

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640017

研究課題名(和文) Role of Axonal BK channel in Cerebellar Purkinje Cells

研究課題名(英文) Role of Axonal BK channel in Cerebellar Purkinje Cells

研究代表者

御園生 裕明(Misono, Hiroaki)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：40609509

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)：神経細胞はその入力部である樹状突起で情報を受け取り、これを統合・計算した結果を軸索で活動電位に変換し、他の細胞に出力する。これまで、主な情報の統合と計算は樹状突起で行われ、軸索はその出力である活動電位を忠実に伝えるケーブルとして捉えられてきた。しかし我々は運動制御や学習を担う小脳回路の主要な細胞であるプルキンエ細胞において、カルシウム依存性K⁺チャンネルの一つBKチャンネルが有髄軸索に発現すること、また、このBKチャンネルが軸索内活動電位の発生を制御することを初めて明らかにした。以上の結果から、軸索においてもダイナミックな情報処理が行われる可能性が示唆され、その詳細を今後の研究から明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：Purkinje cells are the sole output of the cerebellar cortex. Therefore, to understand information processing in the cerebellar circuit for motor coordination and learning, it is necessary to understand the mechanisms regulating action potential conduction in their myelinated axons. In particular, voltage-gated potassium (Kv) channels are of importance. In this study, we found novel expression of the calcium and voltage-activated BK channel in Purkinje cell axons. Our results suggest that axonal BK channels uniquely support high-fidelity firing of action potentials in myelinated Purkinje cell axons, thereby underpinning the output of the cerebellar cortex to the deep cerebellar nuclei. They also indicate that there are dynamic changes in calcium near the nodes of Ranvier. Taken together, our research opened a new possibility that neuronal signals can be dynamically regulated in the axon.

研究分野：神経生物学

キーワード：チャンネル 軸索 活動電位 小脳

1. 研究開始当初の背景

BK チャネルは、膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を同時に感知して働くきわめてユニークなイオンチャネルであり、小脳プルキンエ細胞の活動電位制御に大きく寄与している。我々は最近、BK チャネルが、プルキンエ細胞有髄軸索のランビエ絞輪付近 (paranode) に特異的な局在を示すことを新規に見いだした。このことはプルキンエ細胞において、(1) BK チャネルによる新しい活動電位伝搬の制御があること、(2) 軸索内 Ca^{2+} シグナリングが存在すること、(3) 軸索における活動電位可塑性の可能性のあることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、この軸索 BK チャネルの生理的役割を明らかにし、軸索における新しい情報処理の可能性について探求することを目的とした。具体的には、プルキンエ細胞における、(1) paranodal BK チャネルによる活動電位制御の詳細、(2) 軸索内 Ca^{2+} シグナリング、(3) 神経あるいはグリアからの伝達物質による軸索内活動電位制御について明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

本研究では、小脳プルキンエ細胞軸索における BK チャネルの役割と、その制御メカニズムについて明らかにするために、以下の実験を計画した。

(1) 軸索 BK チャネルによる活動電位伝搬の制御。小脳スライスを用いて、プルキンエ細胞軸索から細胞外記録で活動電位を記録する。細胞体電極より活動電位を誘起し、軸索途中のランビエ絞輪付近で BK チャネルを阻害した場合に、活動電位に生じる変化について検討する。

(2) 軸索内 Ca^{2+} 変動の検討とそのメカニズム。 Ca^{2+} イメージングと電気生理学記録を用いて、軸索内 Ca^{2+} 変動の定量的解析を行い、またそのメカニズムについて明らかにする。

(3) 軸索における活動電位の可塑性。グルタミン酸や他のグリオトランスミッターが軸索の活動電位にどのような影響を与えるのか、また BK チャネルが関与するののかについて検討する。

4. 研究成果

(1) 軸索 BK チャネルによる活動電位伝搬の制御。

我々はまず、BK チャネルがプルキンエ細胞の有髄軸索に局在することを、免疫染色法およ

び、生化学的手法により確認した (図 1)。また、安定した電気生理学記録を行うには、

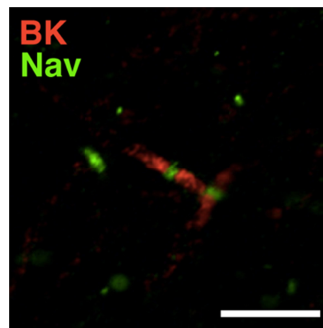


図 1 Paranode への軸索 BK チャネルの局在。BK チャネルはランビエ絞輪に局在する電位依存性 Na^+ チャネル (Nav) を挟む paranode に局在する。

