

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：74415

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790294

研究課題名（和文） 小脳顆粒細胞を用いた細胞膜電位変化による神経発生・成熟調節の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of neuronal development and maturation regulated by alteration of membrane potential using cerebellar granule cells

研究代表者

岡澤 慎 (Okazawa Makoto)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門・研究員

研究者番号：40414130

研究成果の概要（和文）：神経発生期（細胞増殖、分化、細胞移動を意味する）とその後の成熟期における電気的性質は、ダイナミックに変化しさまざまなカルシウムシグナルの活性を制御しているにもかかわらず、神経回路形成における役割はいまだ不明な点が多い。本研究では、マウス小脳顆粒細胞を対象に、細胞膜の電位変化と神経発生・成熟との関係に着目し、研究を行った。その結果、神経成熟期の樹状突起の形態変化の詳細と活動電位依存的な細胞内カルシウムイオン濃度上昇を介した成熟遺伝子の発現誘導メカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The role of alteration of electrophysiological properties of neurons on the formation of neuronal network remains to be elucidated. Using cerebellar granule cells, I demonstrated the processes of dendritic maturation and the mechanisms of activity-dependent up-regulation of maturation genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医科学一般

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：神経発達、小脳顆粒細胞、静止膜電位、シグナル伝達、

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は活動電位による脱分極で電位依存性カルシウムチャネルが活性化し細胞

内カルシウムイオン濃度上昇が起こる。その結果種々のカルシウムシグナルが活性化する。一方、数多くの神経細胞で発生（増殖・

分化・移動)期、静止膜電位は浅く脱分極傾向にあるが、成熟期を経た細胞では分極することが報告されている。静止膜電位の脱分極も細胞内カルシウムイオン濃度上昇を誘発する。多くの研究では発生・成熟期に静止膜電位が分極していく事を考慮しない。我々は、活動電位による脱分極と静止膜電位の脱分極を区別することで、発生期と成熟期でカルシウムの作用が異なることを示してきた (Nakanishi S., Okazawa M., 2006, *J Physiol.*575, 389-95, Iijima K., Abe H., Okazawa M., et. al., 2008, *PNAS*, 105, 12010-5)。

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまでに神経成熟期における静止膜電位の分極がカルシニューリン脱リン酸化酵素の活性を制御し、シナプス形成(樹状突起の剪定、樹状突起先端における鉤爪状構造の形成、シナプス後電流の誘発)を誘導することを明らかにした。また、活動電位が成熟遺伝子の一つである NR2C NMDA 受容体の発現誘導に必須であることを見出した。そこで、本研究課題は、シナプス形成の過程である、樹状突起の成熟過程を解析することと、活動電位が成熟遺伝子の発現を誘導するメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、主に野生型マウスの小脳顆粒細胞の初代培養系および小脳スライス器官培養系を用いた。小脳顆粒細胞への遺伝子導入はリポフェクション法と電圧ポレーション法を用いた。種々の阻害剤を培養液に加え、その影響を調べた。解析方法としては、定量的 PCR 法等を用いた分子生物学的解析や、免疫組織学的解析、生化学的解析、細胞生物学的解析、形態変化の解析を行った。

さらに、Fura-2 を用いた細胞内カルシウムイオン濃度測定などのバイオイメージング解析や、パッチクランプ法による電気生理学的解析を行い、関与する分子の神経回路形成における生理機能の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 小脳顆粒細胞の成熟期のシナプス形成を特徴づける、樹状突起の剪定と鉤爪状構造の形成の形態変化の過程を解析するために、小脳スライス器官培養系を用いて小脳顆粒細胞の長時間連続観察可能な系を確立した。即ち、メンブレン上に配した小脳スライス中の顆粒細胞に GFP 発現ベクターを導入後、正立顕微鏡下、33°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養しながら長時間タイムラプス観察ができる系を立ち上げた。その結果、移動期の後、多数の樹状突起を伸ばした小脳顆粒細胞は、樹状突起の剪定と同時進行して、鉤爪状構造を形成することがわかった。

(2) カルシウム指示薬 Fura-2 を用い、小脳顆粒細胞の初代培養における細胞内カルシウムイオン濃度測定を行った。その結果、神経成熟期に、周期的な細胞内カルシウムイオン濃度上昇が誘発されることがわかった。この細胞内カルシウムイオン濃度上昇は、グルタミン酸受容体のアンタゴニスト (NBQX+CPP) の存在下で阻害された。また、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤 (tetrodotoxin) の存在下でも阻害された。即ち、神経成熟期に起こる細胞内カルシウムイオン濃度上昇はシナプス伝達依存的かつ活動電位依存的に誘発されることがわかった。また、定量的 RT-PCR 法を用いた結果から、以下のどの条件、即ち、薬理的にグルタミン酸受容体を阻害した場合にも、tetrodotoxin により活動電位を阻害した場合にも、電位依存性カルシウムチャンネルを阻害

