

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500019

研究課題名(和文) イオンチャネルを介したオメガ-3不飽和脂肪酸のアルツハイマー病脳改善作用

研究課題名(英文) Improvement effect of Alzheimer's disease brain by the omega -3 unsaturated fatty acid through the ion channel

研究代表者

田嶋 信義 (TAJIMA, Nobuyoshi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：30708996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HEK細胞にBKチャネル(Slo1)遺伝子発現ベクターを導入し、inside-out法を用いてA 1-42の直接作用を検討した。細胞質側に投与した可溶性単量体A 1-42は、Ca²⁺非存在下ではBKチャネル電流に影響を及ぼさなかった。多量体A 1-42は一部の標本において抑制作用を示したが再現性に乏しく、直接作用があるという結論は下せなかった。また、1または4サブユニットをSlo1と共にHEK細胞に発現させ、可溶性単量体および多量体A 1-42の影響を調べたが、BKチャネル活動に対する影響は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined whether Slo1 BK channels were directly affected by A 1-42. Inside-out patch clamp recording revealed that soluble monomer A 1-42 had no effect on Slo1 BK channels heterologously expressed in HEK cells without intracellular Ca²⁺. Although A 1-42 oligomers reduced the channel current amplitude in some recordings, we could not conclude that A 1-42 affected Slo1 BK channels directly, because reproducibility of the results was scarce in this experimental condition. We also examined the effect of monomer and oligomers of A 1-42 on BK channels formed by Slo1 and the auxiliary subunit 1 or 4 expressed in HEK cells. Activity of Slo1 + 1 or Slo1 + 4 remained unaffected by monomer and oligomers of A 1-42.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャネル 不飽和脂肪酸 アミロイドベータ アルツハイマー 電気生理

1. 研究開始当初の背景

これまでに行われてきたアルツハイマー病研究により、アミロイドベータ (A_{1-42}) がアルツハイマー病の発症と進行の要因の一つであることが示唆されている。アルツハイマー病脳では脳神経細胞の興奮性が上昇しており、この過剰興奮の一因は、興奮性を抑制する働きをしている BK (大コンダクタンス、 Ca^{2+} 依存性 K^+) チャンネルに対する A_{1-42} による活動抑制にあると推測されている (Yamamoto et al. J Neurosci. 2011)。しかしながら、これまでにその抑制機構の詳細は明らかにされていない。

研究代表者らは、これまでに BK チャンネルがドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) 等の ω -3 長鎖不飽和脂肪酸の受容体として機能していることを明らかにした (Hoshi, Tajima et al. PNAS. 2013)。DHA には A_{1-42} 毒性から神経細胞を保護する作用並びに A_{1-42} の産生を減少させる作用があることが報告されている。また、 A_{1-42} の毒性はそれらによって形成される多量体 (オリゴマー) によると考えられているが、DHA は A_{1-42} の多量体形成を抑制する作用を持つことも報告されている。さらに、疫学調査の結果から DHA には認知症やアルツハイマー病等の疾患の予防や改善効果作用があることが示唆されている。

これらの知見から、DHA や EPA が BK チャンネルを介して過剰な興奮から神経細胞を保護している可能性が考えられた。本研究ではまず BK チャンネルと A_{1-42} の関連を明らかにする必要があると考え、HEK 細胞発現系を用いた実験を計画した。

2. 研究の目的

アルツハイマー病脳では A_{1-42} の細胞外蓄積が顕著であるが、当該疾病の初期段階では細胞内部に A_{1-42} が蓄積されると考えられている。しかしながら、これまで細胞内の A_{1-42} がイオンチャンネルの活動を介して神経細

胞にどのような影響を及ぼすのかということ報告した研究は少ない。そこで、これまでの研究背景をもとに本研究計画ではまず、 A_{1-42} の BK チャンネル活動に対する抑制効果が直接作用なのか、あるいは他の分子を介した間接作用によるものであるのかを明らかにする。その後、 A_{1-42} によって生じる BK チャンネルの抑制作用が、DHA 等の ω -3 不飽和脂肪酸による BK チャンネル活動の増強作用を介して回復されるのかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HEK 細胞発現系に BK チャンネル遺伝子発現ベクターと導入の目印となる EGFP ベクターを導入発現させ、inside-out 法によってパッチ電極直下の微小膜領域を細胞膜から引き離し、細胞質側に A_{1-42} を投与する。継時的に電流を記録し、電流に抑制反応が生じるかどうか観察する。また、神経細胞には BK チャンネルを構成するサブユニット (Sl α 1) と共にその補助ユニットであるベータサブユニット (4) が発現している。そこで、HEK 細胞に BK チャンネル ($KCNMA1$) と 4 ($KCNMB4$) 発現プラスミドを共発現させ、同様の電気生理実験を行い、電流応答を測定し、解析する。加えて、1 ($KCNMB1$) 発現プラスミドをサブユニットと共発現させた場合の影響も調べる。

