

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 4 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860154

研究課題名(和文) KCNQチャネルの小脳での役割を脳スライス電気生理と行動実験で包括的に解明する

研究課題名(英文) A physiological study of KCNQ channel functions in the mammalian cerebellum.

研究代表者

入江 智彦 (Irie, Tomohiko)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・主任研究官

研究者番号：20546551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性カリウムチャネルは電氣的興奮性細胞の生理機能に中心的な役割を果たす。カリウムチャネルに属するKCNQチャネルは中枢神経系にも発現しており重要な役割を果たすと推測されるが、その機能的意義は殆ど不明である。そこで、急性小脳スライス標本にパッチクランプ法とKCNQ選択的阻害剤・開口剤を適用し、小脳神経細胞におけるKCNQチャネルが果たす生理機能を検討した。その結果、KCNQチャネルは小脳神経細胞において静止膜電位と電氣的興奮性を調節する働きを担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Voltage gated potassium channels play crucial roles in excitable cells. KCNQ channels belong to the potassium channels and are expressed in the central nervous systems. However, little is known about the physiological roles. Electrophysiological recordings were done from cerebellar acute brain slice preparations. Application of a KCNQ channel blocker or opener reveals that KCNQ channels play roles in maintaining the membrane potential and neuronal excitabilities of cerebellar neurons, suggesting KCNQ channels contribute to the function of the motor coordination conveyed by the cerebellum.

研究分野：神経生理学

キーワード：カリウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

電位依存性カリウムチャンネル(Kv チャンネル)は、膜電位の脱分極により活性化して K 電流を生じ、電氣的興奮性細胞の機能に重要な役割を果たす。また、Kv チャンネルの遺伝子変異は多くの遺伝性疾患を引き起こす。Kv チャンネルに属する KCNQ チャンネルは、KCNQ サブファミリー (KCNQ1 ~ 5) に属するサブユニットのヘテロまたはホモ 4 量体により構成される。KCNQ1 サブユニットの変異は QT 延長症候群を引き起こすことから、これまで循環生理学分野において KCNQ 研究は盛んに行われてきた。一方、KCNQ2 ~ 5 は中枢神経系に発現しており、KCNQ2 や KCNQ3 の変異は " 遺伝性てんかん " を引き起こす。これは中枢神経系においても KCNQ は重要な生理機能を持っている事を示している。しかしながら、これまで中枢神経系における KCNQ の生理的機能研究は殆ど行われていなかった。

小脳は協調運動に重要な役割を果たす。小脳皮質は 3 層構造を示し、シンプルな神経回路から形成されている。それゆえ、*in vitro* 電気生理実験を用いて KCNQ チャンネルの神経機能に果たす役割を解明する場合、小脳は非常に実験に適した脳部位であるといえる。また、小脳神経細胞の機能不全は協調運動の異常として現れるので、動物個体での KCNQ 機能を考える上でも小脳は最適なモデルである。

2. 研究の目的

KCNQ の阻害剤・開口剤が小脳神経細胞に与える影響を解明し、小脳機能における KCNQ の阻害剤チャンネル機能を推定する。

3. 研究の方法

3-5 週齢のマウス(ICR 系)を使用した。実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程に従って行った。マウスを深麻酔した後、直ちに安楽死させた。小脳を摘出して氷冷した Modified Ringer 液の中に入れて冷却した。小脳脳ブロックからスライサーを用いて厚さ 200 μ m の矢状断小脳切片を作成した。スライス標本は人工脳脊髄液中に回収し、1 時間以上室温でインキュベーションした後に実験に用いた。スライスを記録用のチャンバーに移し、人工脳脊髄液を常に灌流させてスライスに新鮮な人工脳脊髄液を供給した。正立顕微鏡 (BX51WI) に取り付け CCD カメラでスライス表面をモニターに映し出し、目的の細胞を同定しながら実験を行った。グルコン酸カリウムベースの電極内液を充填したパッチ電極で小脳神経細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。パッチクランプ記録・解析には、Multiclamp700B, Digidata1440, pClamp10 の組合せを用いた。KCNQ チャンネルの機能を検討する為に KCNQ の選択的阻害剤 (XE991) と開口剤 (Retigabine) を用いた。

