

## Dynactin 1 の機能低下と運動ニューロン変性

勝野 雅央<sup>1)</sup> 池中 建介<sup>1)</sup> 河合 香里<sup>1)</sup> 祖父江 元<sup>1)</sup>

要旨：Dynactin 1 は各種の蛋白質や小胞の軸索輸送を司るモーター蛋白質である。孤発性 ALS 患者脊髄前角細胞のマイクロアレイ解析において dynactin 1 の発現が低下していることに着目し、コリン作動性ニューロン（運動ニューロン）特異的 dnc-1 (dynactin-1 の線虫相同体) ノックダウン線虫を作成したところ、著明な運動機能障害を呈し、運動ニューロンの軸索の変性およびオートファゴソームの軸索輸送の著明な低下がみとめられた。Rapamycin と trichostatin を併用すると表現型、軸索変性が著明に改善した。オートファゴソームの軸索輸送は運動ニューロン疾患の新規治療ターゲットと考えられる。

(臨床神経 2013;53:1084-1086)

Key words：筋萎縮性側索硬化症、運動ニューロン、軸索輸送、dynactin 1、オートファジー

## 軸索輸送における dynactin 1 の役割

運動ニューロンの形態学的特性は、強い極性と細胞サイズの大きさである。すなわち、細胞体から長い軸索が伸びており、その長さはヒトでは最長で1メートルにおよぶ。こうした特殊な形態を維持するために運動ニューロンには軸索内で種々の物質を輸送するためのシステム（軸索輸送）が発達している。軸索輸送は細胞体から軸索末端へと向かう順行性輸送と、軸索末端から細胞質への逆行性輸送があり、前者により輸送されるものは主として小胞、オルガネラ（ミトコンドリアなど）、ライソゾーム、細胞骨格、メッセンジャー RNA などであり、後者によってはこれらに加えウイルスや毒素なども輸送される。さらに近年、オートファゴソームが軸索内を順行性および逆行性に輸送されることが報告されている<sup>1)</sup>。軸索輸送のうち、順行性輸送は主に kinesin 複合体により、逆行性輸送は主に dynein-dynactin 複合体によりおこなわれるが、dynein-dynactin 複合体は順行性輸送にも関与していると考えられている<sup>2)</sup> (Fig. 1)。

## Dynactin 1 と神経変性疾患

Dynactin 1 は微小管を足場にして細胞内の物質輸送をおこなう dynactin/dynein 複合体の構成蛋白質である (Fig. 2)。Dynactin 1 の遺伝子異常が一部の遺伝性神経変性疾患の原因として同定されており、微小管結合ドメインをコードする領域の点変異 (G59S) により声帯麻痺をとまなう常染色体優性の下位運動ニューロン疾患が生じることが報告されている<sup>3)</sup>。また、近傍の別の点変異 (G71R, Q74P) は Perry 症候群の原因として知られている。本症候群は常染色体優性遺伝形式をとり、パーキンソニズム・低換気・うつ・体重減少などを主

徴とし、病理学的に中脳黒質・線条体などのニューロンに TDP-43 封入体が見られることも知られている<sup>4)</sup>。一方筆者らは、孤発性 ALS 患者の単一運動ニューロン特異的遺伝子発現解析により、運動ニューロン特異的に発現上昇や発現低下を示す遺伝子 (1~3%) をみだし、このうちとくに初期から発現が低下している分子として dynactin 1 を同定した<sup>5)</sup>。これらの結果は、dynactin 1 の機能異常とそれに引き続いて生じる軸索輸送の障害が運動ニューロン変性に深く関与していることを示唆している。

## 運動ニューロン特異的 dnc-1 ノックダウン線虫における運動ニューロン変性

近年オートファジーの異常が様々な神経変性疾患の病態に寄与していることが報告されており、ALS についても運動ニューロン内にオートファゴソームの蓄積がみられることが明らかとなっている<sup>6)</sup>。Dynactin 1 の機能異常による運動ニューロン変性の分子病態を明らかにするため、筆者らはとくに dynactin 1 とオートファゴソームの関係に注目して解析をおこなった。その結果、孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおける dynactin 1 の発現レベルとオートファゴソームのマーカーである LC3 の蓄積には逆相関がみられ、dynactin 1 の発現が低下している運動ニューロンではオートファゴソームの蓄積が高度にみられることが明らかとなった。