(2) A_{1-42} の細胞毒性はオリゴマーを形成することにあると考えられている。そのため、 A_{1-42} の二量体、三量体、そして四量体を生化学的に合成し、これらのオリゴマーの違いが BK チャンネルの活動にどのような影響を与えるかを上記 (1) の電気生理実験の手順に従って調べる。

4. 研究成果

(1) Sl α 1 BK チャンネル活動に対する A_{1-42} の直接作用の検討

HEK 細胞に BK チャンネルを構成するサブユ

ニット (*KCNMA1*) 発現プラスミドを導入発現させ、inside-out 法によって微小膜領域を細胞膜から引き離れた後、細胞質側に 1-10 μM の可溶性単量体 A_{1-42} を投与し、電圧刺激に対する電流応答の変化を投与の前後で比較した。もし Slo1 BK 電流に抑制反応が見られる場合は、おそらく A_{1-42} が Slo1 BK チャネルの細胞内領域のどこかに直接作用したものと予想した。Ca²⁺非存在下では、可溶性単量体 A_{1-42} は Slo1 BK チャネル電流に影響を及ぼさなかった(図 1, 2)。

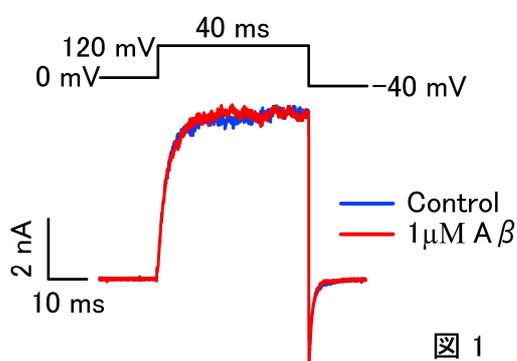


図 1

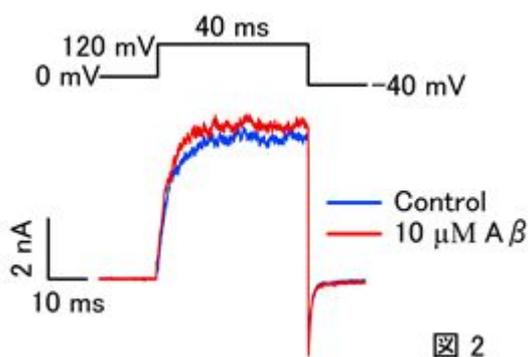


図 2

次に、多量体 A_{1-42} を合成し、Slo1 BK チャネル活動に対する影響を調べた。細胞質側に投与した 10 μM の多量体 A_{1-42} は、一部の標本において Slo1 BK チャネル電流を抑制した(図 3)。しかしながら再現性に乏しく、有意差は認められなかった。また、Slo1 BK チャネルの活性化・非活性化機構にも違いは見られなかった(図 1, 2, 3)。

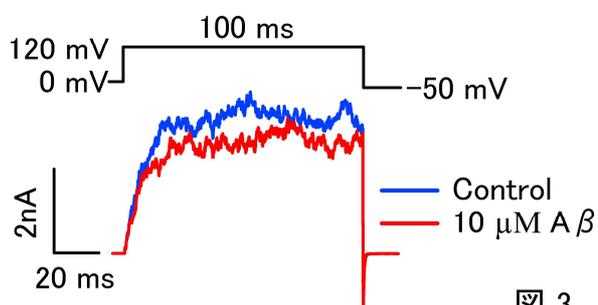


図 3

これらの実験結果から、Ca²⁺非存在下においては、可溶性単量体ならびに多量体 A_{1-42} は Slo1 BK チャネルに対する直接作用はないと結論を下した。

(2) Slo1 BK チャネル+ サブユニット複合体に対する A_{1-42} の直接作用の検討

サブユニット (*KCNMA1*) とともに 1 サブユニット (*KCNMB1*) または 4 サブユニット (*KCNMB4*) 発現プラスミドを HEK 細胞に導入発現させ、Ca²⁺非存在下における可溶性単量体ならびに多量体 A_{1-42} の BK チャネル複合体に対する影響を調べた。可溶性単量体 A_{1-42} は Slo1 BK チャネル+ 1 サブユニット複合体の活動に影響を与えなかった(図 4)。

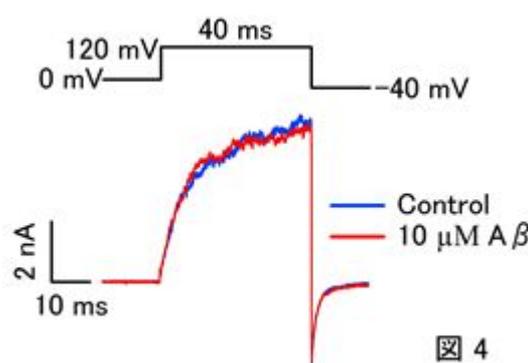


図 4

また、可溶性単量体 A_{1-42} は Slo1 BK チャネル+ 4 サブユニット複合体の活動に影響を与えなかったが(図 5)、多量体 A_{1-42} は一部の標本において抑制効果を示した(図 6)。加えて、Slo1 BK チャネル+ 1 サブユニット並びに Slo1 BK チャネル+ 4 サブユニット複合体の活性化・非活性化機構にも変化は見

