

【目的】 ニューロンは神経活動に伴う間断ないイオン能動輸送のため多くの ATP エネルギーを要する。特に未成熟なニューロンは、急速な突起伸長に伴う細胞骨格再編成と細胞内輸送に莫大な ATP エネルギーを必要とし、ミトコンドリアを盛んに生合成して突起全長へ運搬することが明らかになっている。近年ミトコンドリア分裂・融合および共役する品質管理、生合成の細胞分子機構は急速に解明されているが、ニューロンのような活動状態が時空間的に激しく変動する細胞において、ミトコンドリアダイナミクスの平衡が如何に動的に制御されるかは明らかでない。本研究では、海馬錐体ニューロンの神経活動依存的な樹状突起発達において、ミトコンドリア分裂・融合の時空間ダイナミクスとその制御機構を明らかにすることを目標とした。

【方法】 1. ライブ観察：マウス胎児から採取した海馬ニューロンを初代培養し、pAAV-CAG-mitoDsRed を導入してミトコンドリア動態を、スピニングディスク共焦点顕微鏡 CV1000 を用いて観察した。AMPK 活性は AMPKAR-EV および jRGECO1a を導入したニューロンを用いて蛍光顕微鏡 IX83 で 5 秒間隔 5 分間解析した。TMRM 計測は、mito-GFP を導入した培養ニューロンを 20 nM TMRM で 1~2 時間処理したのち CV1000 を用いて 5 秒間隔 10 分間行った。活性酸素発生は、mito-SOX を導入したニューロンを CV1000 で観察して定量評価した。2. 免疫染色：培養ニューロンを 4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.25%TritonX-100/PBS で透過処理した。一次抗体と二次抗体で反応後、レーザー共焦点顕微鏡 FV1000 で観察した。

【結果】 培養下でシナプス形成前の未熟な海馬ニューロンの自発発火を抑制し、成長を遅延させた樹状突起では、ミトコンドリア分裂が阻害され長大化していた。この時期に活性が上昇する AMPK を shRNA ノックダウンすると、神経活動の抑制と同様に樹状突起成長が遅延し、ミトコンドリア分裂が阻害され長大化した。AMPK 活性を FRET プローブでライブ観察すると、カルシウムスパイクと同期して振動しており、カルシウム依存性 CaMKK2 の制御を受けることが明らかになった。さらに神経活動は AMPK を介してミトコンドリア分裂制御因子 MFF とオートファジー制御因子 ULK1 を活性化することが明らかになった。AMPK 欠損下では樹状突起ミトコンドリア呼吸が低下する兆候が認められた。以上の結果より、神経活動が CaMKK2-AMPK 経路を活性化し、樹状突起成長に必要なミトコンドリア品質管理を制御することが明らかになった。

発達中の樹状突起における神経活動によるミトコンドリア品質管理の分子経路

