

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659436

研究課題名(和文) 中枢無髄・有髄神経系解析システムの基盤構築

研究課題名(英文) Establishing the basic study for unmyelinated and myelinated central nervous system

研究代表者

貫名 信行(Nukina, Nobuyuki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員主管研究員

研究者番号：10134595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の無髄線維の役割についてはほとんどわかっていない。その理由はどのシステムが無髄線維であるかということについてすら明確な報告が無いからである。本研究では我々が最近 sodium channel beta 4 subunit の分布から確認した線条体投射線維が無髄線維であることに基づき、これまでほとんど理解されていなかった中枢神経系における無髄神経の特性を明らかにする。これにより、中枢神経系における有髄、無髄神経の新たな研究領域を形成することを目指した。本研究では線条体投射線維が無髄線維であることを明確に示した(Miyazaki et al Nat Commun2014)。

研究成果の概要(英文)：The role of unmyelinated fiber in central nervous system is not well elucidated. Even which nervous system is unmyelinated is well unknown. We recently found the striatal projection fibers are unmyelinated suggested by the distribution pattern of sodium channel beta4 subunit. In this study we further confirm this fact and identified several features of those unmyelinated fibers(Miyazaki et al Nat Commun2014)

研究分野：病態脳科学

キーワード：無髄線維 線条体投射線維 sodium channel beta4 subunit Nav1.2

1. 研究開始当初の背景

ハンチントン病の遺伝子発現異常を検討する過程で sodium channel beta4 subunit の発現低下を見出し、その機能解析を行ってきた。その過程で、通常 beta subunit はランビエ絞輪に存在するが beta4 は大脳基底核ではその分布が異なることに気づき、大脳基底核の神経線維が無髄線維である可能性を見出した。このような研究は当初全く行われていなかったため、その事実の確認と研究基盤作りの必要性から本計画を申請した。

2. 研究の目的

中枢神経系の無髄線維の役割についてはほとんどわかっていない。その理由はどのシステムが無髄線維であるかということについてすら明確な報告が無いからである。本研究では我々が最近 sodium channel beta4 subunit の分布から確認した線条体投射線維が無髄線維であることに基づき、これまでほとんど理解されていなかった中枢神経系における無髄神経の特性を明らかにする。さらにこれと有髄神経系との比較から、中枢神経系における髄鞘形成のメカニズム、制御機構の解明研究の基盤を形成することを目的とする。これにより、中枢神経系における有髄、無髄神経の新たな研究領域を形成することをめざした。

3. 研究の方法

当初以下の課題の遂行をめざした。

- (1) beta4 subunit モノクローン抗体の作成
  - (2) 免疫電顕検索
  - (3) 中型有棘神経細胞の遺伝子発現解析: 無髄線維ニューロン特異発現の検討
  - (4) MSN の神経新生・再生傾向の解析
  - (5) beta4 ノックアウトマウスの解析
  - (6) オリゴデンドロサイト由来因子による sodium channel のクラスタリング可能か?
- 期間中に遂行できたのは1, 2, 3, 5であり、これらの成果がまとまってきたのでそこに集中して研究を行った。

4. 研究成果

(1) beta4 C 末側の合成ペプチドを免役して、モノクローン抗体を作製し、完全長の beta4 を認識し、組織染色も可能なモノクローン抗体を作成した。一方細胞外ドメインを *in vitro* で作製し、これに対するポリクローン抗体などを作製し、有髄線維のマーカー(ランビエ絞輪に存在するタンパク質及びミエリン)抗体との重染色を可能として、線条体投射線維が無髄線維であることを免疫組織化学的に明らかにした。Beta4 の瀰漫性の染色性はこれによって染色される中型有棘神経細胞由来の線維が無髄であることの可能性を強くした。なお beta4 プロモーター下で Venus を発現するマウスを作製し、beta4 の発現する中型有棘神経細胞に Venus を発現するようにし、これと beta4 の染色性が一致す

