

運動ニューロンの傷害／修復に 関わるグリコーゲン代謝の研究

2015 年 3 月

竹澤 洋亮

目次

1. 緒論 3～4
2. 実験材料と方法 5～11
2.1 ラットの顔面神経切断系	
2.2 脳各部位と顔面神経核の採取	
2.3 グリコーゲン抽出法および定量法	
2.4 免疫組織化学	
2.5 ウェスタンブロット法	
2.6 ニッスル染色	
2.7 統計解析	
3. 結果 12～34
3.1 顔面神経傷害後の運動ニューロンおよびグリア細胞の変化	
3.2 傷害顔面神経核におけるグリコーゲン定量	
3.3 グリコーゲン抗体を用いた免疫組織化学	
3.4 グリコーゲンを合成する細胞種の同定	
3.5 グリコーゲン合成酵素（GS）の解析	
3.6 グリコーゲンホスホリラーゼ（GP）の解析	
3.7 傷害運動ニューロンの生存性	
4. 考察 35～40
4.1 傷害運動ニューロンのエネルギー代謝	
4.2 グリコーゲンの測定法と検出法	
4.3 グリコーゲン合成／分解の分子機構	
4.4 運動ニューロンはどこからグルコースを入手するのか	
4.5 運動ニューロンにおけるグリコーゲン蓄積の意義	
4.6 神経疾患とグリコーゲン代謝の関連性	
4.7 傷害運動ニューロンにおけるグリコーゲン調節の概要	
5. 結論 41
6. 謝辞 42
7. 参考文献 43～46

1. 緒論

一般的に、中枢ニューロンは脆弱であり傷害を受けると致死に至ることが多い。一方、末梢の運動ニューロンは、傷害を受けても、修復・再生する細胞として知られている。傷害運動ニューロンが、なぜ生存し修復されるのか、という問いに対しては、「周囲から神経栄養因子が供給されるため」と説明されているが、そのメカニズムが解明された訳ではない。近年、その運動ニューロンの生存・修復には、エネルギー代謝が関わっている可能性が指摘されている。すなわち、傷害後に、周囲から十分なエネルギーが供給されるために、運動ニューロンが生存できるという考えである。しかし、そのような研究は、実験系や解析法の問題もあり、ほとんど進展がなかった。

私は、ラットの顔面神経傷害系を使用することにより、運動ニューロンの生存・修復におけるエネルギー代謝が解析できるのではないかと考えた。なぜなら、この運動ニューロンの傷害系は、血液・脳関門を破壊することがないので (Graeber et al., 1998)、血液成分や細胞の浸潤なしに、運動ニューロン細胞体周囲の環境を調べることができるという利点を持っているからである。また、運動ニューロンの存在する顔面神経核は、左右一対あるので、非傷害側は、コントロールとして使用できること、さらには、顔面神経核は、免疫組織化学的観察と共に、切り出して特定分子の検出や活性測定も可能であることから、これまで知られていない新知見や証拠が得られる可能性が高いと考えられた。

成熟ラットの顔面神経を傷害すると、数日後から、運動ニューロンのコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase; ChAT) および小胞型アセチルコリントランスポーター (vesicular acetylcholine transporter; VAChT) が減少し始める (Ichimiya et al., 2013)。この時、運動ニューロン細胞体周囲のミクログリアは、形態変化を起こした後、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 及びサイクリン (A および D) の発現を増加させ増殖期に入る (Yamamoto et al., 2010)。一方、アストロサイトは、増殖はしないが、中間系フィラメントである glial fibrillary acidic protein (GFAP) を増加させて、活性化状態に入る (Graeber and Kreutzberg, 1988)。これらの組織再編成とも言える一連の細胞レベルの変化は、活発なタンパク質の合成や DNA の複製を伴うことから、かなり多量のエネルギーが投入されると推

測されてきた。

神経系で消費されるエネルギー源の大部分は、血中由来のグルコースであると言われていたので、実質内でエネルギー需要が高まった場合には、この取り込みが増加すると予測された。実際、ラットの傷害顔面神経核（Kreutzberg and Emmert, 1980; Ito et al., 1999）およびラットの傷害舌下神経核（Smith et al., 1984）では、グルコースの取込みが増加するという結果が報告されている。一方、緊急時には、実質内のグリコーゲンからグルコースが供給される可能性も示唆されている。Woolf ら（1984）は、ラットの座骨神経傷害系で、傷害された脊髄運動ニューロンが、グリコーゲンホスホリラーゼを著しく活性化する現象、すなわちグリコーゲン分解が促進する現象を観察している。傷害時、グリコーゲン量が増加するという結果も、ニワトリの脊髄運動ニューロン（Jirmanova, 1971）や発達途上のラット舌下神経核および顔面神経核の運動ニューロン（Borke and Nau, 1984）で報告されている。これらの知見は、発達期の運動ニューロンや傷害運動ニューロンが、グリコーゲンを分解したり、または合成することによって、グルコース/エネルギー供給を調節していることを示唆している。しかし、運動ニューロンが傷害された後、グリコーゲン量がどのように変動するのか、また、その変動は、どんなメカニズムで調節されるかについての情報は、ほとんどない。

そこで本研究では、ラットの顔面神経傷害系を用いて、傷害核におけるグリコーゲン量を定量解析し、その変動を細胞レベルで示すと共に、グリコーゲン合成/分解酵素の調節から証明することを目的とした。

2. 実験材料と方法

2.1 ラットの顔面神経切断系

エーテル麻酔下に、生後 8 週齢の雄ウイスターラットの右側顔面神経を茎乳突孔の位置で切断した (Nakajima et al., 1996) (図 1)。その後、1、3、5、7、14、21、28、35 日目にエーテル麻酔下で断頭し、全脳を摘出し -80°C で保存した。実験動物の扱いは、創価大学倫理規定に基づいて行った。

2.2 脳各部位と顔面神経核の採取

2.2.1 グリコーゲン定量用の試料

凍結脳から大脳皮質、小脳皮質、脳幹部分を切り出し、各々、湿重量 (mg) を測定した。肝臓も同様に切り出し、湿重量 (mg) を測定した。脳幹に存在する顔面神経核は、常法により、傷害側 (R 側) とコントロール側 (L 側) を切り出し、それぞれの湿重量 (mg) を計測した。

2.2.2 ウェスタンブロットおよび免疫組織化学用の試料

常法により、脳幹部分から、傷害側 (R 側) とコントロール側 (L 側) の顔面神経核をそれぞれ切り出し、ウェスタンブロット用の試料として使用した (2.5 に記載)。

また、組織切片調製用の脳は、 -20°C に移動して保存した (2.4 に記載)。

2.3 グリコーゲン抽出法および定量法

グリコーゲンの抽出には、アルカリ抽出法を採用した (Varkonyi et al., 1980)。2.2.1 で調製した各組織片 (2~3 mg) に 30% 水酸化カリウム溶液を 1 ml 加え、 100°C で 15 分間加熱した。室温まで冷却後、96% エタノールを 1.75 ml 添加し、5 分間静置した。その後、 4°C で $330\text{ g} \times 7$ 分間の遠心を行い、グリコーゲンを沈殿させた。上澄み液を取り除き、その沈殿物 (グリコーゲン) に再度 96% エタノールを添加し、遠心、洗浄した。

グリコーゲンは、硫酸を使用して分解した。グリコーゲンを含む試験管に 2 mol/L の硫酸を 1 ml 加え、100°C 中で 2 時間煮沸を行った。続いて、2 mol/L の水酸化ナトリウムを 1 ml を混合し中和した。

グリコーゲン（グルコース）の定量はアントロン硫酸法（Fong et al., 1953）に基づいて、次のように行った。既知量（0–50 µg）のグリコーゲン（グルコース）または試料を試験管に取り、全量を蒸留水で 0.2 ml に調整し、氷冷しながら、アントロン試薬（0.2% アントロン/13.7 M 硫酸）を 1.2 ml ずつ滴下した。次に、その混合液を 100°C で 10 分間、加熱した。冷却後、620 nm における吸光度を測定した。検量線（0–50 µg グリコーゲン）から未知試料中のグリコーゲン量を求めた。各脳組織および顔面神経核中のグリコーゲン量は、湿重量当たり（mg）で算出した。

2.4 免疫組織化学

肝臓および脳幹（顔面神経核を含む部分）の凍結切片（厚さ 10 µm）は、常法により、クリオスタットを使用して作製した。

一般的な抗体を使った免疫組織染色の場合は、各切片を 20 分間風乾させた後、固定液 [3.7%ホルマリン、0.1 M リン酸バッファー（PBS; pH 7.4）] に 5 分間浸漬した。しかし、グリコーゲン抗体を使用した免疫組織染色の場合は、4%パラホルムアルデヒド含む 10 mM PBS/NaCl（0.16 M NaCl/10 mM PBS buffer）を用いて、4°C、30 分間の固定を行った。

固定後、切片は、50%/100%/50%アセトンで各 2 分/3 分/2 分間処理をし、さらに 0.1% TritonX-100/10 mM PBS/NaCl で 5 分間処理を行った。ブロッキングは、0.2%スキムミルク及び 0.067% BSA 含む 10 mM PBS/NaCl を用いて、室温で 1 時間行った。

グリコーゲンの単一染色では、グリコーゲン抗体（1:400 希釈）を 4°C で 16 時間反応させた後、二次抗体として Alexa Fluor 488-抗マウス IgM 抗体（1:100 希釈）を 4°C で 16 時間反応させた。

グリコーゲンと運動ニューロンマーカー（NR3B）またはグリコーゲンとアストロサイトのマーカー（GFAP）との二重染色は、次のように行った。ひとつめの一次抗体として、グ

リコーゲン抗体（1:400 希釈）を 4°C で 16 時間反応させ、続いてふたつめの一次抗体として、NR3B 抗体（1:400 希釈）または GFAP 抗体（1:1000 希釈）を 4°C で 16 時間、反応させた（表 1）。10 mM PBS/NaCl で十分に洗浄後、二次抗体として、Alexa Fluor 488-抗マウス IgM 抗体（1:100 希釈）および Alexa Fluor 568-抗ウサギ IgG 抗体（1:200 希釈）を 4°C、16 時間後反応させた（表 1）。

切片は洗浄後、エタノール希釈系列（70、90、95、100%）、イソプロパノールおよびキシレンに各 2 分間浸け、最後に Vecta Mount 剤で封入を行った。染色標本は、蛍光顕微鏡（BZ-9000、Keyence）を用いて観察した。

2.5 ウェスタンブロット法

脳幹から切り出した各顔面神経核（前述）に、ホスファターゼ阻害剤（1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄）を含む非還元性組織溶解液 [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.3% SDS, 10% glycerol] を添加し、超音波破碎を行った。100,000 g、30 分間の遠心後、上清を回収して組織抽出液とした。一部を使用してタンパク質量を測定し（Lowry et al., 1951）、残りの試料にはメルカプトエタノールが 2.5% になるように添加した。

組織抽出液は、14% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-電気泳動を行い、ゲル上のタンパク質はイモビロン（Millipore）上に転写した。イモビロンは、2% スキムミルクを含む TNw 溶液 [10 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.01% Tween 20] でブロッキング処理を行った。リン酸化タンパク質を検出する場合は、2.5% BSA, 0.5% スキムミルクを含む TNw をブロッキング液として使用した。

次に、表 2 に示す一次抗体を、4°C で 16 時間反応させた。イモビロンは TNw で十分に洗浄し、二次抗体として、抗ウサギ IgG-HRP 抗体(1:1000 希釈)、抗マウス IgG-HRP 抗体（1:1000 希釈）または、抗ヤギ IgG-HRP（1:1000 希釈）を使用した（表 2）。洗浄後、抗原・抗体複合体は ECL（GE Health Care）を使用して発光させ、X 線フィルム上に感光させた。

