

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790211

研究課題名(和文)

神経伝達物質による樹状突起電位依存性チャネル制御の薬理的解析

研究課題名(英文)

Regulation of dendritic voltage gated ion channels by neurotransmitters.

研究代表者

塗谷 睦生 (NURIYA MUTSUO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60453544

研究成果の概要(和文):本研究においては脳神経細胞の活動の制御に重要な役割を果たすと考えられる電位依存性チャネルの調節機構を薬理的に解析した。その結果、通常・疾患条件下においてこれらの分子が神経活動依存的に制御され、細胞の興奮性を保っている事が明らかとなった。更に、そのような神経細胞の活動の計測を可能にする顕微鏡技術が開発され、軸索における電位情報伝達の様式が明らかになった。これらの結果は神経細胞の新たな恒常性維持機構を明らかにすると共に、その機能解析を可能にする新たな顕微鏡技術をもたらすものとなった。

研究成果の概要(英文):In this study, regulations of voltage gated ion channels in neurons, which are considered to play key roles in neuronal physiology, were studied. Pharmacological investigations revealed that these channels are regulated by neuronal activity, which in turn contribute to the maintenance of their activities. In addition, a novel microscopy technique that allows investigation of neuronal activities has been developed and applied to reveal the nature of voltage information processing in axons. Therefore, this study revealed new cellular mechanisms by which neurons maintain their overall activities and also provided a new microscopic technique that can be applied to future physiological researches.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：神経伝達物質、電位依存性チャネル、翻訳後修飾、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能を裏付ける神経細胞の活動は、ドーパミンやセロトニン等の神経調節物質を含む多様な神経伝達物質によって制御されている。その重要性を裏付けるかのように、これらのシグナル伝達系の障害が様々な精神疾患において示唆されており、また多くの向精神薬がこれらの系の制御により作用

を示すと考えられている。しかしそれらの神経調節物質がどのような機序をもって神経細胞の情報処理機構の制御をしているかについては未だに多くが謎に包まれている。一方近年、神経細胞の樹状突起における電位依存性チャネル分子がこれら神経調節物質により分子レベルで修飾される事が分かってきた。しかしこれがどのような細胞生物学的

な機序を介してどのようにチャンネルの機能を、そして樹状突起における情報処理を変化させるかは明らかになっていない。そこで本研究では、正常・疾患条件下においてこれらのチャンネルがどのように制御され、脳、そして精神機能の発現に寄与しているかへの基礎・臨床的な知見を得る事を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は大きく二つに分けられた。一つは神経伝達物質による電位依存性チャンネルの生理・疾患条件下での制御を薬理的に明らかにする事。そしてもう一つは電位依存性チャンネルの調節が大きな影響を与えると考えられる、神経細胞細部における電位情報伝達を解析する新たな顕微鏡技術を開発し、応用する事である。

(1) 電位依存性チャンネルの生理・疾患条件下での制御機構の薬理的解析

まず最初に、様々な神経伝達物質による神経細胞の刺激により、どの電位依存性チャンネルがどのような制御を受けているかについて調べた。具体的には、特に AMPA 型グルタミン酸受容体で明らかとなったような細胞膜輸送の動的な変化を調べた。次に、前述の実験により明らかとなった制御の一部を取り上げ、その分子レベルでの機序を明らかにする事を試みた。特に神経伝達物質の刺激から電位依存性チャンネルの細胞膜動態の変化に至るまでの分子・細胞学的な機序、そしてその経路の樹状突起内での時間・空間的な特異性等の詳細を明らかにする事を試みた。最後に、上記のようにして得られた分子レベルでの薬理的知見を更に臨床的知見へと発展させるため、これらを検証し得る *in vivo* の系の確立と応用を試みた。具体的にはマウス・ラットを用い、臨床的な脳機能疾患動物モデルを作り、分子レベルでの知見を試す事でその後の創薬へと繋がる臨床薬理的な知見を得る事を目指した。

(2) 電位情報伝達の可視化技術の開発

電位依存性チャンネルの調節は、これらが発現する神経細胞の樹状突起や軸索において電位変化の情報伝達に大きな影響を与えると考えられる。しかし、これらの構造は非常に微細で、通常の電気生理学的手法やイメージング法では定量的な電位計測をするのが非常に困難であった。この状況を打開し電位依存性チャンネル調節の神経細胞情報伝達に対する影響を調べるため、新規の 2 光子イメージング法、第二高調波 (Second Harmonic Generation: SHG) イメージングの神経細胞への適用とその応用による生理機能解析を試みた。

