

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200016

研究課題名（和文）チャンネルロドプシン発現マウス開発による新生神経細胞機能発現メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms of the synapse formation of newborn neurons by developing mice with channelrhodopsin-2 only in newborn neuron in the dentate gyrus.

研究代表者

安田 浩樹 (YASUDA HIROKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60294071

研究成果の概要（和文）：

本研究課題は、**新生神経細胞**が海馬歯状回で誕生・成熟して形成するシナプスの機能発達メカニズムと、カンナビノイドやアルコール等依存性薬物の新生シナプス発達に対する影響を解明することが目的である。新生神経細胞が海馬CA3に作るシナプスの発達を電気生理学的に解析するために、神経幹細胞が分裂して新生神経細胞として成熟する間の、ある一定期間にのみ光刺激で脱分極を誘発できるチャンネルロドプシン2（chr2）を発現するマウスを作成している途中である。海馬新生神経細胞は未成熟の分裂後3週ほどGAD67等抑制性マーカーを発現しているため、抑制性細胞マーカーにchr2を発現したマウスを使って、海馬CA3において、歯状回光刺激により興奮性シナプス伝達が誘発されるか検討している。

海馬歯状回における神経細胞新生は、抗うつ剤のターゲットであることが近年報告されており、研究代表者はうつ状態の原因の一つ、ストレスが海馬歯状回顆粒細胞に与える影響を研究している。数日間の強制水泳により顆粒細胞が、活動電位が発生しやすい状態になることを見いだした。膜の興奮性制御には様々なイオンチャンネルが関与しているが、特に電位依存性、あるいはカルシウム依存性カリウムチャンネルがこの現象に関与しているか、現在検討中である。また、蛋白質キナーゼPKNについて、神戸大学バイオシグナルセンター・向井秀幸准教授と共同研究しているが、ストレスによる興奮性亢進におけるPKNの役割を詳細に調べている。

研究成果の概要（英文）：

We planned to develop a new genetically modified mice whose newborn neurons in the dentate gyrus in the hippocampus possess channelrhodopsin-2 (chr2) to analyze the mechanisms of synapse formation of newborn neurons. We are still in the middle of generating the chr2 mice we originally planned, instead we used another mice in which neurons with markers of inhibitory cells express channelrhodopsin-2, because newborn excitatory neurons in the dentate gyrus also have these markers until about three weeks after birth. We now check whether light stimulation on the dentate gyrus evoked EPSCs in pyramidal neurons in the CA3 region and inhibitory neurons in the hilus.

Recent literature suggests that antidepressants improve depressed mood through increasing generation of newborn neurons in the dentate gyrus in the hippocampus, therefore we examined the effects of stress, which can cause depression, on the excitability of granule cells in the dentate gyrus. We found that forced swimming made

granule neurons more excitable and now investigating the mechanisms that underlie the elevated excitability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：神経新生、海馬歯状回、チャンネルロドプシン-2、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

動物が物をおぼえる、あるいは学習をする際には、その情報ははじめ海馬で処理をされて、記憶として短期間ストアされる。このとき海馬の神経回路内でシナプス伝達の可塑的現象が生じて情報が蓄えられると考えられており、長期増強や長期抑圧といったシナプス可塑性の分子メカニズムは電気生理学および分子生物学的手法で精力的に研究されている。これらはすでに存在するシナプスにおいて、その活動量に応じて伝達効率が増減するものである。一方で近年海馬歯状回には、成熟した動物においても**神経幹細胞**が分裂を繰り返して**新生神経細胞**に分化することが明らかになっている。この神経幹細胞は、学習することによって増殖・分化が増加することが報告されている。後に成熟して新生神経細胞となり、やがてCA3領域神経細胞とシナプスを形成することによって機能的シナプス数を増加させ、その結果学習効率を上げていることが想像されるが、新生細胞の出力シナプスについてはこれまで詳細は不明である。またけいれんや虚血といった脳の病的状態でも増殖が増加するが、おそらく脳組織の障害による機能低下を神経細胞新生によって代償する作用があると考えられる。よって、新生神経細胞による新しいシナプス形成メカニズムおよびその制御因子の探索は、神経幹細胞による神経難病治療の可能性を追