2.6 ニッスル染色

脳幹の凍結切片を、室温で 20 分間風乾した後、エタノール系列 (30、50、70、95、100%) で脱水固定を行った。次に、その切片を、0.5% クレシルバイオレット/1 M 酢酸バッファー (pH 3.9) に 1 時間浸漬した。染色された切片は、流水により 10 分間洗浄し、上記 (2.4) に従って、脱水と封入を行った。標本の観察には、蛍光顕微鏡 (BZ-9000、Keyence) を用いた。

2.7 統計解析

グリコーゲン測定の結果は、平均値±標準偏差で示した。また、イムノブロットにおけるタンパク質のバンドの濃度はデンストメーターで測定し、平均値±標準偏差で表した。

コントロール核と傷害核の間に差があるかどうかの判定は、two-tailed unpaired Student's t-test によって行った。場合によっては、ANOVA 法による検定も行った。 $P < 0.05$ で有意差があると判定した ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。有意差がない場合は ns (not significant) とした。

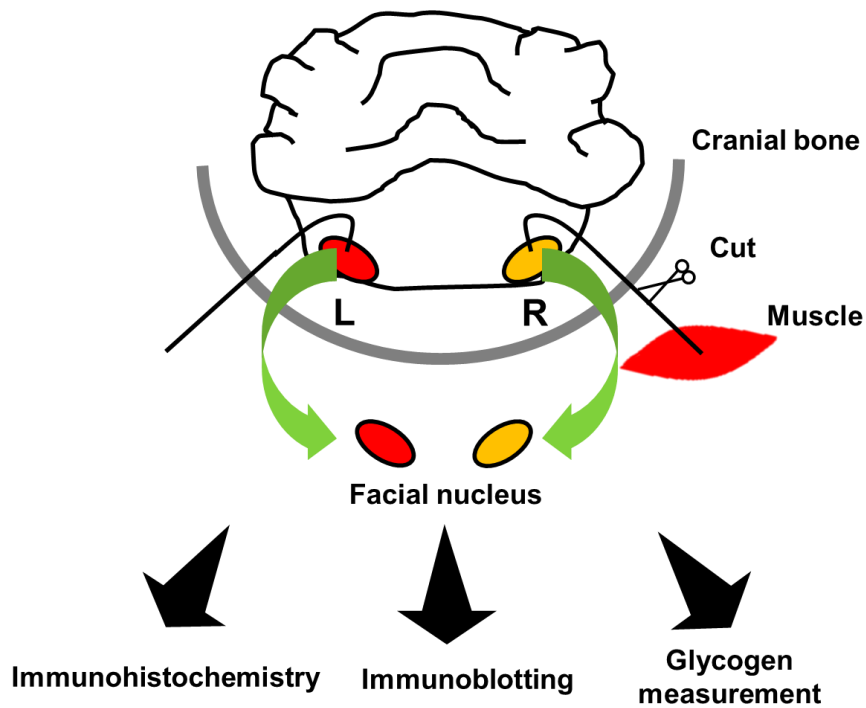


図1 ラットの顔面神経傷害系

成熟ウイスターラット（生後 8 週齢の雄）の右側顔面神経線維を、茎乳突孔の位置で切断した。切断後、経時的（1、3、5、7、14、21、28、35 日め）に全脳を摘出・保存した。傷害顔面神経核（R）およびコントロール神経核（L）を切除し、グリコーゲン定量、免疫組織化学法、およびイムノブロットの試料とした。

表 1 免疫組織化学的染色に使用した抗体

一次抗体

Antibody	Host	Source	Dilution
Glycogen	mouse	Baba (1993)	1:400
GFAP	rabbit	Millipore	1:1000
NR3B	rabbit	Abcam	1:400
GS	mouse	Santa Cruz Biotechnology	1:200

二次抗体

Antibody	Host	Source	Dilution
Alexa Fluor 488 anti-mouse IgM	goat	Invitrogen	1:100
Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG	goat	Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG	goat	Invitrogen	1:100

表 2 ウェスタンブロットに使用した抗体

一次抗体

Antibody	Host	Source	Dilution
ChAT	mouse	Millipore	1:1000
VAchT	goat	Millipore	1:1000
Actin	goat	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Iba1	rabbit	Wako	1:1000
GFAP	mouse	Millipore	1:1000
GS	rabbit	OriGene	1:40000
phospho-GS (Ser641)	rabbit	Cell Signaling	1:1000
GP1	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1:500
GP2	rabbit	Proteintech	1:8000

二次抗体

Antibody	Host	Source	Dilution
anti-rabbit IgG-HRP	bovine	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-goat IgG-HRP	donkey	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-mouse IgG-HRP	goat	Santa Cruz Biotechnology	1:1000

3. 結果

3.1 顔面神経傷害後の運動ニューロンおよびグリア細胞の変化

ラットの顔面神経繊維を切断した時（運動ニューロンの軸索を切断した時）に、運動ニューロン細胞体のある神経核で起こる反応性の確認を行った。最初に、顔面神経の切断傷害に対する運動ニューロンの応答性を調べた。ラットの顔面神経を傷害し、1、3、5、7、14、21、28、35 日後に、両顔面神経核を切り出し、イムノブロットによる解析を行った。運動ニューロンに特異的に存在する ChAT および VAChT のレベルは、傷害後 3–14 日で顕著な減少を示し、14 日目ではコントロール側の 10–20%に低下した。しかし、その後、どちらの分子も 35 日にかけて徐々にコントロール側のレベルまで回復することが分かった（図 2）。

次に、傷害神経核におけるグリア細胞の応答性について検討した。ミクログリアについては、特異的な抗原である ionized Ca^{2+} binding adaptor molecule 1 (Iba1) の発現量を調べた。その結果、切断側の Iba1 量は、傷害 3 日後に増加し始め、5 日目をピークとし、それ以降は次第に減少する傾向を示した（図 3）。この Iba1 の応答性は、ミクログリアの増殖によって起こることが知られている。一方、アストロサイトは、特異的な中間系フィラメントである GFAP をマーカーとして調べたところ、切断側で、5–14 日後に増加する傾向が観察され、21–35 日後になるとその増加は顕著になった。免疫組織化学的観察によると、GFAP は、アストロサイトの細胞体および伸長した突起で増加していた。この形態的に変化したアストロサイトは、機能的にも活性化状態と考えられた。しかし、どの時期においても、アストロサイトの増殖は認められなかった。このように、アストロサイトはミクログリアとは異なり、増殖はしないが、長期にわたり活性化状態が続くことが示された（図 3）。

以上、傷害運動ニューロンの変化およびグリア細胞の応答性は、過去に報告された結果（Yamamoto et al., 2010; Ichimiya et al., 2013）とよく一致していることから、動物実験が適切に行われたと考えられた。従って、以後の解析には、これら信頼性の確認された試料が使用された。

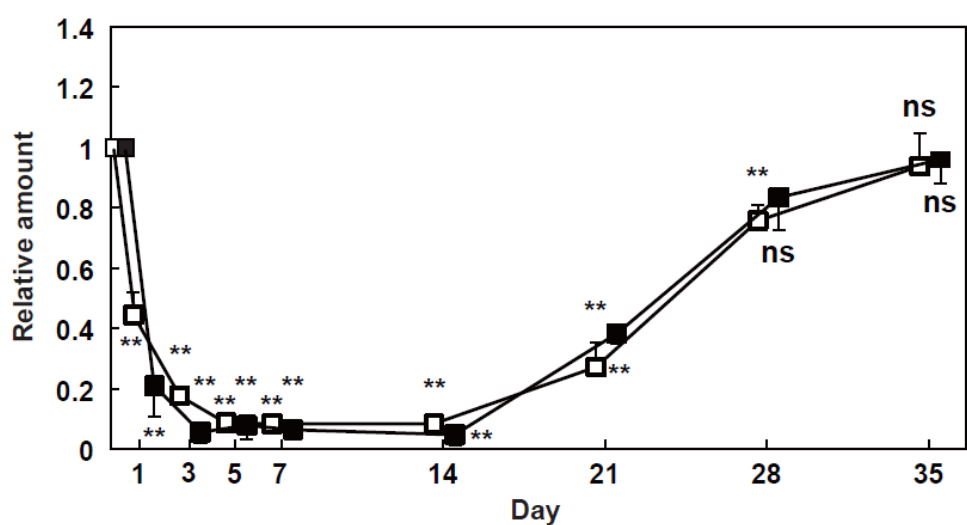
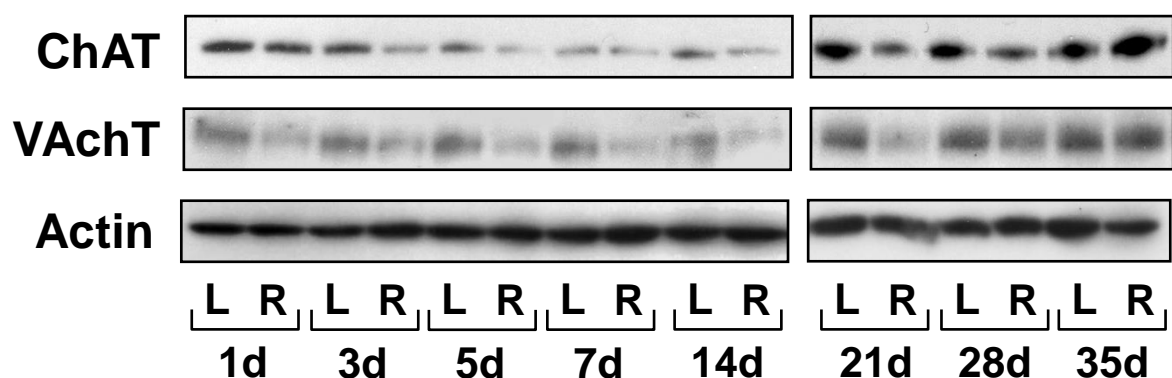


図2 運動ニューロンの応答性

顔面神経の傷害後、1、3、5、7、14、21、28、35日に、顔面神経核の傷害側（R）とコントロール側（L）を切り出し、ウェスタンブロットによって、ChAT, VAChTおよび Actin の発現量を調べた。ChAT（□）および VAChT（■）は、バンドの濃さをデンストメータで測定後、コントロール側の値を 1 としたときの相対量で示した。両神経核間の有意差は、unpaired two-tailed Student's t-test により判定した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n=3)。

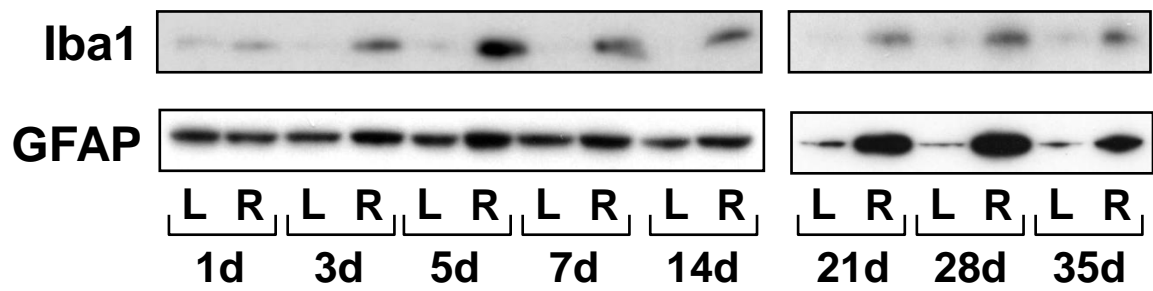


図3 グリア細胞の応答性

右側顔面神経を切断し、0、1、3、5、7、14、21、28、35 日後に、コントロール側（L）および切断側（R）の顔面神経核を切り取り、ウェスタンブロットにより Iba1 および GFAP の発現性を調べた。

