢に伴う LINC 複合体の発現低下 (= 機能不全) が、「LINC 複合体による AIS 制御」の破綻を引き起こし、それが老齢期の脳機能の衰退につながる可能性が考えられた。

図7 加齢に伴う LINC 複合体および AIS の異常



- (A) 老齢マウスの大脳皮質ニューロンでは核膜上の Sun1 や Nesprin1 の発現が低下し、さらに Nesprin1 は核膜外に異所蓄積(矢印)する。
- (B) 老齢マウス (20 ヶ月齢) の大脳皮質ニューロンでは AIS が顕著に短縮する。グラフは感覚野。その他の様々な領域でも AIS の短縮がみられる。

4. 今後の課題

「LINC 複合体による AIS 制御」が正常な神経活動、そして脳機能発現に重要であることが明らかになった。一方、その分子メカニズムはまだ全く解明されていない。最近、LINC 複合体は、細胞骨格制御を通じて細胞内の分子輸送機構やシグナル伝達機構にも関わることを報告されている。したがって、今後はこれらの多角的な視点から分子メカニズムを検証していくことが重要になる。

また、加齢に伴う LINC 複合体の発現低下が、老化による脳機能衰退を引き起こす要因となるかどうか、その因果関係はまだわかっていない。そのため、老齢期に LINC 複合体の発現を維持することで脳機能の低下を抑止できるかどうかを明らかにする必要がある。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果については、国内外の学会で発表し、さらに、国際学術雑誌へ投稿する。

【学会発表】 日本神経科学会、日本生理学会、北米神経科学会など

【論文】 投稿雑誌未定

Investigation of brain aging caused by a dysfunction of “nuclear-axon crosstalk” machinery

Primary Researcher: Ken-ichiro Kuwako
Associate Professor
Department of Neural and Muscular Physiology, School of
Medicine, Shimane University

Co-researchers: Koichi Hasegawa
Assistant Professor
Department of Neural and Muscular Physiology, School of
Medicine, Shimane University

In this study, we focused on the Axon Initial Segment (AIS), which plays a central role in the regulation of neuronal activity, and the Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) complex, which is important for cytoskeletal regulation, to elucidate a "new regulatory system of neuronal activity via the nucleus. We first showed that the nuclear membrane LINC complex is essential for the regulation of AIS and for the control of neural activity through AIS. We also found that disruption of "LINC complex-mediated AIS regulation" induced behavioral abnormalities in young mice. Furthermore, we showed that in the aged brain, a marked down-regulation of the LINC complex and structural abnormalities of AIS occur in neurons in a wide range of brain regions. These findings suggest that "LINC complex-mediated AIS regulation" is essential for normal brain function and that its disruption may be involved in physiological brain aging.