若いマウスからの小脳スライスが最も適しているが、マウス小脳の発達過程で BK チャネルがいつどのように発現するかを検討し、25日齢以降のマウスが実験に適していることを見出し、その後の実験に使用した。

軸索 BK チャネルの役割を検討するためには、軸索からの電気生理学的記録が必要になる。しかし非常に細く有髄のプルキンエ細胞軸索からの記録、特に25日齢以降のスライスからの安定した記録は非常に難しいことがわかった。そこで我々は、細胞外電極からの刺激により軸索内で活動電位を惹起し、逆行性に軸索を伝導する活動電位を細胞体より記録する手法を用いた (図 2)。この記録中に BK チャネルの阻害剤を途中の軸索に局

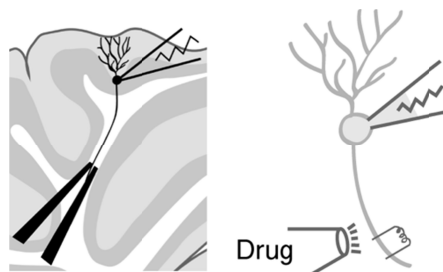


図 2 電気生理学記録の概要。(左) 小脳スライス内のプルキンエ細胞軸索への刺激と、細胞体からの逆行性活動電位の記録の模式図。(右) 局所的な BK チャネル阻害剤投与の模式図。

所投与することにより、BK チャネルが軸索内活動電位伝導にどのような役割を持つかを検討することができる。

この手法を確立し、阻害剤の局所的な効果を確認した後、BK チャネル阻害剤の効果の検討を行った。まず我々は、この手法で記録できる逆行性活動電位の特性について調べた。その結果、軸索に高頻度刺激を行うと、100 Hz 程度までは刺激によく追従した活動電位が記録できるが、それ以上の頻度では発火に至らず、失敗する例 (failure) が見られた (図 3)。ここで BK チャネルの阻害剤である

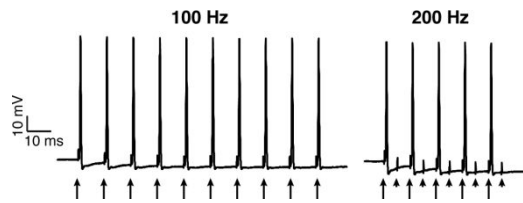


図3 逆行性活動電位の記録。この例では100 Hzの刺激に対しては忠実に活動電位が生じた(矢印)が、200 Hz刺激に対してはfailure(矢頭)が起こったことが見て取れる。

paxillineおよびPenitrem Aを局所的に軸索に投与すると、このfailureが増える、すなわち発火に失敗する確率が増大することが明らかになった(図4)。この結果は、有髄軸索のparanodeに局在するBKチャンネルが、軸索内活動電位の高頻度発火及び伝導を支

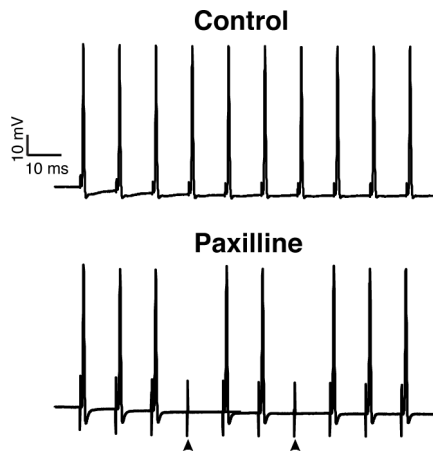


図4 軸索BKチャンネル阻害による活動電位の発火忠実性の低下。阻害前は100 Hz刺激に対して忠実に発火が起こったが、BKチャンネル阻害剤であるpaxillineを軸索に局所的に投与すると、failureが増加した。