3.2 傷害顔面神経核におけるグリコーゲン定量

最初に、グリコーゲンの高感度測定法として知られているアントロン硫酸法の定量性および感度の確認を行った。その結果、標準グリコーゲン量 (0–10 μg) と吸光度の間には、非常に良い直線関係が得られた (図 4a)。また、一試料あたり約 2.0 μg のグリコーゲンでも、検出可能であることがわかった。

次に、少量 (2–3 mg 湿重量) の組織を用いた時に、グリコーゲンの定量が可能かどうかを調べてみた。その結果、肝臓 (Liver) では $121.9 \pm 8.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、大脳皮質 (Cbr)、小脳皮質 (Cbe)、脳幹 (Bs) では、それぞれ $1.9 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $3.0 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $2.9 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ という値が得られた (図 4b)。この各組織のグリコーゲン量は、過去に報告された数値 (Brown and Ransom, 2007) と同等であった。従って、アントロン硫酸法を使用することにより、少量の神経組織 (2–3 mg 湿重量) でも、グリコーゲンが測定できると考えられた。

そこで、顔面神経切断後、経時的 (1、3、5、7、14、21、28、35 日) に回収したコントロール核および傷害核のグリコーゲン量の定量を行った。傷害側のグリコーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) を、コントロール側のグリコーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) を 1 としたときの相対値として示すと、グリコーゲン量は 1 日後から増加する傾向 (1.25 ± 0.16 , $P=0.15$) が見られたが、5 日目から有意な増加 (1.38 ± 0.10 , $*P=0.033$) が観察され、7 日後には最大 (1.88 ± 0.03 , $**P=0.0005$) となった。しかし、14 日以降は減少し始め (1.29 ± 0.08 , $*P=0.037$)、21 日ではほとんどコントロール核レベル (1.05 ± 0.05 , $P=0.27$) に戻った (図 5a)。従って、傷害神経核のグリコーゲン量は、傷害後 7 日に最大値をとる一過性の増加を示すことが明らかになった。

また、上記の結果とは別に、傷害後 1、7、21 日の両神経核におけるグリコーゲン量を測定し、組織湿重量あたり ($\mu\text{g}/\text{mg}$) で表してみた。その結果、傷害後 1 日では、傷害側の増加は認められなかったが ($P=0.495$)、傷害後 7 日では有意な増加 ($*P=0.016$) を示した。しかし、傷害後 21 日では、両核における差は認められなかった ($P=0.615$; 図 5b)。各コントロール核のグリコーゲン量にも有意な差は認められなかった。このように、組織湿重量

あたり ($\mu\text{g}/\text{mg}$) の表記法によっても、傷害後 7 日にグリコーゲンの増加することが確認された。

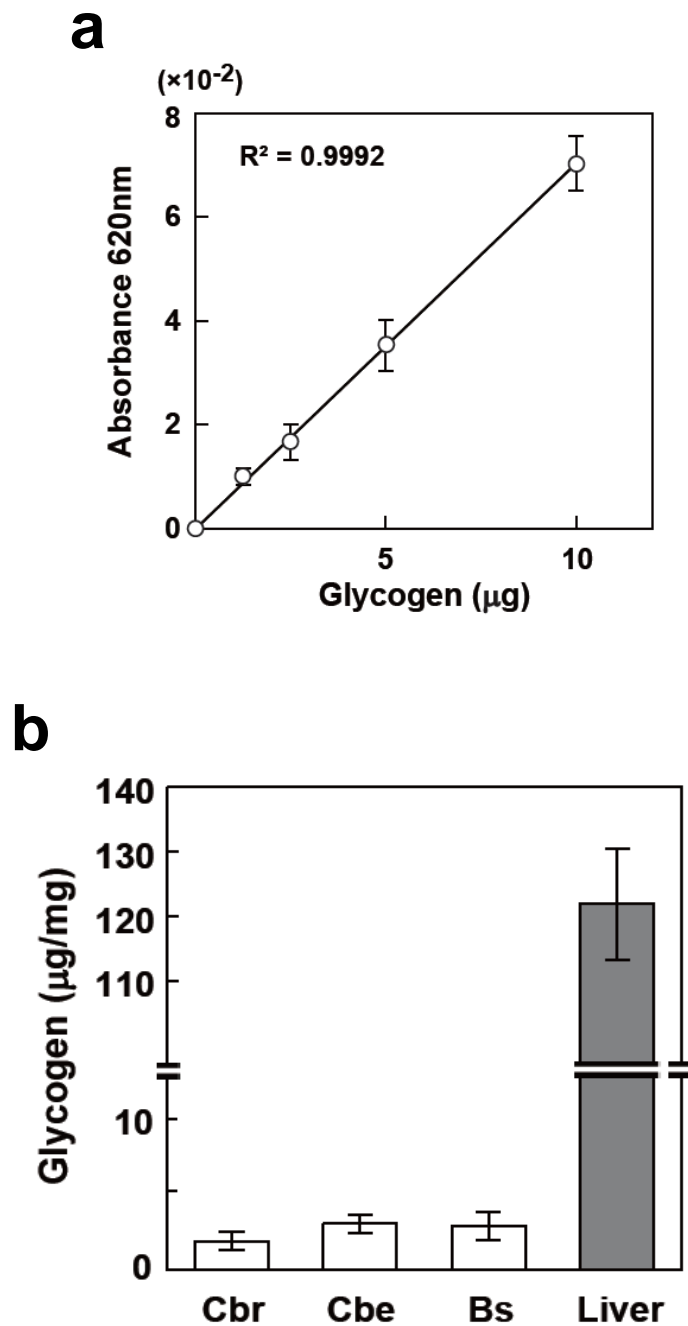


図4 アントロン硫酸法によるグリコーゲンの定量

(a) 標準グリコーゲン (0、2.5、5.0、10.0 μg) を用いて、アントロン硫酸法によって発色反応を行った ($n=3$)。 (b) 大脳皮質 (Cbr)、小脳皮質 (Cbe)、脳幹 (Bs) の脳各部位と肝臓 (Liver) の組織を用いて、その中のグリコーゲンの定量を行った。測定値はそれぞれ、 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (湿重量) で表した ($n=3$)。

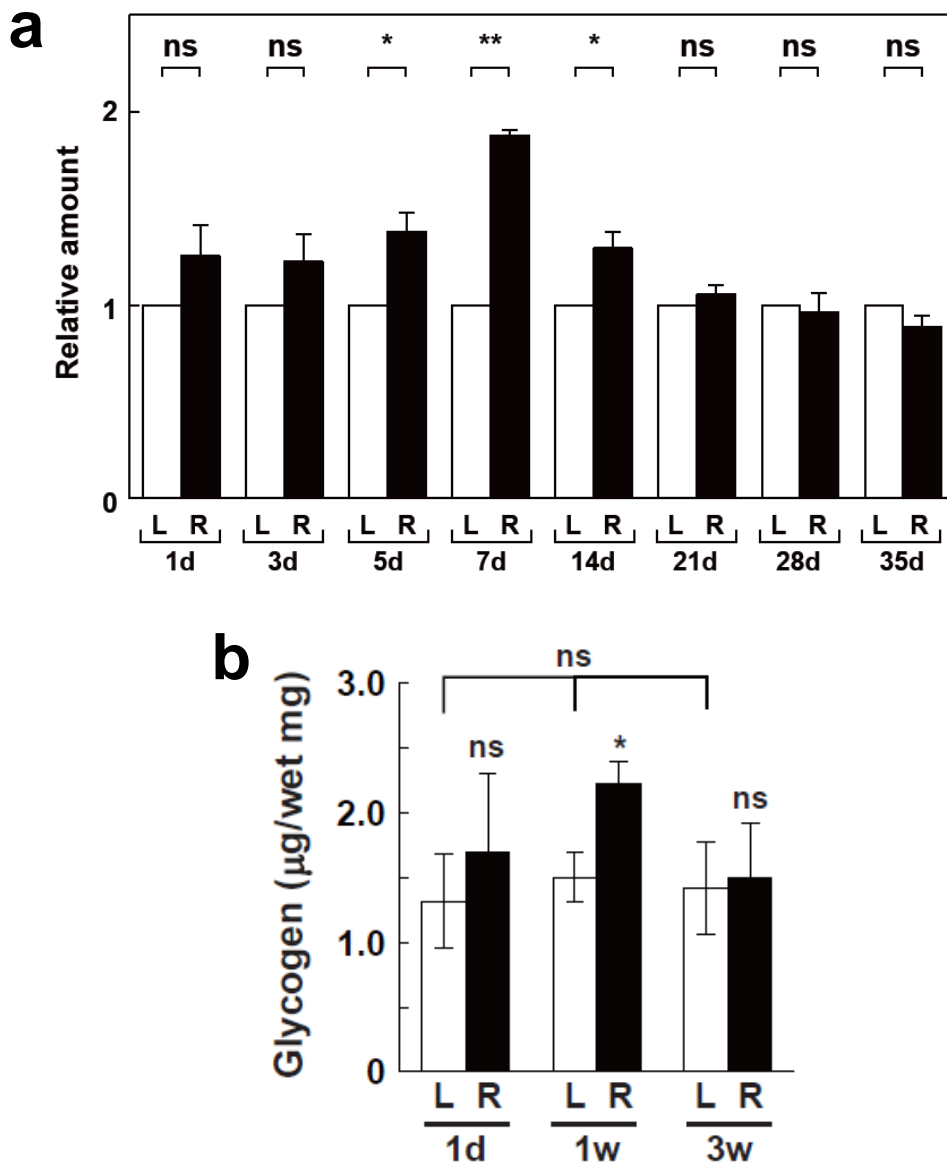


図5 傷害顔面神経核のグリコーゲン量

顔面神経を切断し1、3、5、7、14、21、28、35日後に、コントロール核（L）と傷害核（R）を回収し、アントロン硫酸法によってグリコーゲンを測定した。(a) 測定値は、 $\mu\text{g/mg}$ （湿重量）で表し、傷害核の値はコントロール側の値を1としたときの相対値で示した。両神経核間の有意差は、unpaired two-tailed Student's t-test により判定した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ ($n=3$)。 (b) 顔面神経傷害後1、7、21日におけるコントロール核（L）と傷害核（R）のグリコーゲン量（ $\mu\text{g/mg}$ ）は、それぞれ白カラムと黒カラムで表した。両神経核間およびコントロール群（L）の有意差の判定は、それぞれ unpaired two-tailed Student's t-test と ANOVA 法により判断した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ ($n=3$)。

3.3 グリコーゲン抗体を用いた免疫組織化学

神経組織中のグリコーゲンを高感度に検出するために、グリコーゲン抗体 (Baba, 1993) を使用した蛍光組織染色法の採用を考えた。

最初に、肝臓の組織切片を用いて、グリコーゲン抗体の特異性を確認する実験を行った。切片にグリコーゲン抗体を加えない場合、染色性は全く見られなかった (図 6 の左)。一方、グリコーゲン抗体を添加した場合には、広範囲にわたりグリコーゲンの顆粒が観察された (図 6 の中央)。しかし、組織切片を α -アミラーゼで前処理すると、グリコーゲン抗体を作用させても染色性は観察されなかった (図 6 の右)。従って、この抗体は、Baba (1993) が報告しているように、グリコーゲンを特異的に認識すると考えられた。