した場合にも、一連の成熟遺伝子 (GABAA $\alpha$ 6, NR2C, Kv1.1, Tiam1 等) の発現誘導が抑制されることが明らかになった。Nav1.2 イオンチャンネルを siRNA でノックダウンし、パッチクランプ法で解析したところ、活動電位の発生が抑制された。また、活動電位依存的な細胞内カルシウムイオン濃度上昇の結果、転写因子 Etv1 が発現誘導することがわかった。さらに、転写因子 Etv1 のノックダウン実験では成熟遺伝子の発現誘導が阻害されたことから、転写因子 Etv1 が成熟遺伝子の発現誘導に必須であることが明らかになった。

#### 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. Abe H, Okazawa M, Nakanishi S (2011) The Etv1/Er81 transcription factor orchestrates activity-dependent gene regulation in the terminal maturation program of cerebellar granule cells. Proc Natl Acad Sci U S A 108:12497-12502.(査読有)
2. Toyoda H, Saito M, Okazawa M, Hirao K, Sato H, Abe H, Takada K, Funabiki K, Takada M, Kaneko T, Kang Y (2010) Protein kinase G dynamically modulates TASK1-mediated leak K<sup>+</sup> currents in cholinergic neurons of the basal forebrain. J Neurosci 30:5677-5689. (査読有)
3. Nakatani J, Tamada K, Hatanaka F, Ise S, Ohta H, Inoue K, Tomonaga S, Watanabe Y, Chung YJ, Banerjee R, Iwamoto K, Kato T, Okazawa M, Yamauchi K, Tanda K, Takao K, Miyakawa T, Bradley A, Takumi T

(2009) Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. Cell 137:1235-1246. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. Abe H, Okazawa M, Nakanishi S, The Etv1/Er81 transcription factor regulates activity-dependent gene expression in the terminal maturation program of cerebellar granule cells. 第 34 回日本分子生物学会年回 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2011 年 12 月 13 日.
2. 豊田博紀, 齋藤充, 岡澤慎, 平尾圭子, 佐藤元, 阿部遙, 高田健治, 船曳和雄, 高田昌彦, 金子武嗣, 姜英男, Bidirectional regulation of TASK1 channels expressed in HEK cells by modulation of PKG. 第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 28 日、横浜 (誌上開催) .
3. Toyoda H., Saito M., Okazawa M., Hirao K., Sato H., Abe H., Takada K., Funabiki K., Takada M., Kaneko T., Y. K Protein kinase G (PKG) bidirectionally modulates TASK1 currents in PKG-loaded HEK 293 cells. Neuroscience the Society for Neuroscience's 40th Annual Meeting Nov 15th, 2010 San Diego, USA.
4. Okazawa M, Abe H, Kiwada T, Katsukawa M, Nakanishi S, A pivotal role of calcineurin signaling in membrane potential-regulated terminal maturation of cerebellar granule cells. 第 32 回日本分子生物学会年回 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2009 年 12 月 10 日.
5. Iijima K, Abe H, Okazawa M, Moriyoshi K, Nakanishi S, Mechanism of subunit switching from NR2B to NR2C in mouse

- cerebellar granule cell cultures. 第39回北米神経科学学会年会 (Neuroscience 2009, SfN's 39th annual meeting) McCormick Place (Chicago, Illinois, USA) Oct 20th 2009.
6. Okazawa M, Abe H, Kiwada T, Katsukawa M, Nakanishi S, Membrane potential-regulated calcineurin signaling in maturation of cerebellar granule cells. 第39回北米神経科学学会年会 (Neuroscience 2009, SfN's 39th annual meeting) McCormick Place (Chicago, Illinois, USA) Oct 19th 2009.
7. Iijima K, Abe H, Okazawa M, Moriyoshi K, Nakanishi S, Mechanism of subunit switching from NR2B to NR2C in mouse cerebellar granule cell cultures. 第32回日本神経科学会 名古屋国際会議場 (愛知県) 2009年9月17日.
8. Okazawa M, Abe H, Kiwada T, Katsukawa M, Nakanishi S, Membrane potential-regulated maturation of cerebellar granule cells. 第32回日本神経科学会 名古屋国際会議場 (愛知県) 2009年9月16日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡澤 慎 (Makoto Okazawa)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所

・システムズ生物学部門・研究員

研究者番号：40414130