求する上で重要である。

これまで、新生細胞が形成するシナプスが機能していることを電気生理学的に明らかにした報告は、本年世界で初めて報告された一報しかなく (*Nature Neurosci.* 2008)、シナプス形成を制御しているメカニズムに関しては、全く明らかになっていない。電気生理学的報告がほとんどなされていない最大の理由は、新生シナプス応答のみを記録する際の技術的な困難によるものである。従来は細胞外刺激法では、歯状回新生細胞のみならず成熟顆粒細胞を活性化してしまうので、新生シナプスのみの応答が得られない。新生細胞-CA3細胞同時ペア記録は、通常(蛍光マーカーのない)マウス海馬スライス標本では新生細胞の同定が難しく、かつシナプス結合がおそらく少ないため、仮にペア記録ができてシナプス結合が検出できる確率が低いので、極めて効率の悪い実験となる。2005年に光によって脱分極を生じるチャンネルロドプシン2(chr2)を培養神経細胞に発現させて、シナプス応答を記録したという報告が初めてなされた (*Nature Neurosci.* 2005)。そこで申請者らは、はじめに新生神経細胞にのみ発現しているタンパク質、doublecortin (dcx)のプロモーター下にGFP-chr2を発現させた Dcx-chr2-GFP トランスジェニックマウスを作成することにした。Dcx-chr2-GFP マウスの海馬スライスでは、GFP シグナルによっ

て新生細胞が同定できる。さらに、チャンネルロドプシンは新生神経細胞にのみ発現していると考えられるので、青色光によって新生細胞のみ興奮させることができる。本研究課題では、このマウスを用いて海馬歯状回・新生神経細胞が CA3 ポストシナプス細胞とシナプス形成・成熟する制御因子を明らかにする。

2. 研究の目的

前述の Dcx-chr2-GFP マウスマウスを用いて、(1)新生神経細胞-CA3 神経細胞間シナプス間の基本的性質(ポストシナプスのグルタミン酸受容体サブタイプ、シナプス可塑性余地の計測)、(2)新生シナプス形成メカニズム、特にプロテインキナーゼ A (PKA) 依存性長期増強の関与、および制御因子の探索、(3)幹細胞数に影響を及ぼすことが報告されているカンナビノイドやアルコールといった外因性の依存性薬物の新生シナプス形成に対する作用を明らかにする。

3. 研究の方法

[①Dcx-chr2-GFP マウスの作成]

本研究課題では、幹細胞由来の海馬歯状回・新生神経細胞が CA3 神経細胞との間に形成するシナプスの機能発現メカニズムを解析するので、新生細胞のみ活性化できるモデル動物(マウス)が必要である。2005年に、青色光によりチャンネルが開いて細胞膜を脱分極させる「チャンネルロドプシン2 (Chr2)」を培養神経細胞に発現させて脱分極を起こすことができることが報告された (*Nature Neurosci.* 2005)。この著者らは、Chr2 発現細胞を青色光で脱分極させると、シナプスを形成している隣の神経細胞からシナプス応答を記録できたと報告している。そこで申請者らは、Chr2 を新生神経細胞にのみ発現したトランスジェニックマウスを作成すれば、このマウスから得られた海馬スライス標本の歯状回を青色光で刺激すると、CA3 領域より新生神経細胞にのみ由来したシナプス応答を記録できると考えた。神経幹細胞由来の未熟な新生神経細胞には doublecortin (dxc) が発現しており、成熟すると消失するので、chr2-GFP を doublecortin プロモーター下に発現させたトランスジェニックマウス

(Dcx-chr2-GFP マウス)を作成することを計画している。dxc プロモーター- chr2-GFP 遺伝子は研究協力者のアドバイスのもとで連携研究者が作成し、トランスジェニックマウス作成は、業者に外注する。

[②Dcx-chr2-GFP マウスの海馬新生細胞における GFP および chr2 発現チェック]

Dcx-chr2-GFP マウスの海馬において、GFP を発現している細胞が果たして新生神経細胞か否か、確認する。GFP 陽性細胞が POMC など新生細胞特異的マーカーを発現しているか、免疫組織染色でチェックする。GFP 陽性細胞が新生細胞マーカーも発現していることが確認できれば、次に GFP 陽性細胞におけるチャンネルロドプシンの発現を確認する。Dcx-chr2-GFP マウスより海馬スライス標本を作製して電気生理学的手法を用いる。GFP 陽性細胞から電気記録を行いながら、青色光で光刺激する。このとき脱分極を観察できれば、チャンネルロドプシン2を発現していることがわかる。

4. 研究成果

神経幹細胞が分裂して新生神経細胞として成熟する間の、ある一定期間にのみ光刺激で脱分極を誘発できるチャンネルロドプシン2 (chr2)を発現するマウスを作成している途中である。海馬新生神経細胞は未成熟の分裂後3週ほどGAD67等抑制性マーカーを発現しているので、現在は抑制性細胞マーカーにchr2を発現したマウスを使って、海馬CA3において、歯状回光刺激により興奮性シナプス伝達が誘発されるか検討している。

海馬歯状回における神経細胞新生は、抗うつ剤のターゲットであることが近年報告されており、研究代表者はうつ状態の原因の一つ、ストレスが海馬歯状回顆粒細胞に与える影響を研究している。数日間の強制水泳により顆粒細胞が、活動電位が発生しやすい状態になることを見いだした。膜の興奮性制御には様々なイオンチャンネルが関与しているが、特に電位依存性、あるいはカルシウム依存性カリウムチャンネルがこの現象に関与しているか、現在検討中である。また、蛋白キナーゼPKNについて、神戸大学バイオシグナルセンター

・向井秀幸准教授と共同研究しているが、ストレスによる興奮性亢進におけるPKNの役割を詳細に調べている。

上記のシナプス発達のメカニズムとして、シナプス可塑性の関与が想定されており、予備実験として長期抑圧のメカニズムを電気生理学的に解析している。本研究課題でも取り扱うカンナビノイドについて、海馬や大脳皮質シナプスに、シナプス前性異シナプス性長期抑圧を誘発することを報告した(Yasuda et al., PNAS 2008, Huang et al., J. Neurosci., 2008)。私たちはタンパク質キナーゼPKNノックアウトマウス海馬において幼若期に、同じ異シナプス性長期抑圧がシナプス後性に生じることを見いだした。

1、この長期抑圧はNMDA受容体、および代謝型グルタミン酸受容体依存性である、

2、PKNはシナプス後部で作用しており、亢進した長期抑圧はシナプス後性の発現を示し、エンドサイトーシスが関与している、

3、KOマウスにおいては、長期抑圧が亢進している生後0-2週の間は、野生型マウスに比べてシナプス伝達が未発達で、サイレントシナプスが多い。またPKN KOマウスでは長期抑圧誘発刺激によってサイレントシナプスがより多く発現する。

以上が明らかになった。幼若海馬においてはPKNがシナプス長期抑圧を抑制することによって、シナプス発達を制御していることがわかった。

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4件)

①Hideto Takahashi, Kei-ichi Katayama, Kazuhiro Sohya, Hiroyuki Miyamoto, Tuhina Prasad, Yoshifumi Matsumoto, Maya Ota, Hiroki Yasuda, Tadaharu Tsumoto, Jun Aruga & Ann Marie Craig
Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTP δ trans-synaptic interaction
Nature Neuroscience 2012, 15(3): 389-398
査読有り

②Shinnichi Yokota, Teruyoshi Hirayama, Keizo Hirano, Ryosuke Kaneko, Shunsuke Toyoda, Yoshimi Kawamura, Masumi Hirabayashi, Takahiro Hirabayashi and Takeshi Yagi Identification of the Cluster Control Region for the Protocadherin- β Genes Located beyond the Protocadherin- γ Cluster. *J. Biol. Chem.* 2011, 286: 31885-31895 査読有り

③Noriyuki Akahoshi, Yasuki Ishizaki, Hiroki Yasuda, Yoshiya L. Murashima, Toshikazu Shinba, Kaoru Goto, Toshiyuki Himi, Jerold Chun, Isao Ishii
Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate receptor 2.
Epilepsy & Behavior 2011, 22(4): 659-665.
査読有り