次に、この染色法によって、顔面神経核のグリコーゲンを調べることにした。神経傷害後 1 日の脳幹切片では、グリコーゲン顆粒がところどころに観察されたが、コントロール核 (Ct) と傷害核 (Op) におけるグリコーゲンの染色性には、違いは認められなかった (図 7 の左)。しかし、傷害後 7 日では、傷害側において、より多くのグリコーゲン顆粒が染色された (図 7 の中央)。傷害後 21 日になると、再び、両神経核における染色性に差が見られなくなった (図 7 の右)。このように、グリコーゲン抗体を使用した免疫組織化学によっても、傷害顔面神経核にグリコーゲンが一過性に増加することが示された。

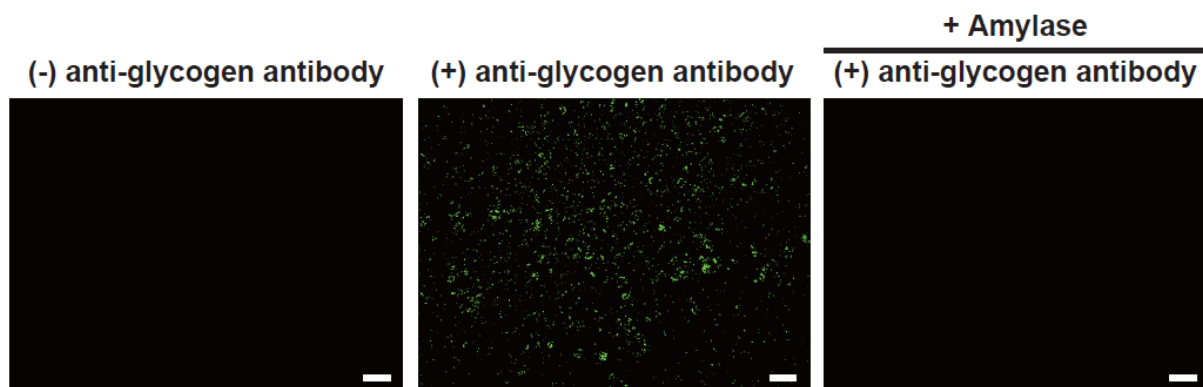


図 6 肝臓切片のグリコーゲン染色

ラット肝臓の凍結切片を調製し、グリコーゲン抗体を使用した免疫蛍光染色を行った。グリコーゲン抗体を加えない場合（左）、グリコーゲン抗体を加えた場合（中）、 α -アミラーゼ前処理を行った後、グリコーゲン抗体を加えた場合（右）の結果をそれぞれ示す。スケールバーは 50 μm を表す。

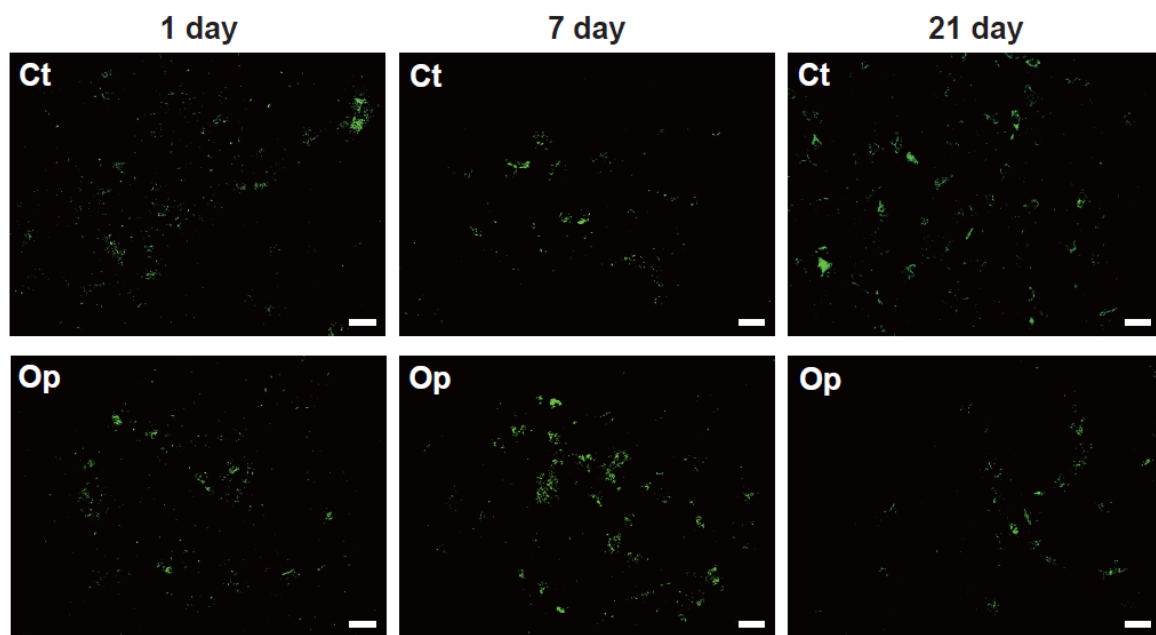


図7 顔面神経核のグリコーゲン染色

顔面神経を傷害し、1日（1 day）、7日（7 day）、21日（21 day）後に調製した脳幹切片を用いて、グリコーゲン抗体による免疫蛍光染色を行った。各ラットのコントロール核（Ct）の結果は上段に、傷害核（Op）の結果は下段に示した。スケールバーは50 μm を表す。

3.4 グリコーゲンを合成する細胞種の同定

顔面神経核にグリコーゲン顆粒の存在が明らかになったので、次に、そのグリコーゲン顆粒を合成する細胞種の同定を行った。蛍光二重染色により、神経傷害後 7 日の脳幹切片を染色した結果、グリコーゲン顆粒のほとんどは、運動ニューロンのマーカーである N-methyl-D-aspartate receptor 3B (NR3B; Matsuda et al., 2003) と共局在することが明らかになった。すなわち、グリコーゲンは、主に運動ニューロンの細胞体に存在することが示されたのである。拡大図では、この点がより明瞭に示されている (図 8)。

また、傷害核において、アストロサイトがグリコーゲンを発現している可能性も検討した。その結果、切断側に存在するグリコーゲン顆粒と GFAP 陽性アストロサイトの重なりは観察されなかった (図 9)。しかし、注意深い観察の結果、ごく一部のグリコーゲン顆粒は、アストロサイトにも局在することを確認することができた。従って、アストロサイトも、弱いながらグリコーゲン合成能を持つと推測された。

以上の結果より、傷害神経核における主要なグリコーゲン産生細胞は、運動ニューロンと判明した。

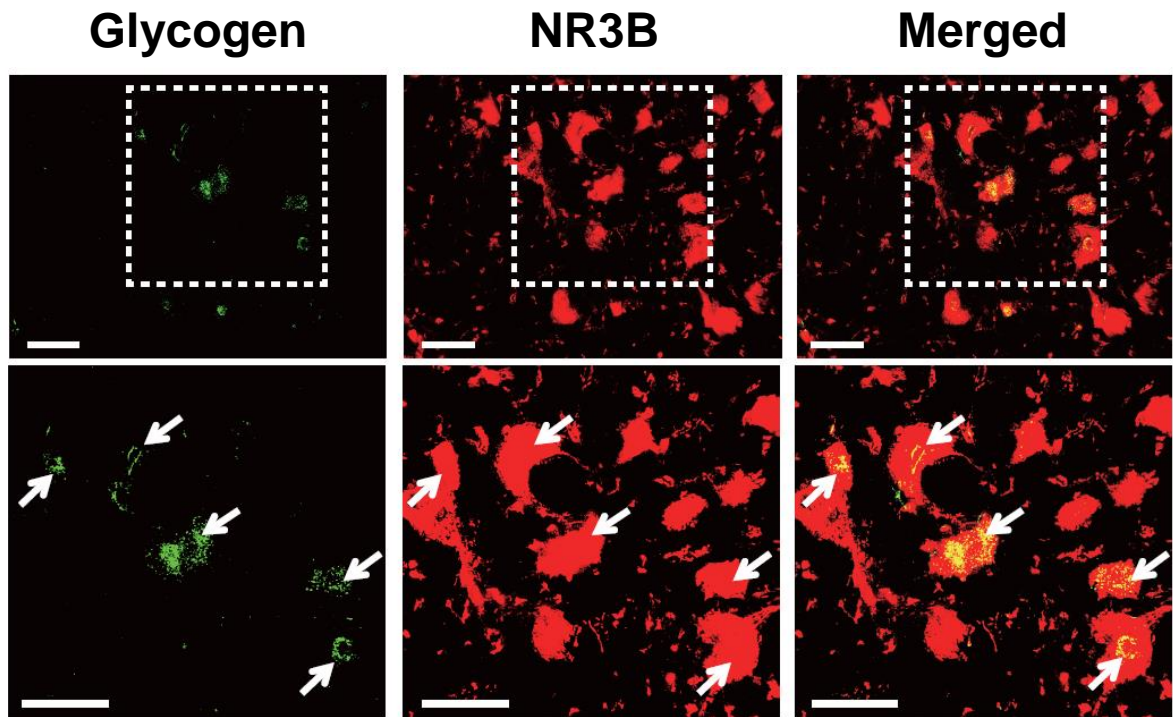


図8 グリコーゲンと運動ニューロンの共染色

顔面神経を切断し7日後に調製した脳幹切片を使用し、グリコーゲン抗体（左）と抗 NR3B 抗体（中）による蛍光二重染色を行った。これらの重ね合わせを右側（右）に示した。また、上段の白点線枠を拡大し、下段に示した。矢印は運動ニューロンに重なるグリコーゲンを示している。スケールバーは 50 μm を表す。

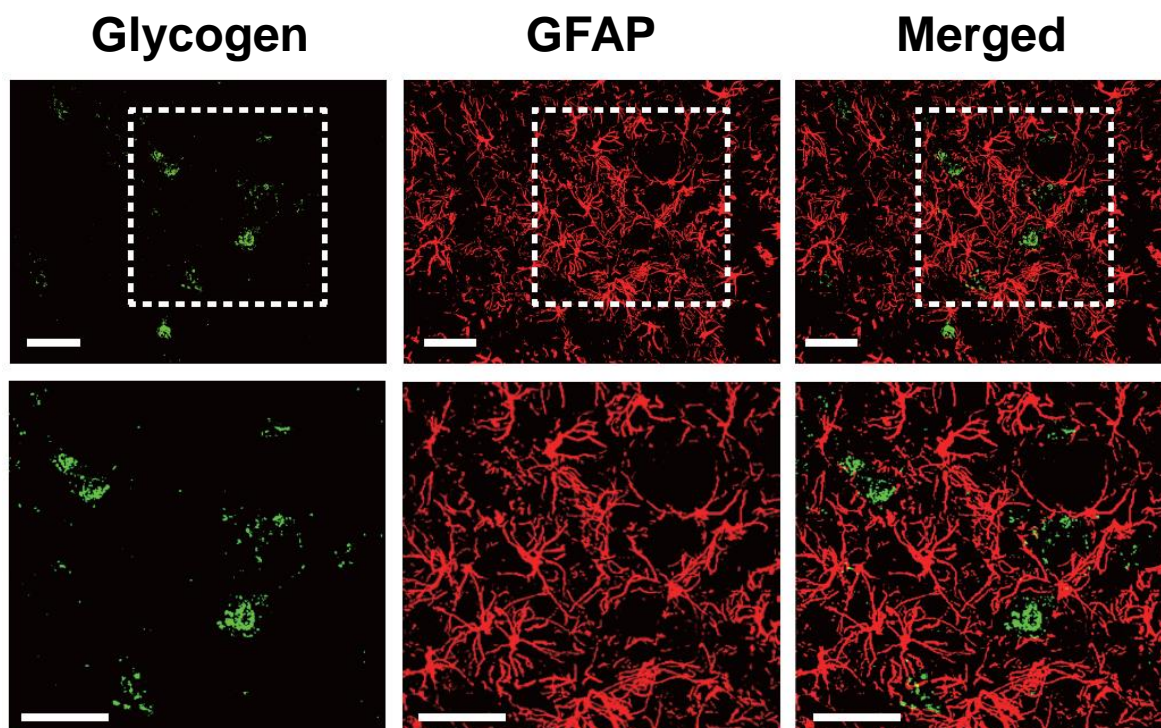


図9 グリコーゲンとアストロサイトの共染色

顔面神経を切断し、7日後に調製した脳幹切片を使用し、グリコーゲン抗体（左）と GFAP 抗体（中）による蛍光二重染色を行った。これらを重ね合わせた図は、右側（右）に示した。上段の白点線枠を拡大し、下段に示した。スケールバーは 50 μm を表す。

