

令和元年6月17日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07006

研究課題名(和文) Ca²⁺-依存性K⁺チャネルによる新しい軸索内活動電位伝搬制御のメカニズム

研究課題名(英文) Noval regulatory mechanisms of axonal action potentials

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Ca²⁺シグナリングとCa²⁺依存性イオンチャネルによる新しい軸索制御メカニズムを明らかにすることを目的として行われた。特に、軸索に発現する電位依存性Ca²⁺チャネルとCa²⁺依存性BKチャネルの同定と定量を目指して、種々の電子顕微鏡法による検出法の開発、軸索にイオンチャネルを局在化させるメカニズムの探索、軸索マーカーの開発を行った。イオンチャネルの同定と定量は未だ途上であるが、局在化のメカニズムについてはその一部を明らかにし、マーカーとして使用したアルツハイマー病タウタンパク質の新規特性を明らかにし、その成果を学術論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、新しい神経メカニズム「軸索可塑性」の基盤になると考えられる軸索Ca²⁺シグナリングとその生理学的役割を明らかにすることを目的として行われた。軸索Ca²⁺シグナリングの役割が明らかになれば、神経細胞の計算能力やネットワークの特性をより深く理解することができる。また、本研究で開発した、電子顕微鏡及び超高解像顕微鏡を用いた軸索イオンチャネル検出法は、これまで困難であった軸索研究に道を開くものである。さらに、軸索タウタンパク質は、アルツハイマー病の原因因子であり、正常神経細胞での動態が明らかになったことにより、正常から病態へのタウの変容を、これまでより詳細に検討することができるようになる。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to elucidate the novel regulatory mechanisms of axonal action potentials by calcium signaling and calcium-dependent ion channels. Particularly, we aimed to develop new methods to identify and quantify axonal ion channels using various microscopy techniques including electron microscopy and super-resolution microscopy, to study how ion channels localize to the axon, and to develop reliable markers of the axons. We have obtained results indicating molecular mechanisms of ion channel localization and new properties of an axonal marker, tau protein, which is a causative factor of Alzheimer's disease.

研究分野：神経生物学

キーワード：イオンチャネル 軸索 活動電位 小脳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経軸索、特にミエリン化された有髄軸索は、樹状突起で集約された情報を活動電位として信頼性高くシナプスに伝えるケーブルとして捉えられてきた。これは、可塑的に機能を変化させる樹状突起や神経終末と比べると、非常に静的な捉え方である。しかし最近、軸索起始部においては、神経細胞の活動に伴って構造と機能がダイナミックに変化し、神経興奮を変化させることが報告された (Kuba et al., 2010, Nature; Grubb and Burrone, 2010, Nature)。また海馬歯状回細胞の有髄軸索においても、活動電位の波形がグルタミン酸の局所投与により制御されることが示されている (Sasaki et al., 2011, Science)。これらの知見は、軸索において、活動電位伝搬がダイナミックに制御されることを示唆しており、神経細胞の情報処理を考える上で、軸索可塑性についても考慮することが不可欠になりつつある。

一方、我々は独自に、小脳プルキンエ細胞の有髄軸索において、Ca²⁺チャンネルおよび Ca²⁺依存性 K⁺チャンネルである BK チャンネルが、活動電位の発生と伝搬を制御していることを見出した (Hirono et al., 2015, J. Neurosci., 科研費萌芽研究の成果)。この結果は、軸索起始部や無髄軸索のみでなく、有髄軸索においても神経シグナルのダイナミックな制御が行われる可能性を示唆している。しかし、Ca²⁺依存性 K⁺チャンネルが実際どのように軸索活動電位を制御しているのか、また、このような軸索活動電位制御メカニズムがいかなる生理的意義を持つのかなど、重要な疑問が数多く残されている。そこで本研究では、この BK チャンネル軸索活動電位制御メカニズムに焦点を当てることで、細胞内 Ca²⁺と Ca²⁺依存性 K⁺チャンネルによる軸索制御の理解を深め、軸索 BK チャンネルを特異的にノックアウトする手法を確立し、このメカニズムの生理的意義を明らかにしていくことを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3つの点について明らかにすることを目指した。