ることから、beta4 陽性の線維が線条体中型有棘神経細胞由来であることを確認した。

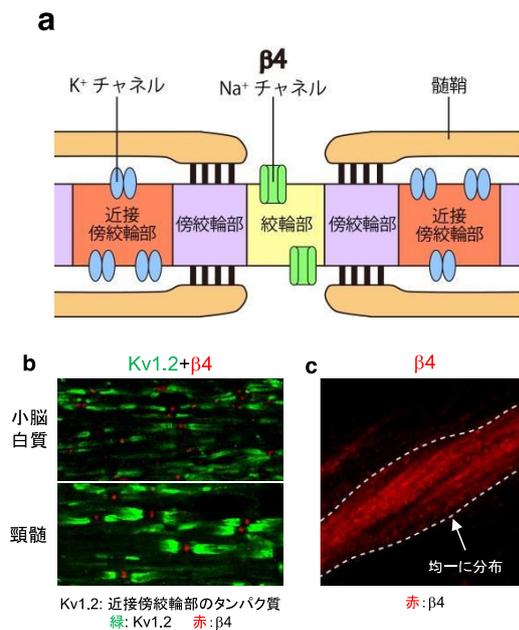


図1 マウス脳における beta4 の発現分布 (a) ランビエ絞輪近傍の模式図と各部の名称 (b) 小脳白質(上)と頸髄(下)における beta4 の発現分布。Beta4 は絞輪部のみ分布している。(c) 線条体投射線維における beta4 の発現分布。線条体から黒質に向かう投射神経軸索に瀰漫性に分布することが分かった。

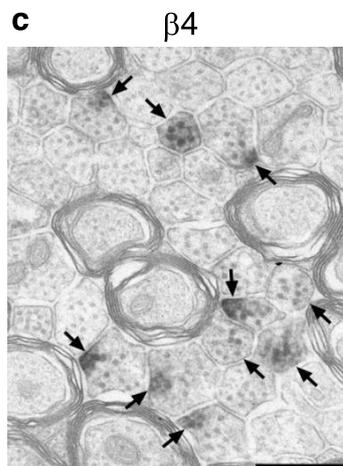
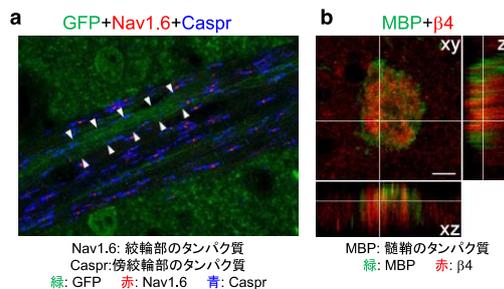


図2 線条体投射神経軸索が無髓神経であることの発見

(a) beta4 プロモーターの制御下で蛍光タンパク質 Venus を発現するトランスジェニックマウスを作製し、線条体投射神経を抗蛍光タンパク質抗体で検出した。Venus 陽性の軸索(矢頭)には Nav1.6, Caspr の染色が重ならないことから、この軸索にはランビエ絞輪が存在しないことが分かる。(b) beta4 陽性の線条体投射神経は MBP と共染色されないことからこの軸索には髓鞘が無いことが分かる。(c) 線条体投射神経の免疫電顕像。抗 beta4 抗体のシグナルは無髓神経で観察される。

(2) (1) の結果をさらに確実にするため、抗 beta4 抗体による免疫電顕検索を行い、beta4 陽性線維が無髓線維であることを示した。

(3) 線条体中型有棘神経細胞を上記 Venus 発現マウスを用いてセルソーターで分離することに成功し、その遺伝子発現を DNA アレーを用いて解析することに成功した。無髓特異的な遺伝子が存在するかは現在検討中である。

(4) beta4 ノックアウトマウスを作製し、その機能解析を行った。Beta4 の発現は線条体においても、その他の有髓線維においても消失しており、ノックアウトされていることを確認した。このマウスは症状としては軽度の振戦が認められたが著明な神経症状は認めなかった。突然死の傾向があり、これは beta4 が心臓に発現し、その変異が不整脈と関連しているという従来の報告から、心臓の関連する突然死の可能性を考えた。ノックアウトマウスの中型有棘神経細胞に対して生理学的解析を行いリサージェントカレントが消失していることが分かった。リサージェントカレントに関してはこれまで細胞レベルの実験では beta4 が制御している可能性が示されていたが、我々の結果は beta4 の機能に関しての *in vivo* での初めての結果であり、Nat Commun に報告した。国際的にも Prof. Isom のようなチャネル研究者からは beta4 の機能に関して長く待たれていた包括的な研究報告だと評価されている (personal communication)。