3.5 グリコーゲン合成酵素（GS）の解析

前述（図 5）したように、傷害核のグリコーゲンレベルが一過性に増加する現象を考えると、傷害後 1–5 日の期間では活性型のグリコーゲン合成酵素（GS）が増加し、7 日以降になると減少するのではないかと推測された。この仮説を検証するため、コントロール核と傷害核における総 GS（GS）量および不活性型のリン酸化 GS（pGS）量を解析することにした。実験は、傷害後 14 日まで（前半部）と傷害後 21–35 日（後半部）の 2 つに分けて行った。

3.5.1 傷害後 14 日までの結果

前半部における傷害核の GS 量は、傷害後 1–5 日までは、コントロール核とほとんど変化がないが、7–14 日になると顕著に低下することがわかった（図 10a, b）。14 日目では、コントロール核の約 50%に低下していた。一方、不活性型であるリン酸化 GS（pGS）は、傷害側で、傷害後 1–3 日の期間、顕著な減少が認められたが、5 日の時点ではコントロール核との差が見られなくなった（図 10a, c）。しかし、傷害後 7–14 日になると、傷害核の pGS レベルは、コントロール側に対して、逆に約 20–30%増加することが明らかになった（図 10a, c）。

グリコーゲンの合成が活発か不活発かは、脱リン酸化された活性型 GS とリン酸化された不活性型 GS の割合によって決まるので、総 GS (GS) に対する不活性型リン酸化 GS (pGS) の割合、すなわち pGS/GS 比を算出することにより推測した。その結果、傷害核の pGS/GS 比は、傷害後 1 日めに有意に低下し (0.40)、3 日にも低下傾向 (0.66) を示した（図 10d）。しかし、傷害後 7–14 日になると、pGS/GS 比は、逆に、有意に増加することが判明した（図 10d）。傷害後 7 日の pGS/GS 比は、コントロール核と比較して、2 倍以上高い値 (2.3) を示した。これらの結果は、傷害後の早期（1–5 日）においては、グリコーゲンが活発に合成されるが、7 日以降はその合成が停止することを示している。

3.5.2 傷害後 21–35 日までの結果

後半部（傷害後 14 日以降）の GS レベルを追跡したところ、傷害核で一旦低下したレベルが 21–35 日にかけて徐々に回復することが観察された（図 11a, b）。一方、傷害核の pGS レベルは、傷害後 21–35 日の期間で、ほとんど変化は見られなかった（図 11a, c）。従って、傷害核の pGS/GS 比は、傷害後 21 日にやや高い傾向があるものの（有意差なし）、28–35 日では差は認められなくなった（図 11d）。つまり、後期における傷害核のグリコーゲン合成能は、コントロール核のレベルに戻ると推測された。

3.5.3 GS の局在性

前述したように、顔面神経の傷害後 7–14 日に、傷害神経核では、グリコーゲン合成を行う GS タンパク質が約半分に減少したが、この GS の減少はどの細胞で起こっているかを調べてみた。

神経傷害後 14 日めの脳幹切片を用いて、蛍光二重染色法により調べてみると、コントロール核内（Ct）では、GS の陽性細胞が運動ニューロンのマーカーである NR3B と一致しており（図 12 の上段）、傷害核内（Op）でも、GS 染色性の低下が見られるものの GS 染色細胞と NR3B 陽性細胞は一致していた（図 12 の下段）。つまり、正常な運動ニューロンは GS タンパク質を一定量発現しているが、傷害を受けると、その GS タンパク質を減少させることが明らかになった。

また、グリア細胞が GS タンパク質の発現を抑制するという可能性についても同様に検討した。その結果、コントロール核（Ct）においても、傷害核（Op）においても、GFAP 陽性アストロサイトと GS 発現細胞は一致しなかった（図 13）。同様に、ミクログリアのマーカーである Iba1 も、GS の染色細胞とは一致しなかった。

以上の免疫組織化学の結果から、顔面神経核では、GS は、主に運動ニューロンに発現することが明らかにされた。従って、グリコーゲンも主に運動ニューロンに蓄積すると考えられた。

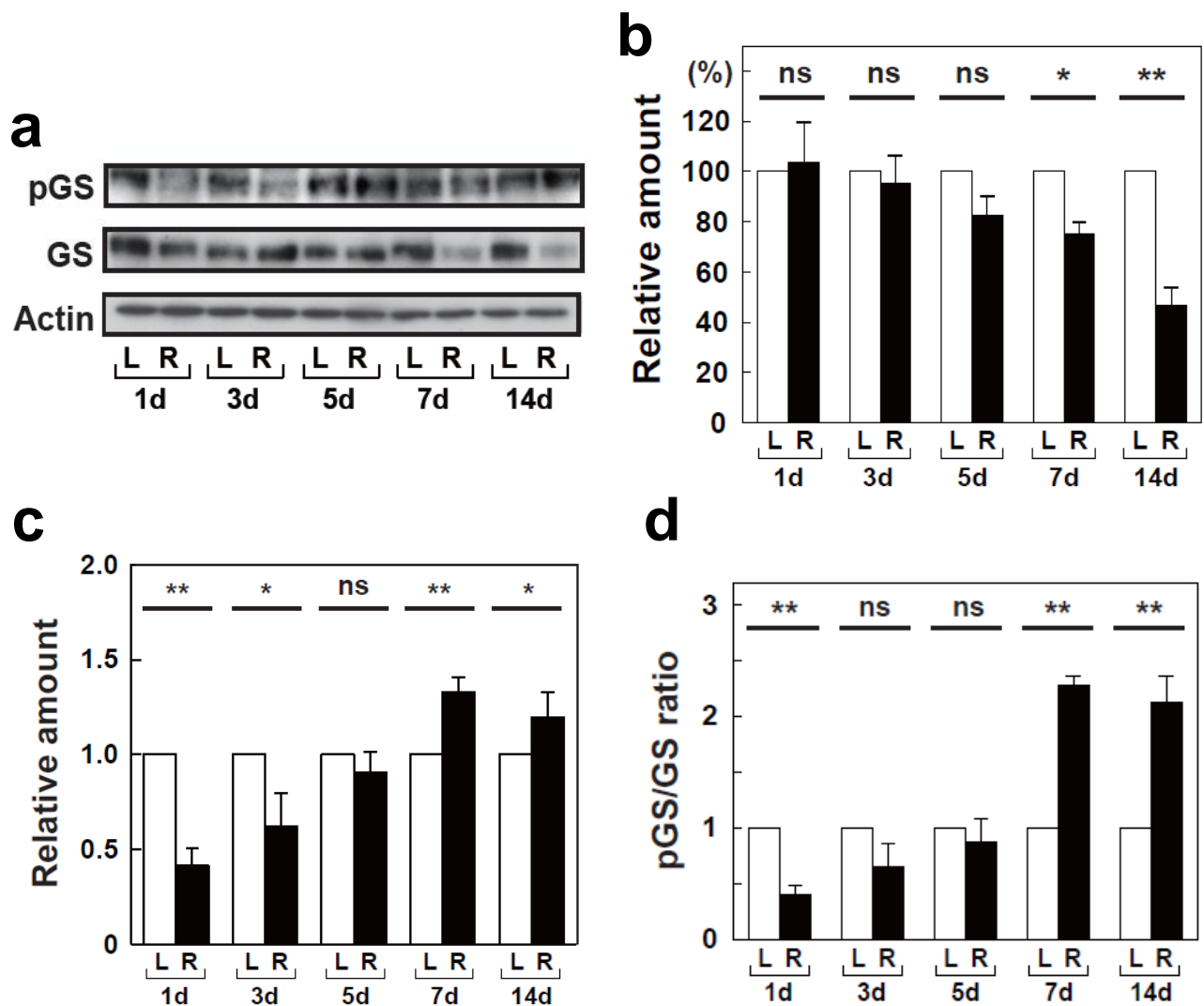


図 10 グリコーゲン合成酵素 (GS) の解析 (前半部)

顔面神経を傷害し、1、3、5、7、14 日後に、コントロール核 (L) および傷害核 (R) を回収した。(a) ウェスタンブロットにより、pGS、GS および Actin を検出した。(b) 各試料の GS バンド (図 10a) をデンストメータで定量化した。R 側の値 (黒カラム) は、L 側の値 (白カラム) を 100 とした時の相対量で表した。(c) 各試料の pGS バンド (図 10a) を同様に定量化し、R 側の値 (黒カラム) は、L 側の値 (白カラム) を 1 とした時の相対量で表した。(d) GS バンドおよび pGS バンドを測定し、pGS/GS 比を求め、コントロール側の値を 1 とした時の相対値で示した。両神経核間の有意差は、unpaired two-tailed Student's t-test により判定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

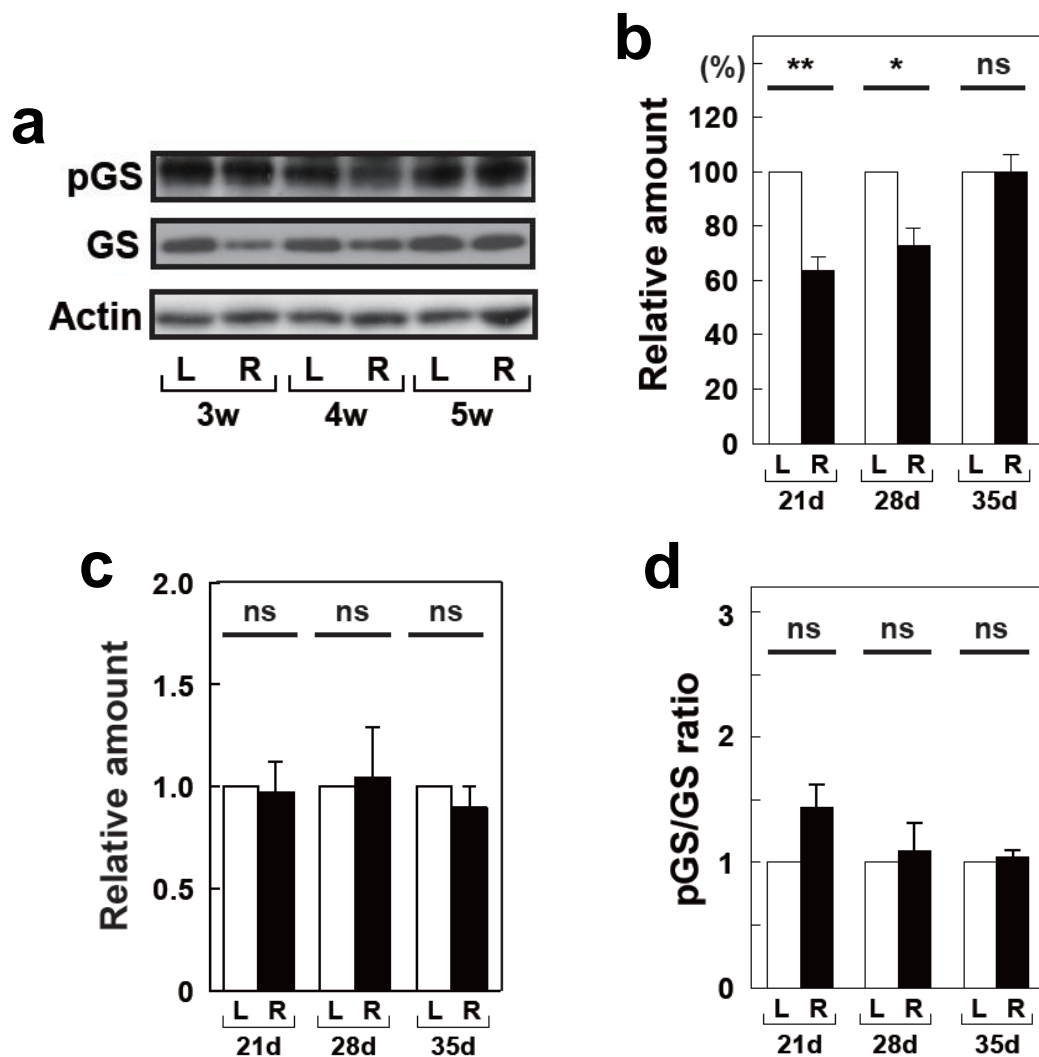


図 11 グリコーゲン合成酵素 (GS) の解析 (後半部)