そこで、さらに両者の関係を詳細に解析するため、コリン作動性ニューロン（運動ニューロン）特異的に dnc-1 (dynactin-1 の線虫相同体) に対する shRNA と GFP を共に発現するベクターをもちい、dnc-1 ノックダウン線虫を作成した<sup>7)</sup>。線虫の運動機能は body bend assay, liquid thrashing assay, video capture analysis により解析した。運動ニューロンにおける軸索輸送については、線虫初代培養ニューロンを

<sup>1)</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科 [〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65]

(受付日：2013年5月30日)

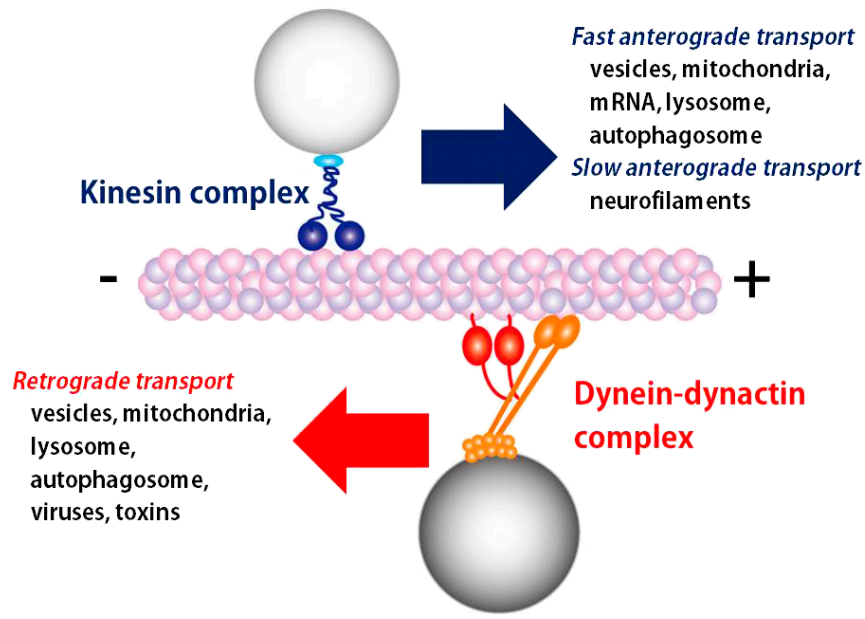


Fig. 1 Axonal transport and axon motors.

Neurons have a transport system within the axon to maintain the cellular function and survival. Anterograde axonal transport is chiefly facilitated by kinesin complex, whereas retrograde transport is controlled by dynein-dynactin complex. Recent studies suggest that autophagosome is subjected to bidirectional axonal transport.

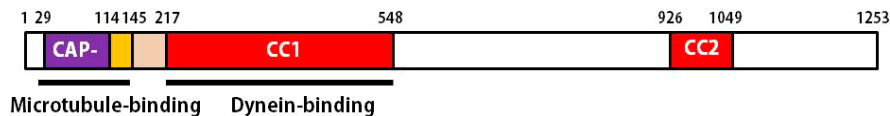


Fig. 2 Structure of dynactin 1.

Dynactin1, the major component of dynactin complex, has a microtubule-binding domain and two coiled coil (CC) domains. Mutations within the microtubule-binding are responsible for hereditary neurodegenerative diseases.