(1) 有髄軸索におけるイオンチャンネルの密度を計測し、Ca²⁺依存性 K⁺チャンネルによる軸索内活動電位制御シミュレーションを構築する。これによりプルキンエ細胞軸索における活動電位制御メカニズムの詳細を明らかにする。

(2) BK チャンネルをランビエ絞輪付近に局在化するメカニズムを明らかにする。

(3) 軸索 BK チャンネルを特異的に阻害するマウスの作成と解析を行い、このメカニズムの生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、Ca²⁺依存性 K⁺チャンネルによる軸索興奮性制御メカニズムを理解し、またその生理的意義について明らかにするために、以下の実験を計画した。

(1) 有髄軸索におけるイオンチャンネルの密度を計測し、Ca²⁺依存性 K⁺チャンネルによる軸索内活動電位制御シミュレーションを構築する。

(2) BK チャンネルをランビエ絞輪付近に局在化するメカニズムの探索。

(3) 軸索 BK チャンネルを特異的に阻害するマウスの作成と解析を行っていく。

4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡を用いた軸索イオンチャンネルの検出法開発

有髄神経はその構造上、電気生理学的な計測が困難なため、ランビエ絞輪で活動電位がどのように制御されているかを理解するためにはシミュレーションの構築が有用である。しかし、電気生理学的に軸索イオンチャンネルの密度を測定することは難しく、有髄軸索の現実的なモデルはいまだ構築されていない。そこで本研究では、ランビエ絞輪およびその近傍のイオンチャンネル密度を測定し、その情報を用いてより現実的かつ妥当な有髄軸索モデルの構築を計画した。

イオンチャンネルの密度を計測する方法として、SDS-FRL 法を用いることとした。この方法では、凍結切断レプリカを免疫染色し、金粒子を観察するため、非常に高詳細・高感度にタンパク質を検出・定量することができる。この方法によるイオンチャンネル検出の高度な技術を持つ、研究協力者の重本隆一博士 (IST オーストリア) の協力のもとに実験を行った。

しかし、脳組織の割断された面のみが対象となること、また、ランビエ絞輪がまばらに存在することから、電子顕微鏡下でこの構造を見つけ、免疫染色像を観察することは非常に困難であることが予想された。実際に、これまでに SDS-FRL でランビエ絞輪の免疫染色像を観察した例はない。そこで、まず、ランビエ絞輪のマーカーである Caspr を免疫染色し、どのような条件で小脳白質の有髄軸索上のタンパク質を効率よく検出できるかを検討した。その結果、Caspr 陽性のランビエ絞輪を検出することはできた (図1)。しかし、その検出効率は非常に低かった (1 / 組織)。BK チャンネルは小脳ではプルキンエ細胞のみに発現し、Caspr 陽性軸索



図1 SDS-FRL におけるランビエ絞輪の同定とマーカーである Caspr の染色像。特徴的な膜の凹凸と、オリゴデンドロサイトの形成する paranodal loop より判別できる。

内のランビエ絞輪検出のための最適な組織調整の方法やチャンネル検出の条件が検討できれば、それを SDS-FRL 法に応用して、チャンネルの検出と密度計測を行っていく予定である。

(2) 軸索 Ca^{2+} チャンネルの検出。
軸索で BK チャンネルがはたらくためには、 Ca^{2+} の供給が必要である。われわれはニッケル感受性の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルがプルキンエ細胞の軸索に存在することを示唆する結果を得ている。そこで、どの Ca^{2+} チャンネルサブタイプがランビエ絞輪に発現するかを明らかにするために、免疫蛍光染色を行った。現時点では、Cav2.1 と Cav3.1 の2つのサブタイプ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得ている(図2)。

また、グルタミン酸受容体チャンネルの一つである GluN2B が、プルキンエ細胞軸索上のランビエ絞輪に局在することを示唆する予備的な結果を得ている(図3)。このチャンネルも Ca^{2+} を透過させることができるため、BK チャンネルに Ca^{2+} を供給するイオンチャンネルの候補として検討を進めていく。