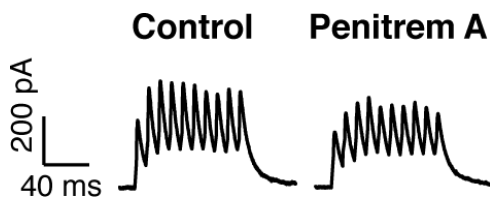


図5 軸索BKチャンネルの阻害によるシナプス出力の減少。

えていることを示唆している。

さらに、この軸索BKチャンネルによる制御が、プルキンエ細胞の最終的な出力である、小脳核細胞へのシナプス伝達に影響を与えているかどうかについても検討を行った。この実験では、細胞外電極からの刺激により同様に軸索内に活動電位を惹起する。そして、シナプス後細胞である小脳核細胞からシナプス後電位を記録し、軸索のBKチャンネルを局所的に阻害することにより、プルキンエ細胞から小脳核細胞への出力がどのような影響を受けるかについて検討した。その結果、

軸索BKチャンネルを阻害することにより、小脳核細胞におけるシナプス後電位が減少することが分かった(図5)。小脳核細胞は複数のプルキンエ細胞軸索から入力を受けるので、軸索BKチャンネル阻害により活動電位のfailureが増大し、結果としてシナプス伝達が阻害されたと考えられる。

以上の結果からわれわれは、軸索BKチャンネルは、小脳プルキンエ細胞の有髄軸索における高頻度発火に不可欠の役割を果たしていると結論した。今後は、軸索BKチャンネルがどのように高頻度発火を支持しているのか、その詳細なメカニズムについて検討を続けていく予定である。

(2) 軸索内Ca²⁺変動の検討とそのメカニズム。

BKチャンネルは通常、その開口に高濃度のCa²⁺を必要とする。そのため、軸索に局在するBKチャンネルも、その近傍にCa²⁺チャンネルを必要とすると考えられる。この可能性を検討するために、Ca²⁺感受性蛍光色素を用いたイメージング実験と、薬理学と電気生理学を組み合わせた実験を行うことを計画した。

イメージングについては、予備実験で小脳培養スライス内のプルキンエ細胞軸索からの記録を試み、空間的に非常に限局したCa²⁺の変動が、活動電位と同期して起こることを見出していた。しかしこの標本ではミエリン化がかならずしも正常に起こらないことから、(1)の電気生理学実験で用いたものと同様の急性スライスを用いる実験に切り替えた。しかし、プルキンエ細胞軸索が非常に細いことから、Ca²⁺感受性蛍光色素が軸索内に十分広がらず、安定した記録が困難であった。

そこでわれわれは、Ca²⁺チャンネル阻害剤を軸索上に局所投与し、逆行性の活動電位伝達にどのような影響があるかを調べることに

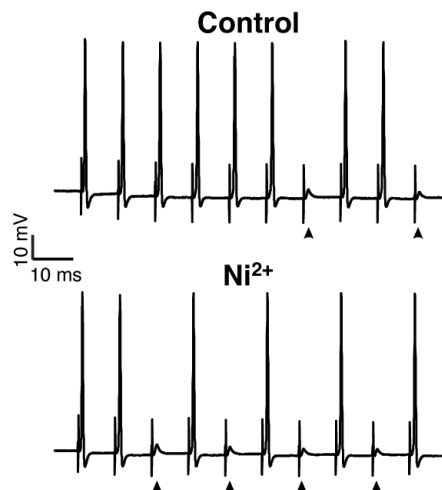


図6 Ni²⁺の軸索局所投与による発火忠実性の低下。

した。もし軸索にCa²⁺チャンネルが局在し、BKチャンネルにCa²⁺を供給しているとする、Ca²⁺チャンネル阻害剤はBKチャンネル阻害剤と同様

に、軸索内活動電位の高頻度発火を妨げるはずである。まず、Ca²⁺が細胞外から流入するかどうかを検討するために、軸索に局所的にCa²⁺を除いた細胞外液を投与した。その結果、BK チャネル阻害剤でみられたものと同様の活動電位の failure が観察された。また、特定の種類の Ca²⁺チャネルを阻害するニッケルを局所投与しても、同様の高頻度発火阻害がみられた(図6)。以上の結果から、軸索上にはCa²⁺チャネル、特にニッケル感受性のチャネルが存在し、BK チャネルを介して活動電位を制御していることが示唆される。今後Ca²⁺チャネルの分子種の同定を行う予定である。