④ Ryosuke Kaneko, Masahumi Kawaguchi, Tomoko Toyama, Yusuke Taguchi, Takeshi Yagi
Expression levels of *Protocadherin- α* transcripts are decreased by nonsense-mediated mRNA decay with frameshift mutations and by high DNA methylation in their promoter regions.
Gene 2009, 430: 86-94 査読有り

[学会発表] (計9件)

①安田 浩樹
発達期海馬長期抑圧誘発におけるカルシウムソースのスイッチ
Turning on of CICR in LTD induction after critical period of NR2 subunits switch
第34回日本神経科学学会 (パシフィコ横浜)
2011年09月16日

②守村 直子 安田 浩樹 山田 一之 富岡 直子 片山 圭一 山口 和彦 太田 摩耶 神谷 明子 有賀 純
Lrfrn2/SALM1 による海馬興奮性シナプスの機能制御とその遺伝子欠損マウスにみられた行動異常
第34回日本神経科学学会 (パシフィコ横浜)

2011年09月15日

③Shirao, T., Hanamura, K., Yasuda, H., Kajita, Y., Kamata, Y., Sekino, Y. and Kojima, N.

REGULATORY ROLE OF DREBRIN IN HIPPOCAMPUSDEPENDENT LEARNING

ISN-ESN-2011 (International Society for Neurochemistry and European Society for Neurochemistry) 23rd Biennial Meeting (Athens, Greece) 2011年8月30日

④児島 伸彦、安田 浩樹、花村 健次、白尾 智明

Isoform conversion of drebrin is required for hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity in the elderly
ドレブリンのアイソフォーム変換は海馬依存的学習とシナプス可塑性に必要である
第84回日本薬理学会 (パシフィコ横浜) 2011年3月23日

⑤N. KOJIMA, H. YASUDA, K. HANAMURA, T. SHIRAO

Neuron-specific drebrin isoform is necessary for hippocampus-dependent learning in adulthood but not in young age of mice

Neuroscience 2010 Society for Neuroscience 40th Annual Meeting (San Diego Convention Center, San Diego, USA) 2010年11月16日

⑥児島 伸彦 安田 浩樹 花村 健次 白尾 智明

ドレブリンアイソフォーム変換不全マウスにおける海馬シナプス可塑性と海馬依存的学習の障害

Neuro2010 第 33 回日本神経科学学会 (神戸国際会議場) 2010年09月04日

⑦Naoko Morimura, Maya Ota, Hiroki Yasuda, Kei-ichi Katayama, Naoko Hara, Kazuyuki Yamada, Kazuhiko Yamaguchi, Jun Aruga
Lrln2/SALM1, a synaptic leucine-rich

repeat transmembrane molecule is required for proper synapse maturation and brain function

The 32nd Annual Meetings of the Japan Neuroscience Society P1-b23 (名古屋国際会議場、Nagoya), 2009年9月17日

⑧Hiroki Yasuda, Yishitaka Ono, Hideyuki Mukai

Synaptic maturation by PKN during development

The 32nd Annual Meetings of the Japan Neuroscience Society P1-b23 (名古屋国際会議場、Nagoya), 2009年9月16日

⑨Nobuhiko Kojima, Hiroki Yasuda, Kenji Hanamura, Hiroyuki Yamazaki, Tomoaki Shirao

SPECIFIC ROLE OF NEURONAL ISOFORM OF DREBRIN IN HIPPOCAMPAL SYNAPTIC PLASTICITY AND FEAR MEMORY

The XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) P1PM-7-6 (Kyoto), 京都国際会議場、2009年7月28日

〔図書〕 (計1件)

①Hiroki Yasuda and Hideyuki Mukai
Electrophysiological technique for analysis of synaptic function of PKN1 in hippocampus. Protein Kinase Technologies, Neuromethods vol.68, (Mukai H, eds.) Springer, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 浩樹 (YASUDA HIROKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：60294071

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

金子 涼輔 (KANEKO RYOSUKE)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40390695