また beta4 陽性の線条体投射線維が無髓神経であることの同定の過程で、通常成獣のランビエ絞輪が存在する Nav1.6 がこの無髓線維では存在しないことが見出され、 $\alpha$  チャネルがどの分子種であるかが疑問となった。この点に関しては Nav1.2 がこの線維を瀰漫性に染めることを見出し、 $\alpha$  チャネルは Nav1.2 であることを同定した。Nav1.2 抗体がこれまで知られている中枢の無髓線維(小脳平行線維や海馬 Mossy fiber)を染め得ることから、これによって無髓神経のマーカーとして Nav1.2 を用いることが可能であることがわかり、今後の中枢における無髓線維の研究の基盤を得ることができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Wimmer, V.C., Harty, R.C., Richards, K.L., Phillips, A.M., Miyazaki, H., Nukina, N. & Petrou, S. Sodium channel beta1 subunit localizes to axon initial segments of excitatory and inhibitory neurons and shows regional heterogeneity in mouse brain. *J Comp Neurol* 523, 814-30 (2015). 査読有

DOI: 10.1002/cne.23715

2. Miyazaki, H., Oyama, F., Inoue, R., Aosaki, T., Abe, T., Kiyonari, H., Kino, Y., Kurosawa, M., Shimizu, J., Ogiwara, I., Yamakawa, K., Koshimizu, Y., Fujiyama, F., Kaneko, T., Shimizu, H., Nagatomo, K., Yamada, K., Shimogori, T., Hattori, N., Miura, M. & Nukina, N. Singular localization of sodium channel beta4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. *Nat Commun* 5, 5525 (2014). 査読有

DOI: 10.1038/ncomms6525

3. Nguyen, H.M., Miyazaki, H., Hoshi, N., Smith, B.J., Nukina, N., Goldin, A.L. & Chandy, K.G. Modulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels by the sodium channel beta1 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 18577-82 (2012). 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1209142109

[学会発表] (計 6 件)

(国際)

1. Nukina, N. Polyglutamine diseases and protein quality control. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014" (Akio Suzuki Memorial Hall (M&D Tower 2F) TMDU, Tokyo, Japan, 2014/03/16-17).

2. Nukina, N. Autophagic machinery for degrading the misfolded proteins. The 6th International Symposium of Autophagy 2012 (Nago, Japan, 2012/10/28-11/01).

(国内)

3. Nukina, N. The pathomechanism of Huntington disease: factors related to its pathological cascades (ハンチントン病の分子病態). 第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会

大会合同大会（神戸国際会議場（神戸ポ ー ト ア イ ラ ン ド ） , 2015/03/21-23(23)).

4. 宮崎晴子, 小山文隆, 紀嘉浩, 黒澤大, 黒澤みず樹, 下郡智美, 服部信孝 & 貫名信行. FACS 精製中型有棘ニューロンを用いたハンチントン病モデルマウス初期変動遺伝子のトランスクリプトーム解析. Neuro2014(第 37 回日本神経科学大会) (横浜(パシフィコ横浜), 2014/09/11-13).
5. 井上律子, 宮崎晴子, 貫名信行 & 三浦正巳. マウス線条体における電位依存性ナトリウムチャンネル $\beta$ サブユニットの電気生理学的性質. Neuro2014(第 37 回日本神経科学大会) (横浜(パシフィコ横浜), 2014/09/11-13).
6. 清水英明, 白水美香子, 貫名信行, 関根俊一 & 横山茂之. 電位依存性ナトリウムチャンネルのホモフィリック相互作用における構造学的基盤. Neuro2014(第 37 回日本神経科学大会) (横浜(パシフィコ横浜), 2014/09/11-13).

〔図書〕(計 1 件)

1. 貫名信行. 【神経変性疾患-研究と診療の進歩】 神経変性疾患の病態機序の解明 Proteinopathy からみた神経変性疾患の病態機序. 医学のあゆみ 247, 395-399 (2013).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース

「大脳における抑制性の無髄神経線維束の発見」

<<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/pdf/news13.pdf>>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

貫名 信行 (Nukina Nobuyuki)

独立行政法人理化学研究所、脳科学総合研究センター、客員主管研究員

研究者番号：10134595