(3) BK チャンネルをランビエ絞輪付近に局在化するメカニズムの探索

BK チャンネルは脳の様々な神経細胞に発現しているが、有髄軸索のランビエ絞輪付近に発現が認められる細胞は、これまでのところプルキンエ細胞のみである。プルキンエ細胞では、BK チャンネルは細胞体と樹状突起にも発現する。すなわち、軸索に局在化する BK チャンネルは、細胞体と樹状突起にあるものとは異なるのではないかと考えられる。実際に、BK チャンネル遺伝子は多くのイントロンを持ち、さまざまな splice variant が生じることが知られている。これ

の数%にのみ検出されると予想されることから、この効率では難しいと結論した。また、BK チャンネルに Ca^{2+} を供給する電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを検出・定量するためにも、別の手法も並行して行うこととした。

包埋前免疫電子顕微鏡法を用いて、ランビエ絞輪の探索とイオンチャンネルの検出がより効率的に行えるかどうかを検討した。この方法の利点は、より大きな体積を探索できることと、マーカーが検出しやすいことである。プルキンエ細胞の軸索を検出するために、マーカーである calbindin と BK チャンネルの検出を行った。包埋前免疫電子顕微鏡法では、抗体の組織への透過を促進するために、凍結融解を行ったり、低濃度の界面活性剤処理を行う必要がある。これによって組織内の構造の保持状態が左右されるため、この条件の検討も行った。その結果、ランビエ絞輪の構造をある程度保ち、calbindin 陽性のランビエ絞輪でチャンネルの検出ができる条件を得た。今後、下記(2)で得られた結果を元に、電子顕微鏡下で軸索 Ca^{2+} チャンネルの検出を行っていく。また、この方法で、小脳白質

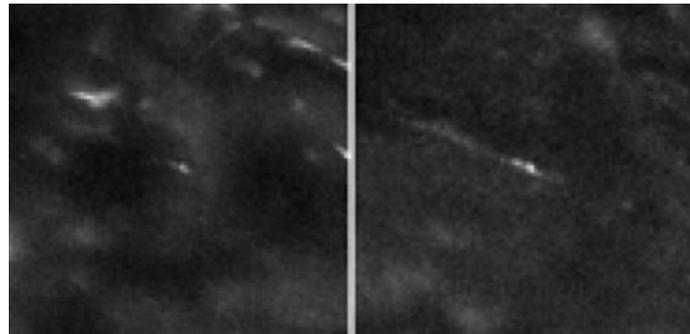


図2 小脳白質における Cav3.1 (右) と Caspr (左) の蛍光免疫染色像。

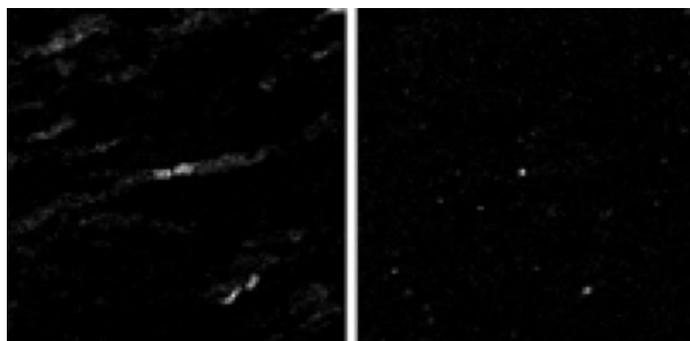


図3 小脳白質における Caspr (左) と GluN2B (右) の染色像。Caspr 陽性の paranode の隙間部分(ランビエ絞輪)に GluN2B が局在化している。

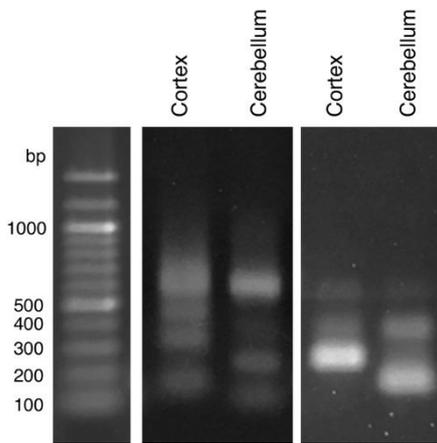


図4 小脳特異的な BK チャネル splice variant の探索。マウス小脳と大脳より total RNA を調整し、RT-PCR によって、いくつかのエクソンにおける splicing を確認した。