(3) 軸索における活動電位の可塑性。

われわれは予備実験として、脳虚血後に、小脳白質で軸索 BK チャネルが顕著に減少する結果が得られている(図2参照)。また、小脳白質内のプルキンエ軸索では、NMDA 受容体が BK チャネル近傍に局在している可能性を示唆する結果も得ている。小脳白質には神経細胞はほとんどおらず、シナプスも少ないが、アストログリアは豊富に存在する。また脳虚血時にはアストログリアが活性化することが知られている。そこで本研究では、プルキンエ軸索の BK チャネルが、グルタミン酸を含むグリオトランスミッターによって局所的に制御され、活動電位の伝搬を可塑的に修飾すると仮説し、その検証を行うことを計画した。

まず、虚血による軸索 BK チャネルの減少が特異的な現象かどうかを検討した。プルキンエ軸索には BK チャネル以外の K⁺チャネルが局在することが以前から知られている。脳虚血時にはすべてのチャネルの減少がみられるのか、あるいは BK チャネル特異的なものなのかについて検討した。その結果、BK チャネルの近傍に局在する Kv1.2 チャネルの減少は認められず、BK チャネルのみが特異的に減少することが明らかになった。

またわれわれは、グルタミン酸受容体の1つである NMDA 受容体がプルキンエ細胞軸索に発現することを示唆する結果を予備実験にて得ている。そこで次に、グルタミン酸を軸索に局所投与することにより、軸索内活動電位伝搬に与える影響についての検討を始めた。しかし、グルタミン酸などのトランスミッターや虚血(低酸素)は細胞傷害性であり、神経細胞が損傷していないことが要求される電気生理学的実験と併用することは非常に困難である。現在、安定した電気生理学的記録が行えるような条件の検討を進めており、今後グリオトランスミッターによる軸索内情報伝達の制御について検討を進めていく。

(4) その他の研究成果

軸索 BK チャネルが paranode に局在化するメカニズムは不明である。この点について、

Baylor College of Medicine の Dr. Matthew Rasband と共同研究を行った。軸索膜とオリゴデンドロサイト細胞膜の間に Paranodal junction を形成する細胞接着因子の1つである Caspr を欠損するノックアウトマウス脳を解析した結果、軸索BKチャネルの paranode への局在化がみられないことが分かった。すなわち、BK チャネルの局在化は paranodal junction の形成に依存していることが明らかになった。今後は、このようなマウスからスライスを作成し、電気生理学的実験を行っていきたいと考えている。

また、軸索に局在する Ca²⁺チャネルを同定するために、IST Austria の重本博士と国際共同研究を開始し、凍結切断レプリカ免疫染色法を用いたチャネルの同定を試みている。現時点では小脳有髄軸索の割断像が取れることを、マーカータンパク質の免疫染色で確認できており、今後、様々な Ca²⁺チャネルの抗体を用いて同定を進めていく予定である。

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 1 件)

Hirono M., Ogawa Y., Misono K., Zollinger D.R., Trimmer J.S., Rasband M.N., and Misonou H. (2015) BK Channels Localize to the Paranodal Junction and Regulate Action Potentials in Myelinated Axons of Cerebellar Purkinje Cells. Journal of Neuroscience, 査読あり, Vol 35, pp. 7082-7094.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3778-14.2015

[学会発表](計 1 件)

Hirono M., Ogawa Y., Misono K., Zollinger D.R., Trimmer J.S., Rasband M.N., and Misonou H. Role of axonal BK channels in myelinated Purkinje cell axons of the cerebellum. Ion Channel Regulation, FASEB Science Research Conference, 2015 年6月28日~7月3日, Montana, USA.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

御園生 裕明 (Misono, Hiroaki)
同志社大学・脳科学研究科・教授
研究者番号：40609509

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

廣野 守俊 (Hirono, Moritoshi)
同志社大学・研究開発推進機構・特定任用
研究員 (准教授)
研究者番号：30318836

渡辺 祥司 (Watanabe, Shoji)
同志社大学・研究開発推進機構・特定任用
研究員 (助教)
研究者番号：80462745