顔面神経を傷害し、21、28、35 日後に、コントロール核 (L) および傷害核 (R) を採取した。(a) ウェスタンブロットにより、pGS、GS および Actin を検出した。(b) 各試料の GS バンド (図 11a) をデンストメータで定量化した。R 側の値 (黒カラム) は、L 側の値 (白カラム) を 100 とした時の相対量で表した。(c) 各試料の pGS バンド (図 11a) を同様に定量化し、R 側の値 (黒カラム) は、L 側の値 (白カラム) を 1 とした時の相対量で表した。(d) GS バンドおよび pGS バンドを測定し、pGS/GS 比を求め、コントロール側の値を 1 とした時の相対値で示した。両神経核間の有意差は、unpaired two-tailed Student's t-test により判定した。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (n=3)。

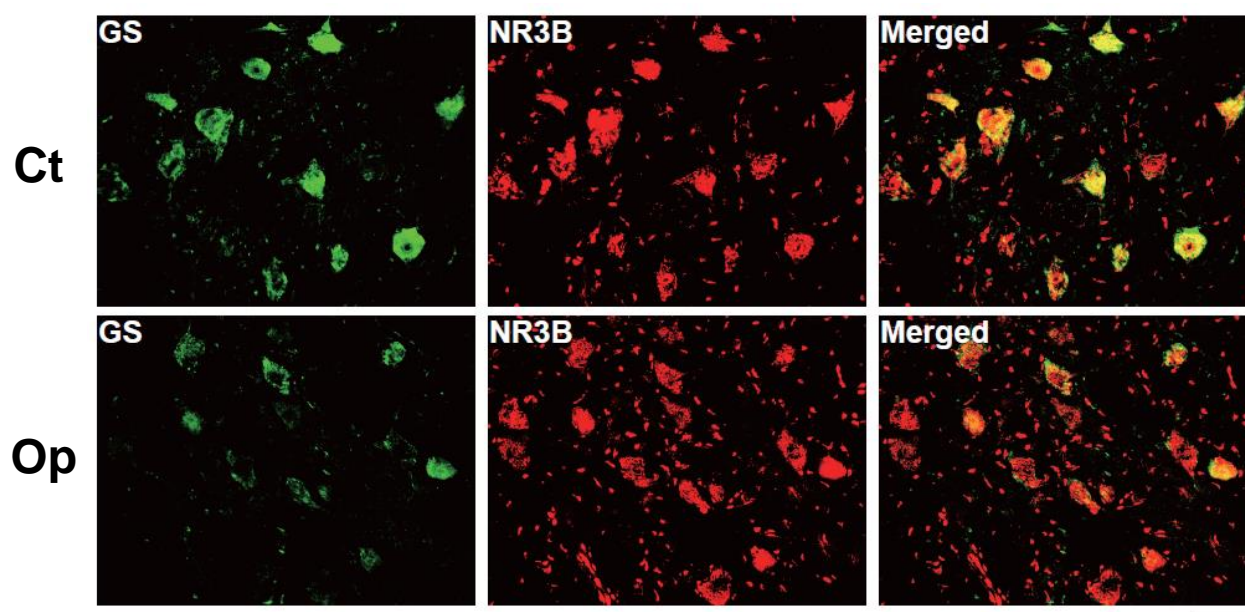


図 12 グリコーゲン合成酵素と運動ニューロンの共染色

顔面神経を切断し、14 日後の脳幹切片を使用し、GS 抗体（左）と NR3B 抗体（中）による蛍光二重染色を行った。これらの重ね合わせを右側（右）に示した。上段にはコントロール側（Ct）を、下段には傷害側（Op）を示した。スケールバーは 50 μm を示す。

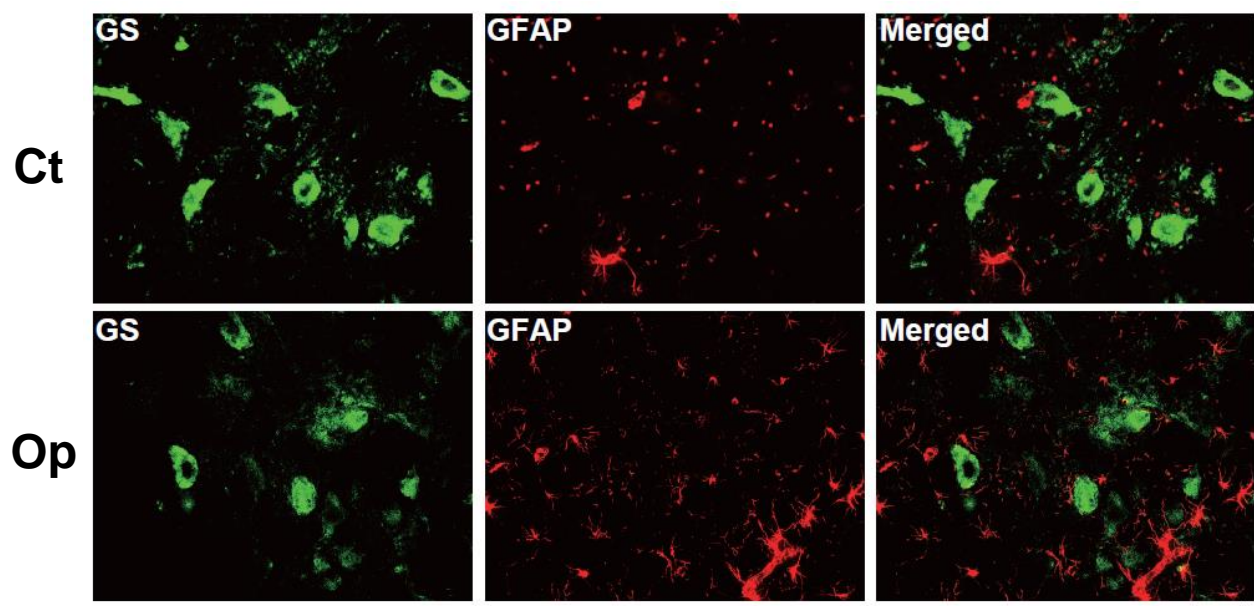


図 13 グリコーゲン合成酵素とアストロサイトの共染色

顔面神経を切断し、14 日後の脳幹切片を使用し、GS 抗体 (左) と GFAP 抗体 (中) による蛍光二重染色を行った。これらの重ね合わせを右側 (右) に示した。上段にはコントロール側 (Ct) を、下段には傷害側 (Op) を示した。スケールバーは 50 μm を示す。

3.6 グリコーゲンホスホリラーゼ（GP）の解析

細胞内のグリコーゲン量は、GS の活性だけで決まるわけではなく、グリコーゲン分解に携わるグリコーゲンホスホリラーゼ（GP）の活性も関係する。従って、傷害顔面神経核のグリコーゲン量の変動を説明するためには、GP の変動を調べる必要がある。

顔面神経核の GP レベルを調べるために、本研究では、肝臓型、筋肉型および脳型 GP を認識する抗体（GP1）と脳型 GP を認識する抗体（GP2）の 2 種類の抗体を使用した。その結果、多少の変動が見られたが、抗体による違いは認められず、傷害側の GP レベルは、傷害後 35 日間、ほとんど変動しないことが判明した（図 14a, b）。

GP は、リン酸化されると活性型（pGP）であり、脱リン酸化されると不活性型になるため、本研究でも顔面神経核の pGP を測定し、pGP/GP 比を求めることが望まれた。もし pGP/GP 比が高ければ、その時期のグリコーゲン分解が活発であることがわかり、逆に pGP/GP 比が低ければ、グリコーゲンの分解が不活発であることがわかる。しかし、残念なことに、現在、ラットの活性型リン酸化 GP（pGP）は市販されていないため、pGP/GP 比を求めることはできなかった。

3.7 傷害運動ニューロンの生存性

顔面神経を切断すると、運動ニューロンは、一時的に ChAT や VAChT の発現量を低下させるが（図 2）、その後、回復し、5 週間後には、それらのレベルはほとんど元のレベルに戻った（図 2）。しかし、傷害を受けた運動ニューロンの中には細胞死を起こすものがあり、それによって、傷害核の運動ニューロンの数が減少している可能性も推測された。そこで、顔面神経傷害後、ChAT、VAChT および GS 量が最も減少する、傷害後 14 日めに、生存している運動ニューロンの数を測定してみた。

脳幹切片をニッスル染色した結果、図 15a に示すように、傷害側とコントロール側の運動ニューロンの数はほとんど変わらなかった。複数のラット（n=3）を使用して、統計的な解析を行った結果、両顔面神経核の運動ニューロン数には、有意な差は認められなかった（図 15b）。

このように、運動ニューロンは、軸索切断の傷害によって機能的な低下を示すが、細胞死を起こすことはほとんどないことが示された。すなわち、傷害された運動ニューロンでは、細胞死の反応は起こらず、修復・再生の反応が進行すると考えられた。

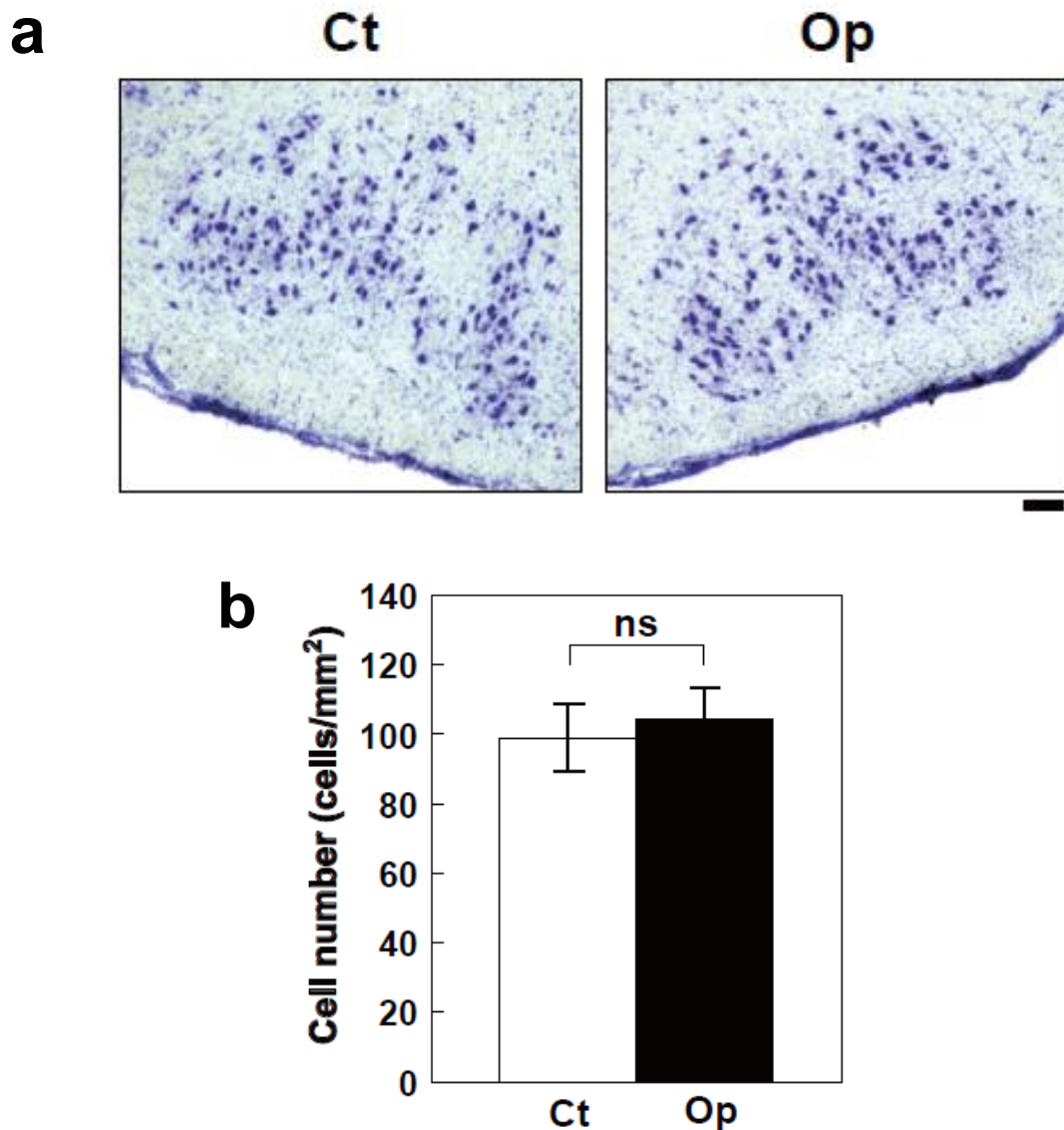


図 15 運動ニューロンの生存性

(a) 顔面神経傷害 14 日めの脳幹切片を用いて、ニッスル染色を行った。左側がコントロール核 (Ct)、右側が傷害核 (Op) である。(b) コントロール側 (Ct) および切断側 (Op) のニッスル陽性細胞 (運動ニューロン) の細胞数を計測し、それぞれ単位面積 (1 mm²) 当たりの細胞数として示した。両神経核間の有意差は、unpaired two-tailed Student's t-test により判定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n=9 sections)。

4. 考察

4.1 傷害運動ニューロンのエネルギー代謝

成熟ラットの顔面神経を切断すると、運動ニューロンの傷害とグリア細胞の増殖／活性化が生じる (Kreutzberg, 1996; Moran and Graeber, 2004)。この時、傷害顔面神経内では、多量のエネルギーがニューロンの生存や修復、およびグリア細胞の応答のために消費されると推測できる。ラットの顔面神経傷害系では、運動ニューロン傷害後 24 時間以内に、グルコース欠乏時に誘導される分子である glucose-regulated protein 78 (GRP78) が、最大となることが示されている (Moreno-Flores et al., 1997)。すなわち、軸索切断直後から傷害神経核では、グルコースが枯渇し緊急時に陥っていると予想された。

この状態を支持するように、血中からのグルコース取込みが、傷害運動神経核で促進されることが示されている (Kreutzberg and Emmert, 1980; Ito et al., 1999; Smith et al., 1984)。

さらに、グルコースは、血液からだけでなく、神経系実質内のグリコーゲンからも供給される可能性が示唆されてきた。座骨神経の傷害系では、脊髄の傷害運動ニューロンが傷害 2 週間後にグリコーゲンを活発に分解することが報告されている (Woolf et al., 1984)。

また、その一方で、神経傷害後にグリコーゲンを増加させるという報告も存在する。Jirmanova (1971) は、ニワトリの座骨神経傷害系で、傷害を受けた脊髄運動ニューロンにグリコーゲン顆粒が増加することを観察している。

これらの報告から、運動ニューロンは、傷害後、グリコーゲン合成／分解を活発に行っていると推測される。しかしながら、傷害神経核や傷害運動ニューロンにおけるグリコーゲン合成の変動やその調節メカニズムに関してはほとんど情報が無く、ニューロンの傷害後およびその後の修復・再生過程のエネルギー代謝を説明できる段階には至っていない。従って、傷害顔面神経核のグリコーゲン量の経時変化を定量的に解析し、そのグリコーゲン合成／分解に関する分子を解析することは基礎的に重要であると考えられる。

4.2 グリコーゲンの測定法と検出法

従来は、組織中のグリコーゲンを染色する方法といえば、過ヨウ素酸シッフ染色（PAS）法であり、神経系のグリコーゲンもこの方法で調べられてきた。Borke と Nau（1984）は、発達段階の舌下神経核や顔面神経核の運動ニューロンにおいてグリコーゲンを検出している。一方、Jirmanova（1971）も、ニワトリの傷害脊髄運動ニューロン中に、グリコーゲンが蓄積することを報告している。しかし、これらの PAS 法によるグリコーゲンの検出は、それほど感度が良いとはいえず、グリコーゲン顆粒は、正常な成熟神経系では検出されていない。また、顔面神経核のような微量の神経組織中のグリコーゲン量を定量することも行われておらず、ニューロンの傷害と修復・再生過程におけるグリコーゲン量の変化は全く知られていなかった。

それに対し、本研究では、高感度のアントロン硫酸法（Fong et al., 1953）とグリコーゲン抗体（Baba, 1993）を使用して、従来不明だった点を明らかにすることができた。アントロン硫酸法を使用した結果、傷害顔面神経核でグリコーゲン量が一過性に増加することを初めて示すことができた。また、グリコーゲン抗体を使った高感度の免疫組織化学的染色法は、傷害運動ニューロンがグリコーゲンを蓄積するという明瞭な証拠を与えてくれた。従って、これらの方法は、本研究の遂行に不可欠なツールであったといえる。

4.3 グリコーゲン合成／分解の分子機構

傷害顔面神経核において、グリコーゲンの一過性的変動が明らかになったが、同時に、「なぜ、顔面神経切断後 5–7 日にグリコーゲン量が増加するのか」、また、「なぜ、それが 14 日後から減少するのか」、という疑問も生じた。これらの問題に答えるため、活性型 GS と不活性型 GS の存在（Nuttall et al., 1988; Nielsen and Richter, 2003）を考慮して、総 GS と共に、不活性型のリン酸化 GS（pGS）を定量することにした。

その結果、興味深いことに、傷害後 1–3 日では、傷害神経核の pGS/GS 比が 0.40–0.66 を示した。不活性 GS の割合が低いことは、相対的に活性な GS の割合が高いことを示し、

グリコーゲン合成がより活発であることを示唆している。従って、傷害後 1–7 日にかけて、傷害側のグリコーゲン量が蓄積されたと考えられた。

次に注目された点は、傷害 7–14 日後に、pGS/GS 比が顕著に増加したことである。これは、不活性 GS の割合が増加したことを意味し、グリコーゲン合成が抑制されることを示している。実際、神経切断後 14 日以降、グリコーゲン量の増加は見られなかった（グリコーゲン量の減少については後述）。

グリコーゲン量は GS 活性と GP 活性の両方で同時に調節されるので (Jensen and Richter, 2012)、GP レベルも検討する必要がある。ただ残念なことに、ラットの活性型リン酸化 GP (pGP) に対する抗体は、現在、市販されていないので、ラットの顔面神経傷害系において、総 GP に対する活性型 pGP の割合 (pGP/GP) を調べることはできなかった。しかし、傷害神経核の活性型 GP の変動に関して、次のような重要な結果が報告されている。Woolf ら (1984) は、傷害された脊髄運動ニューロンで、傷害後早期 (1–3 日) には GP 活性は不活性であるが、傷害後 14–42 日になると活性化されることを述べている。この結果は、この座骨神経系と同類である顔面神経系に当てはめると考えられた。すなわち、顔面神経傷害後の早期 (1–3 日) には、GP は不活性なので合成されたグリコーゲンは分解されず蓄積されていくが、傷害後 14 日以降は、一定量のグリコーゲン (合成が停止したグリコーゲン) が活性型 GP 作用によって分解されるので、その量が減少すると考えることができる。

4.4 運動ニューロンはどこからグルコースを入手するのか

傷害運動ニューロンは、どのようにして、どこからグリコーゲンの材料であるグルコースを入手するのか？という問題が存在する。通常、血液から実質内へのグルコースの取り込みは、いくつかのグルコーストランスポーター (GLUT1 と GLUT4) を介して行われる (Simpson et al., 2001; Ngarmukos et al., 2001)。その取り込みを行う主要な細胞種は、血管内皮細胞/ペリサイトと接触しているアストロサイトと考えられている。このアストロサイト内に取り込まれたグルコースの一部は周囲のニューロンへと輸送されるものと見られる。

Gómez ら (2011) は、マウスの傷害顔面神経核の運動ニューロンで GLUT4 と GLUT8 のレベルが増加する事を免疫組織化学的に報告している。GLUT4 レベルは損傷後 3 日から 8 日で増加し、GLUT8 レベルは損傷後 8 日目で増加する。この期間（傷害後 3–8 日）は、本研究で示した傷害顔面神経核内でグリコーゲン増加が見られる時期とほとんど一致している。従って、ラットの傷害顔面運動ニューロンでも、マウスと同様に、GLUT4 と GLUT8 レベルが上昇し、周囲からグルコースを活発に取り込んで、グリコーゲンを合成しているかもしれない。

4.5 運動ニューロンにおけるグリコーゲン蓄積の意義

傷害顔面神経核におけるグリコーゲンの経時的変化を観察すると、この変動と ChAT や VAChT のような運動ニューロンの機能性分子の変化が相反することに気がつく。ChAT と VAChT レベルが減少した時にグリコーゲンが増加し、ChAT および VAChT がコントロールレベルに回復した時、グリコーゲン量がコントロール値まで戻るのである。これらを考え合わせると、傷害運動ニューロンは、まだ余力のある傷害後の早期に（1–7 日）、緊急時のエネルギー物質としてグリコーゲンを細胞内に蓄積しておき、そのエネルギーを使って、その後の生存や修復に不可欠な種々のタンパク質／RNA／脂質を合成すると推測される。緊急時に、エネルギー物質を他細胞から輸送系を通じて得るよりも、細胞内に貯蔵したグリコーゲンを使用する方が安全であるといえる。

緊急時に応答して効率的に ATP を生産する場合、グリコーゲンの分解系（グリコーゲン-解糖系経路）を使う方が、グルコース-解糖系を使うよりメリットがあると考えられることができる。グリコーゲンは、活性型 GP の働きによって、グルコース-1-リン酸（G-1-P）に分解され、この G-1-P は、ホスホグルコムターゼによりグルコース-6-リン酸（G-6-P）に変換される。結果として、G-6-P は、直接、解糖系に入っていくことができる（Dashty, 2013）。一方、グルコースが基質である場合、ヘキソキナーゼによって G-6-P にリン酸化されなければならない、この反応では ATP が消費されてしまう（Dashty, 2013）。従って、直接 ATP を

使用せず、効率的に ATP 産生を行う場合、グリコーゲン-解糖系経路はグルコース-解糖系より好適であり、傷害運動ニューロンがグリコーゲンを蓄積する理由はそこにあるかもしれない。