は明らかではない。この系を改変することによって、ミエリン化が正常に起こり、BK チャネルの局在化を検討できる実験系の構築をすすめている。

(4) その他の研究成果

軸索イオンチャネルを研究する上で、軸索マーカーは非常に有用である。しかし、さまざまな実験手法、特に免疫電子顕微鏡法に用いることのできる軸索マーカーは非常に少ない。そこでわれわれは、代表的な軸索マーカーの一つであるタウタンパク質に着目し、蛍光や電子顕微鏡観察に有用な抗体の評価を行った。まず、研究協力者である宮坂博士(同志社大学)の作成したモノクローナル抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。タウは、アルツハイマー病の原因因子であり、患者脳では高度にリン酸化し凝集したタウが神経細胞内に蓄積する。非常によく研究されているタンパク質であるが、正常な脳内および神経細胞内での局在は意外にもよく調べられていない。そこで、マウス脳におけるタウの局在を詳細に調べた。その結果、正常な脳ではタウは軸索に局在しているが、驚くことに、主に無髄神経軸索に発現

し、有髄軸索ではほとんど検出されないことが明らかになった(図5)。これは全く新しい発見であり、今後、無髄軸索に発現するイオンチャネルを研究する上で有用なマーカーとなることが示された。また、超高解像顕微鏡法の一つである STED 法を用いて軸索内のタウの局在様式を観察した。超高解像顕微鏡法は、電子顕微鏡の代替法としてイオンチャネル発現の解析に有用であると考えており、その実用性を検証するために、タウの局在解析をテストケースとして行った。タウは微小管結合タンパク質の一つであり、他の微小管結合タンパク質と同様に、微小管に一樣に結合してその構造を安定化すると考えられている。しかし、われわれの結果では、タウは軸索内の微小管にまばらに結合していることが明らかになった(図6)。これらの結果は論文として報告した。

イオンチャネルが局在化する軸索内の構造として、ランピエ絞輪の他に、軸索起始部がある。軸索起始部は活動電位が発生する場所であり、跳躍伝導を担うランピエ絞輪と機能的に類似しているが、その細胞内構造やイオンチャネルの組成も類似していることが示されている。これ

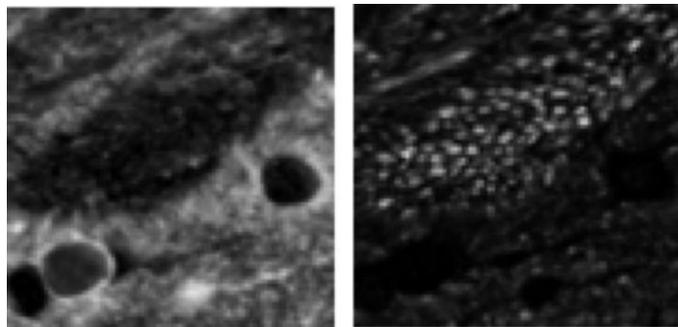


図5 脳梁におけるタウの分布(左)。右は有髄軸索の染色像。タウの染色は有髄軸索とは重ならない。

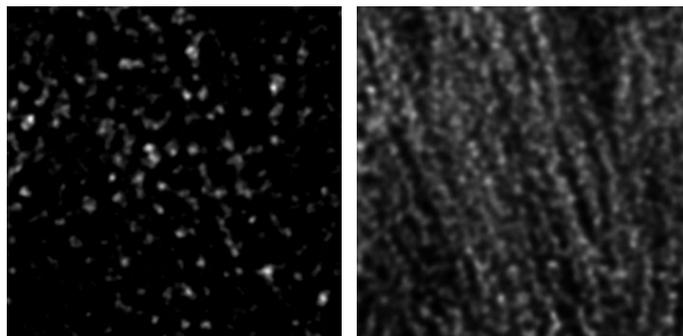


図6 海馬苔状繊維軸索内でのタウの分布(左)。右は微小管の染色像。微小管は繊維状に存在するが、タウはまばらに分布している。

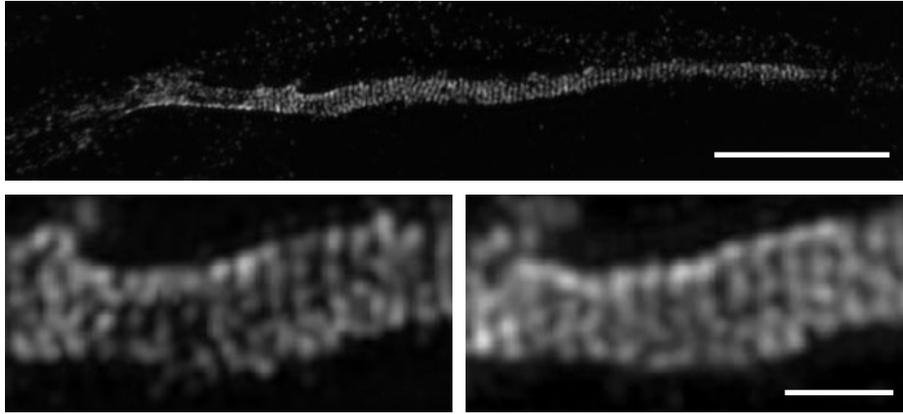


図7 軸索起始部におけるNa⁺チャンネルの局在。上、軸索起始部の全体像。Scale bar, 5 μm。下、拡大図。左はNa⁺チャンネル、右はAnkyrin Gの染色像。Scale bar, 0.5 μm。

らのことから、軸索起始部におけるイオンチャンネル局在メカニズムを明らかにすれば、ランビエ絞輪への局在化メカニズムについての知見が得られる可能性が高いと考えられている。そこでわれわれは、超高解像顕微鏡法であるSIM法を用いて、軸索起始部におけるイオンチャンネルの局在化メカニズムを検討した。軸索起始部とランビエ絞輪では電位依存性Na⁺チャンネルが細胞膜直下のアクチン骨格とアクチン結合タンパク質であるアンキリンを介して、200 nm毎のストライプ状に分布することが知られている(図7)。われわれはshRNAによるノックダウンを用いることにより、このストライプ形成にはアンキリンではなく、スペクトリンが重要であることを明らかにした。この結果は雑誌に投稿し、現在改定中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Jensen CS, Watanabe S, Stas JI, Klaphaak J, Yamane A, Schmitt N, Olesen SP, Trimmer JS, Rasmussen HB, Misonou H. (2018) Trafficking of Kv2.1 Channels to the Axon Initial Segment by a Novel Nonconventional Secretory Pathway. *Journal of Neuroscience* (査読あり) 37, 11523-11536.
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3510-16.2017
2. Misonou H. (2018) Precise localizations of voltage-gated sodium and potassium channels in neurons. *Developmental Neuroscience* (査読あり) 78, 271-282.
DOI: 10.1002/dneu.22565
3. Kubo A, Misonou H., Matsuyama M, Nomori A, Wada-Kakuda S, Takashima A, Kawata M, Murayama S, Ihara Y, Miyasaka T. (2018) Distribution of endogenous normal tau in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* (査読あり) 527, 985-998.
DOI: 0.1002/cne.24577

〔学会発表〕(計3件)

1. 岩田実里、渡辺祥司、宮坂知宏、御園生裕明、「タウタンパク質の神経細胞における軸索局在化機構と細胞内動態」、認知症学会、2018年、青森
2. Minori Iwata, Shoji Watanabe, Tomohiro Miyasaka, Hiroaki Misonou、"Study of axonal localization of tau in neurons"、Society for Neuroscience meeting (国際学会)、2018年11月、San Diego、米国
3. 御園生裕明、"Neurobiology of the Axon"、OIST Symposium (国際学会、招待講演)、2016年9月、OIST、沖縄

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
なし。

(2)研究協力者

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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。