もちいた time-lapse image および線虫をもちいた kymograph により解析した。その結果、運動ニューロン特異的 dnc-1 ノックダウン線虫は著明な運動機能障害および寿命短縮を呈し、孤発性 ALS 患者でみられるスフェロイドと類似の軸索腫大を早期からみとめ、加齢とともに軸索や細胞体の変性が進行した。シナプス小胞関連蛋白質である synaptobrevin をマーカーとして kymograph をおこなうと、dnc-1 ノックダウンにより順行性および逆行性軸索輸送が低下し、synaptobrevin が軸索内に蓄積することが明らかとなった。また、オートファゴソムのマーカーである Lgg-1 (LC-3 の線虫相同体) をもちいて解析すると、スフェロイドにオートファゴソムの異常蓄積がみとめられ、その分子基盤として、dnc-1 ノックダウン線虫ではオートファゴソムの順行性および逆行性軸索輸送の著明な低下がみとめられた。

次に、オートファジーの賦活による運動ニューロン変性の抑制を試みた。その結果、オートファジーを活性化する rapamycin の投与により運動機能の改善がみられた。一方、チュープリンのアセチル化を介して軸索輸送を活性化する trichostatin A を投与すると、チュープリンのアセチル化が促

進され、オートファゴソムの逆行性軸索輸送が活性化されるとともに、運動機能低下などの表現型の改善がみられた。Rapamycin と trichostatin A を併用するときわめて強い治療効果がえられた。

#### おわりに

線虫をもちいた解析により、軸索モーターである dynactin 1 の発現低下はオートファゴソムなどの軸索輸送を低下させ運動ニューロン変性を惹起することが示された。また、オートファジーと軸索輸送をターゲットとする治療法が孤発性 ALS の治療戦略の一つとなりうることを示された。Dynactin 1 の機能低下は球脊髄性筋萎縮症のマウスモデルでも示されており<sup>8)</sup>、また軸索輸送の異常はその他多くの神経疾患との関連が示唆されている<sup>9)</sup>。今後オートファジーと軸索輸送を活性化する治療法の有効性や安全性について、更なる検討が必要と考えられる。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

## 文 献

- 1) Katsumata K, Nishiyama J, Inoue T, et al. Dynein- and activity-dependent retrograde transport of autophagosomes in neuronal axons. *Autophagy* 2010;6:378-385.
- 2) Chevalier-Larsen E, Holzbaur EL. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762:1094-1108.
- 3) Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 2003;33:455-456.
- 4) Farrer MJ, Hulihan MM, Kachergus JM, et al. DCTN1 mutations in Perry syndrome. *Nat Genet* 2009;41:163-165.
- 5) Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, et al. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2005;57:236-251.
- 6) Sasaki S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011;70:349-359.
- 7) Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, et al. dnc-1/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS One* 2013;8:e54511.
- 8) Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, et al. Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. *J Neurosci* 2006;26:12106-12117.
- 9) d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 2011;17:968-974.

## Abstract

**Dysfunction of dynactin 1 in motor neuron degeneration**

Masahisa Katsuno, M.D., Ph.D.<sup>1)</sup>, Kensuke Ikenaka, M.D., Ph.D.<sup>1)</sup>,  
Kaori Kawai, Ph.D.<sup>1)</sup> and Gen Sobue, M.D., Ph.D.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Dynactin 1 is an axon motor protein regulating retrograde transport of various proteins and vesicles including autophagosome. We previously demonstrated that the expression levels of dynactin 1 are markedly reduced in spinal motor neurons of sporadic ALS patients. We generated a *Caenorhabditis elegans* model in which the expression of *dnc-1*, the homolog of dynactin 1, is specifically knocked down in motor neurons. This model exhibited severe motor defects together with axonal and neuronal degeneration. We also observed the impaired movement and increased number of autophagosomes in the degenerated neurons. Furthermore, the combination of rapamycin, an activator of autophagy, and trichostatin which facilitates axonal transport dramatically ameliorated the motor phenotype and axonal degeneration of this model. Thus, our results suggest that decreased expression of dynactin 1 induces motor neuron degeneration and that the transport of autophagosomes is a novel and substantial therapeutic target for motor neuron degeneration.

(*Clin Neurol* 2013;53:1084–1086)

**Key words:** amyotrophic lateral sclerosis (ALS), motor neuron, axonal transport, dynactin 1, autophagy