られなかった(図4, 5)。さらに単一イオンチャンネル電流にも変化は見られなかった(図6)。

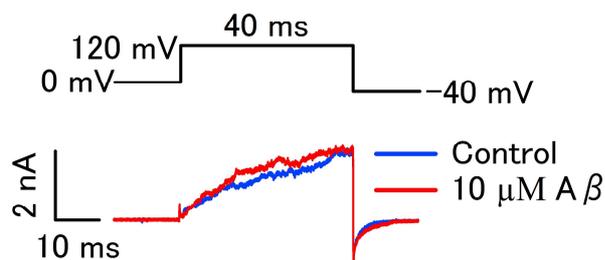


図 5

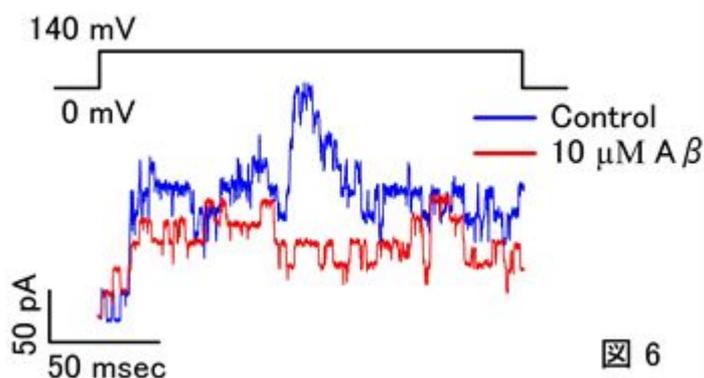


図 6

これらの実験結果から、Ca²⁺非存在下においては、可溶性単量体並びに多量体 A₁₋₄₂ は Slo1 BK チャンネル、1 並びに 4 サブユニットタンパクの細胞質領域に存在する特定の部位に直接作用してチャンネルの活動に影響を及ぼすことはない結論を下した。

本研究は HEK 細胞に BK チャンネルタンパクを発現させ、inside-out 法により微小膜領域に存在している BK チャンネルタンパクの細胞質領域に A₁₋₄₂ を作用させることにより直接作用を検証することを試みたのであるが、当初予想した A₁₋₄₂ の直接作用による BK チャンネル活動の抑制は見られなかった。アルツハイマー病の脳内神経細胞では、おそらく細胞内因子を介した A₁₋₄₂ の間接作用によって BK チャンネルの活動が低下し、細胞の興奮性が上昇していると思われる。今後は間接作用を検証する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Regulation of membrane KCNQ1/KCNE1 channel density by sphingomyelin synthase 1. Wu, M., Takemoto, M., Taniguchi, M., Takumi, T., Okazaki, T., Song, WJ. *Am J Physiol Cell Physiol.* 311(1): C15-23. 2016. (査読有)

DOI: 10.1152/ajpcell.00272.2015.

Learning impairment by minimal cortical injury in a mouse model of Alzheimer's disease. Zou, J., Wang, M., Uchiumi, O., Shui, Y., Ishigaki, Y., Liu, X., Tajima, N., Akai, T., Iizuka, H., Kato, N. *Brain Res.* 1637: 56-63. 2016. (査読有)

DOI: 10.1016/j.brainres.2016.02.017
A2B5+/GFAP+ Cells of Rat Spinal Cord Share a Similar Lipid Profile with Progenitor Cells: A Comparative Lipidomic Study. Itokazu, Y., Tajima, N., Kerosuo, L., Somerharju, P., Sariola, H., Yu, R. K., Käkälä, R. *Neurochem Res.* First online:25 February 2016. (査読有)

DOI: 10.1007/s11064-016-1867-3

〔学会発表〕(計 4 件)

田嶋信義 hydroxycholesterol inhibits Slo1 BK potassium channel activity. 第 94 回日本生理学会大会, 2017年3月29日, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

田嶋信義 オメガ-3 脂肪酸は Slo1 BK チャンネルを活性化する. 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015年9月15日, 金沢大学(石川県・金沢市)

田嶋信義 Omega-3 fatty acids activate Slo1 BK channels and lower blood pressure. 第 120 回日本解剖学

会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会合同大会，2015 年 3 月 21 日，神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
田嶋信義 Activity of BK channel is modulated by Membrane cholesterol content and association with Na⁺/K⁺-ATPase. The 45th NIPS International Symposium Co-sponsored by The Journal of Physiology. 2014 年 11 月 27 日，自然科学研究機構 生理学研究所(愛知県・岡崎市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田嶋 信義 (TAJIMA, Nobuyoshi)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：30708996

(2)研究分担者

加藤 伸郎(KATO, Nobuo)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：10152729

谷口 真(TANIGUCHI, Makoto)
金沢医科大学・総合医学研究所・講師
研究者番号：30529433