4. 研究成果

KCNQ チャンネルが小脳神経細胞で生理機能を担っているか否かを検討するために、初めに KCNQ 阻害剤を用いた薬理実験を行った。電流固定下で膜電位を連続的に記録すると同時に、脱分極及通電を与えて細胞の発火頻度の変化をモニターした。KCNQ 阻害剤を灌流投与した所、静止膜電位が数ミリボルト脱分極した。これに伴い発火頻度の増加が観察された。この変化を確認するために、次に KCNQ 開口剤を用いて同様の実験を行った。開口剤

を灌流投与した所，静止膜電位が数ミリボルト過分極し，通電刺激による発火の頻度が減少した．これらの結果は，小脳神経細胞において KCNQ チャネルが生理的機能を果たしており，神経細胞の興奮性を調節する働きを担っていることが分かった．

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)

- Usami, M., Mitsunaga, K., Miyajima, A., Takamatu, M., Kazama, S., Irie, T., . . . Takizawa, T. (2016). Effects of 13 developmentally toxic chemicals on the migration of rat cephalic neural crest cells in vitro. *Congenit Anom (Kyoto)*, 56(2), 52-59. doi: 10.1111/cga.12121 査読有り
- Irie, T., Kikura-Hanajiri, R., Usami, M., Uchiyama, N., Goda, Y., & Sekino, Y. (2015). MAM-2201, a synthetic cannabinoid drug of abuse, suppresses the synaptic input to cerebellar Purkinje cells via activation of presynaptic CB1 receptors. *Neuropharmacology*, 95, 479-491. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.02.025 査読有り
- Usami, M., Mitsunaga, K., Irie, T., Miyajima, A., & Doi, O. (2014). A simple in vitro migration assay for neural crest cells and the opposite effects of all-trans-retinoic acid on

cephalic- and trunk-derived cells. *Congenit Anom (Kyoto)*. doi: 10.1111/cga.12059 査読有り

[学会発表](計4件)

- 宇佐見 誠，高松 美奈，風間 崇吾，満長 克祥，入江 智彦，宮島 敦子，土井 守，滝沢 達：培養ラット胚におけるバルブ口酸による発生毒性のプロテオミクス解析，第54回日本先天異常学会学術集会(神奈川，2014.7)
- 入江 智彦，花尻(木倉) 瑠理，宇佐見 誠，内山 奈穂子，合田 幸広，関野 祐子：新規違法ドラッグ MAM-2201 は CB1 受容体を介して神経伝達を強力に抑制し，複雑スパイク誘発性の細胞内 Ca²⁺ 上昇を減弱させる，Neuro2014 (神奈川，2014.9)
- 入江 智彦，花尻(木倉) 瑠理，宇佐見 誠，内山 奈穂子，合田 幸広，関野 祐子：新規違法ドラッグ MAM-2201 は CB1 受容体を介して神経伝達を強力に抑制し，複雑スパイク誘発性の細胞内 Ca²⁺ 上昇を減弱させる，生理研研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」(愛知，2014.12)
- 宇佐見 誠¹⁾，高松 美奈²⁾，風間 崇吾²⁾，満長 克祥³⁾，入江 智彦¹⁾，宮島 敦子⁴⁾，土井 守⁵⁾，滝沢 達也：化学物質が培養ラット神経堤細胞の増殖に及ぼす影響に関する研究，第55

回日本先天異常学会学術集会(神奈川,
2015. 7)

〔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

入江 智彦 (Irie Tomohiko)
国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・主任研
究官

研究者番号：24790230