3. 研究の方法

本研究においては、神経伝達物質による電位依存性チャンネルの制御機構とその機能解析を行うため、(1) 分散培養神経細胞の薬理的な操作による解析を行い、それをより生理的な知見へと発展させるために (2) 動物モデルを用いた解析を行い、最後にそれらの機能解析を可能にするために (3) 光第二高調波イメージングの開発と応用を段階的に進めた。

(1) 分散培養神経細胞を用いた神経活動依存的な電位依存性チャンネル制御機構の解析

マウスから調整した神経細胞を分散培養し、2~3週間の培養の後成熟した所で様々な刺激を加えた。刺激後に細胞膜特異的のビオチン化を行い、神経細胞膜に発現している蛋白質を分画した。得られたサンプルを定量的ウェスタンブロット解析する事で、様々な電位依存性チャンネルの細胞膜での発現を非刺激条件下のものと比較した。具体的な刺激としては、グルタミン酸と GABA に加えドーパミン、セロトニン、ニコチン等の神経調節物質、更には臨床で用いられている向精神薬等を用いた。これら生化学的手法により得られた知見を基に、蛍光標識を導入したそれぞれのチャンネル分子のイメージングにより高い空間分解能をもって神経細胞での部位特異的な変化を調べ、電気生理学的手法と合わせて機能解析を試みた。

(2) 疾患動物モデルを用いた電位依存性チャンネルの制御機構の解析

次に、生理・疾患条件下における電位依存性チャンネルの制御機構を解析するため、脳機能障害動物モデルを開発し、解析した。臨床的にも重要な脳内の一時的な無酸素暴露を再現するため、マウスを無酸素条件下に置いた後に元に戻し回復させる系を確立した。この無酸素・回復動物から摘出した脳を生化学的に解析する事により、このような条件における脳内電位依存性チャンネルの制御機構を解析した。

(3) 第二高調波イメージングを用いた神経細胞における電位情報伝達の解析

神経細胞の電位情報伝達を可視化するため、近年開発された光第二高調波イメージングを分散培養した神経細胞に適用した。これを電気生理学的手法および刺激と合わせる事により、軸索における電位情報伝達様式を解析した。

4. 研究成果

(1) 神経活動依存的な HCN1 チャンネルタンパク質の制御

神経活動依存的な電位依存性チャンネルの

制御機構を調べるため、分散培養神経細胞の活動を薬理的に操作し、その後神経細胞から抽出したタンパク質をウェスタン・ブロッティング法により解析した。この結果、樹状突起に発現する HCN1 チャンネルが神経活動依存的な発現量の変化を示す事が明らかとなった。更にその後の生化学的な解析により、HCN1 タンパク質は神経活動依存的にその形質膜への輸送、そして全体の発現量が可逆的に調節されている事が明らかになった。また、電気生理学的解析により、このような HCN1 タンパク質の制御がその機能的な変化へと結びつく事が確かめられた。ここで HCN1 は樹状突起においてカチオン・チャンネルとして機能することにより膜興奮性を負に制御する事が知られており、今回明らかとなったその調節は、神経細胞の集団活動に対抗するような効果を示す事が明らかとなった。これは、常に変化する神経細胞のネットワーク活動の中で、神経細胞が自身の恒常性を保つのに重要な機構と考えられ、今回の研究は HCN1 チャンネルを介したその分子・細胞レベルでの制御機構を初めて明らかにするものとなった。

(2) 無酸素条件下における Kv2.1 の制御

上記の分散培養神経細胞の解析系から、細胞体に発現しその興奮性を負に制御するカリウムチャンネル Kv2.1 も神経活動依存的なタンパク質の変化を起こす事が明らかとなった。このような知見をより生理的な条件下で解析するため、脳機能障害を伴う疾患動物モデルの開発と応用を試みた。

窒息などによる脳組織の無酸素・低酸素状態への曝露は臨床的にも非常に重要な病態でありながら、それを模倣する動物モデルが不足していた。そこで我々は、無酸素に曝露され致命的なダメージを受けた後に通常の条件下で回復する、無酸素・回復マウスモデルを確立した。次に、この動物モデルを利用し、無酸素曝露下、そしてその後の回復状況下における脳の様々なチャンネルの制御について解析した。すると、Kv2.1 チャンネルが NMDA 型グルタミン酸受容体の活性を介した可逆的なリン酸化により特異的に制御されている事が明らかとなった。ここで、このリン酸化は Kv2.1 のチャンネル機能を制御する事が知られている。よってこの結果は、Kv2.1 のリン酸化状態の調節による神経活動の制御が、脳機能疾患条件下においてもダイナミックに起こっている事を示唆する新たな知見となった。これらは本課題で提唱した神経伝達物質による電位依存性チャンネルの制御とその分子機構を疾患条件下の個体で示したものとなり、脳機能制御の新たな発現機構を示唆するものとなった。また、今回開発された無酸素・回復動物モデルは、窒息などによる