4.6 神経疾患とグリコーゲン代謝の関連性

本研究では、軸索切断という傷害を受けた運動ニューロンが一時的にグリコーゲン合成を活発化させることを明らかにしたが、他の神経系の傷害や病気でも、グリコーゲンの変動が報告されている。そのひとつに、低酸素刺激に対するマイマイの応答性がある (de Fraga et al., 2010)。この事例では、マイマイを低酸素状態にすると、中枢神経系内の GS 活性が低下するという現象が観察されており、低酸素環境ではグリコーゲン合成が低下するものと推測される。ふたつめは、進行性てんかんの一種の Lafora 病 (Vilchez et al., 2007) である。この病気は、グリコーゲンの異常な蓄積によって引き起こされるが、インビトロの実験系によって、この蓄積は、ニューロンの GS および PTG (adaptor protein targeting to glycogen) 活性の調節が異常になるために起こることが証明されている。もうひとつの例として、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスにおけるグリコーゲンの異常蓄積を挙げることができる。このマウスでは、中枢神経系でも傷害が見られるが、そのような傷害領域でグリコーゲンの過剰な蓄積が認められている (Dodge et al., 2013)。直接の原因は不明であるが、グリコーゲン合成系 (GS および GP) の調節が異常になっていることが示唆されている。

これら複数の研究から、多くの神経系の傷害や病気では、グリコーゲン代謝系が異常になっている可能性がある。こうした代謝の異常が、ニューロンの細胞死あるいは機能低下・異常に影響を与えているかもしれない。

4.7 傷害運動ニューロンにおけるグリコーゲン調節の概要

顔面神経の傷害によって、同側の神経核では一時的にグリコーゲン量が増加し、その後、

漸減し、定常レベルに戻った（図 5）。このグリコーゲンを合成するグリコーゲン合成酵素（GS）の総量は、神経傷害後 7–14 日にかけて減少したが、不活性 GS（pGS）量は傷害後 1–3 日に低値を示すものの、傷害後 7 日以降は上昇した（図 10c）。pGS/GS 比は、傷害後初期に低く、7 日以降高値を示した（図 10d）。また、Woolf ら（1984）による研究から、GP 活性は傷害後の初期に低く、傷害後 14 日以降に高くなると推測された。

そこで、傷害運動ニューロンに見られるグリコーゲンの経時的変動を、これら GS、pGS/GS および GP 量からまとめてみた（図 16）。

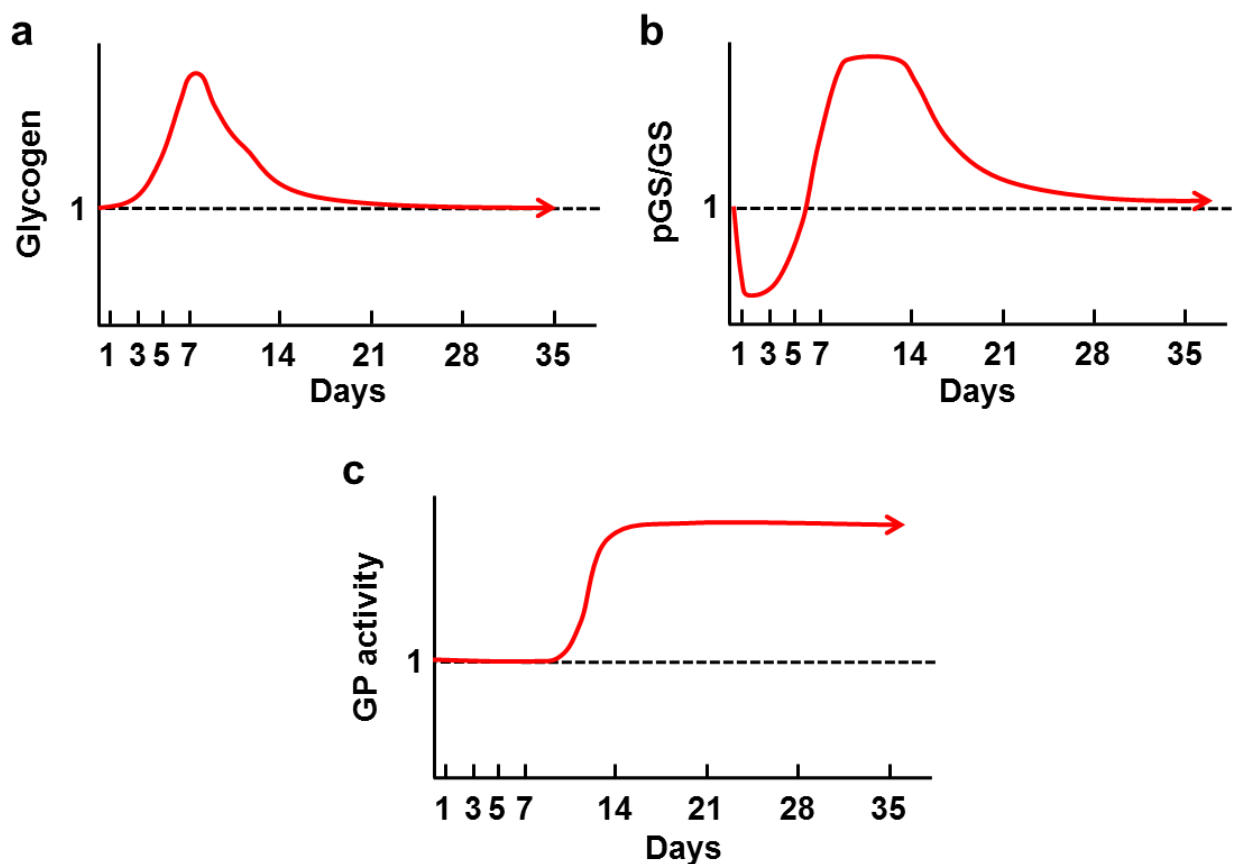


図 16 顔面神経傷害後のグリコーゲン量、pGS/GS および GP 活性

傷害顔面神経核におけるグリコーゲンの変動（a）、pGS/GS 比の変動（b）および Woolf ら（1984）の研究より推測される GP 活性の変動（c）を示した。

以上、pGS/GS および GP 活性の変動（推測）から、神経傷害後 7 日にかけてのグリコーゲン蓄積と 7 日以降のグリコーゲン低下を説明することが可能となった。

5. 結論

ラット顔面神経核の運動ニューロンは、傷害後、一過性にグリコーゲン量を増加し、その後、元のレベルに戻った。グリコーゲン量の増加は、不活性なグリコーゲン合成酵素 (GS) の減少によって起こること、また、その後に起こるグリコーゲン量の減少は、不活性 GS の増加と活性なグリコーゲンホスホリラーゼ (GP) の増加によって起こることを明らかにした。グリコーゲン量の増加は、運動ニューロンの修復・再生と密接な関連があると推測された。

6. 謝辞

本研究はすべて創価大学工学部神経生物学研究室で行われたものです。研究を行うに当たり、多大なる御指導、討論をして頂きました中嶋一行教授に厚く御礼申し上げます。本研究に対してご助言をして頂き、かつ、貴重なグリコーゲン抗体を提供して頂きました奥羽大学歯学部馬場麻人教授に御礼申し上げます。また、学位論文の査読をして頂きました創価大学工学部生命情報工学科の青山由利教授と同学部環境共生工学科の金松知幸教授に御礼申し上げます。最後に、これまでの学生生活を常に温かく見守ってくれた両親に、心より感謝申し上げます。

7. 参考文献

Baba O (1993) Production of monoclonal antibody that recognizes glycogen and its application for immunohistochemistry. *J Stomatol Society* 60:264-287.

Borke RC, Nau ME (1984) Glycogen, its transient occurrence in neurons of the rat CNS during normal postnatal development. *Dev Brain Res* 318:277-284.

Brown AR, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271.

Dashty M (2013) A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clin Biochem* 46:1339-1352.

de Fraga LS, da Silva RS, Zancan DM (2010) Control of carbohydrate metabolism in an anoxia-tolerant nervous system. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 313: 539-547.

Dodge JC, Treleaven CM, Fidler JA, Tamsett TJ, Bao C, Searles M, Taksir TV, Misra K, Sidman RL, Cheng SH, Shihabuddin LS (2013) Metabolic signatures of amyotrophic lateral sclerosis reveal insights into disease pathogenesis. *PNAS* 110:10812-10817.

Fong J, Schaffer FL, Kirk PL (1953) The ultramicrodetermination of glycogen in liver; a comparison of the anthrone and reducing-sugar methods. *Arch Biochem Biophys* 45:319-326.

Gómez O, Ballester-Lurbe B, Mesonero JE, Terrado J (2011) Glucose transporters GLUT4 and GLUT8 are upregulated after facial nerve axotomy in adult mice. *J Anat* 219:525-530.

Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J Neurocytol* 17:209-220.

Graeber MB, Lopez-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S (1998) The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813: 241-253.

Ichimiya T, Yamamoto S, Honda Y, Kikuchi R, Kohsaka S, Nakajima K (2013) Functional down-regulation of axotomized rat facial motoneurons. *Brain Res* 1507:35-44.

Ito D, Tanaka K, Nagata E, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y (1999) Uncoupling of cerebral blood flow and glucose utilization in the regenerating facial nucleus after axotomy. *Neurosci Res* 35:207-215.

Jensen TE, Richter EA (2012) Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J Physiol* 590:1069-1076.

Jirmanová I (1971) Glycogen deposits in motoneurons of young chickens following peripheral nerve section. *Acta Neuropath* 19:110-120.

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

Kreutzberg GW, Emmert H (1980) Glucose utilization of motor nuclei during regeneration: A [¹⁴C]2-deoxyglucose study. *Exp Neurol* 70:712-716.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 23:10064-10073.

Moran LB, Graeber MB (2004) The facial nerve axotomy model. *Brain Res Rev* 44:154-178.

Moreno-Flores MT, Olazábal UE, Kreutzberg GW (1997) Axotomy increases the expression of glucose-regulated protein 78 kDa in rat facial nucleus. *Exp Neurol* 146:10-16.

Nakajima K, Reddington M, Kohsaka S, Kreutzberg GW (1996) Induction of urokinase-type plasminogen activator in rat facial nucleus by axotomy of the facial nerve. *J Neurochem* 66:2500-2505.

Ngarmukos C, Baur EL, Kumagai AK (2001) Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain Res* 900:1-8.

Nielsen JN, Richter EA (2003) Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand* 178:309-319.

Nuttall FQ, Gilboe DP, Gannon MC, Niewoehner CB, Tan AW (1988) Regulation of glycogen synthesis in the liver. *Am J Med* 85(5A):77-85.

Simpson IA, Vannucci SJ, DeJoseph MR, Hawkins RA (2001) Glucose transporter asymmetries in the bovine blood-brain barrier. *J Biol Chem* 276:12725-12729.

Smith CB, Crane AM, Kadekaro M, Agranoff BW, Sokoloff L (1984) Stimulation of protein synthesis and glucose utilization in the hypoglossal nucleus induced by axotomy. *J Neurosci* 4:2489-2496.

Varkonyi T, Balint GA, Csati S, Varro V (1980) Laboratory method for measuring small amounts of tissue glycogen. *Biochem Exp Biol* 16:175-179.

Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Vallès J, García-Fojeda B, Criado-García O, Fernández-Sánchez E, Medraño-Fernández I, Domínguez J, García-Rocha M, Soriano E, Rodríguez de Córdoba S, Guinovart JJ (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10:1407-1413.

Woolf CJ, Chong MS, Ainsworth A (1984) Axotomy increases glycogen phosphorylase activity in motoneurons. *Neuroscience* 12:1261-1269.

Yamamoto S, Nakajima K, Kohsaka S (2010) Macrophage-colony stimulating factor as an inducer of microglial proliferation in axotomized rat facial nucleus. *J Neurochem* 115:1057-1067.