脳機能障害の臨床的な研究に今後幅広く応用され得るものとなる事が期待された。

(3) 光第二高調波イメージングの応用による軸索での電位伝達様式の解析

最後に、このようなチャンネルの局所的な制御の機能的な役割を明らかにするため、神経細胞微細部位における電位変化を可視化する 2 光子イメージング法の開発を試みた。これまで SHG の実験は主に脳スライスを用いて行われてきたが、本研究においては分散培養神経細胞にこれを適用した。この系の導入により、これまで SHG を用いて可視化する事ができず、よって定量的な電位イメージングをする事ができなかった軸索の SHG による可視化が実現された。軸索からの SHG 計測に電気生理学的手法による電位変化を組み合わせる事により、分散培養神経細胞においては活動電位の伝播は非常に効率的である一方、電位依存性チャンネルを介さない受動的な電位の伝播は強い減衰を受け、非常に効率の悪いものである事が明らかとなった。これは神経科学の研究において広く一般的に用いられる分散培養神経細胞の軸索における電位情報伝達に関して新たな知見を与えると共に、SHG イメージングが本課題に提唱した局所的な神経活動の制御を定量的に解析するのに非常に有効な手段となる事を期待させるものとなった。

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)

1. Nuriya M and Yasui M. Membrane potential dynamics of axons in cultured hippocampal neurons probed by second harmonic generation imaging. *Journal of Biomedical Optics*. 査読有、15(2)、2010、020503.

2. Ito T, Nuriya M and Yasui M. Regulation of Kv2.1 phosphorylation in an animal model of anoxia. *Neurobiology of Disease*. 査読有、38(1)、2010、85-91.

3. Arimitsu T, Nuriya M, Ikeda K, Takahashi T and Yasui M. Activity dependent regulation of HCN1 protein in cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、387 (1)、2009、87-91.

[学会発表](計 13 件)

1. Mutsuo Nuriya、"Imaging Membrane Potential Dynamics in Fine Structures using Second Harmonic Generation

Imaging”、Light in Life Science Conference、2010年12月1日、東京

2. 塗谷睦生、「第二高調波イメージングを用いた神経細胞情報伝達機構の解析」、第31回日本レーザー医学会総会、2010年11月14日、名古屋

3. 塗谷睦生、安井正人、「第二高調波イメージングを用いた培養海馬神経細胞の軸索における電位情報伝達の解析」、第48回生物物理学学会年会、2010年9月20日、仙台

4. 塗谷睦生、「第二高調波イメージングを用いた神経細胞細部における電位情報伝達の解析」、日本バイオイメージング学会第19回学術集会、2010年9月9日、東京

5. Mutsuo Nuriya、“Biochemical and Optical Analyses of Membrane Potential Dynamics in Neurons”、Fifth International Neural Microcircuitry Conference、2010年6月30日、東京

6. Mutsuo Nuriya、“Imaging Membrane Potential Dynamics in Fine Structures using Second Harmonic Generation Imaging”、Light in Life Science Conference、2009年11月26日、オーストラリア

7. Mutsuo Nuriya、“Electrical Signaling in Dendrites Probed by Second Harmonic Generation Imaging”、The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society、2009年9月16日、名古屋

8. Mutsuo Nuriya、“Imaging Membrane Potential Dynamics in Fine Structures using the Second Harmonic Generation Imaging”、International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009)、2009年8月1日、京都

9. Mutsuo Nuriya、“Imaging Membrane Potential Dynamics in Dendrites using Second Harmonic Generation Imaging”、International Symposium “Topical Problems of Biophotonics-2009”、2009年7月23日、ロシア

10. 塗谷睦生、伊藤尚志、安井正人「NMDA型グルタミン酸受容体活性によるKv4.2カリウムチャネルの制御」、第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、横浜

11. 塗谷睦生、「Second Harmonic Generation

(SHG)イメージングによる定量的膜電位計測」、第46回生物物理学学会年会、2008年12月4日、福岡

12. Mutsuo Nuriya, Takashi Ito, Anne E. Anderson and Masato Yasui、“Regulation of Kv4.2 by Neuronal Activity.”、北米神経科学学会年会、2008年11月16日、アメリカ合衆国

13. 塗谷睦生、「多光子励起レーザ走査顕微鏡が切り拓く新しいイメージングの世界」、第31回日本神経科学大会、2008年7月10日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

塗谷 睦生 (NURIYA MUTSUO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60453544

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし