

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650191

研究課題名（和文）

長期間の運動による神経系の賦活・保護メカニズムの探索

研究課題名（英文）

Exploration for the mechanism of exercise-induced neural activation and protection

研究代表者

木下 専 (KINOSHITA MAKOTO)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：30273460

研究成果の概要（和文）：

神経活動依存的な転写亢進が GFP で可視化できるトランスジェニックマウスを用いて運動によって転写活性化する脳領域をマッピングした。GFP 陽性神経細胞のクラスターが対照群よりも顕著に多く観察されたのは海馬領域（CA1 内側錐体細胞層、歯状回内側）、内嗅皮質、体性感覚野（S1）であった。このうち海馬歯状回の一部のニューロンにおいて BDNF の主要な受容体 TrkB のリン酸化が亢進していたため、海馬歯状回を摘出し、質量分析（LC-MS/MS）によってプロテオーム解析を施行した。本研究では発現レベルの群間差が見られた細胞骨格蛋白質、アダプター蛋白質、代謝系酵素など（具体的分子名は論文発表時に開示する）に着目し、イムノブロット、免疫組織学的解析、生化学的解析などを行った。運動ないし神経活動依存性が組織染色レベルで確認できた遺伝子の1つは、遺伝子欠損マウスが公的レポジトリに寄託されていたため、これを入手して数世代の戻し交配をかけて遺伝学的背景の均一化を図った後に SPF レベルにてコロニーを形成し、必要な遺伝子型の実験群・対照群マウスを必要数確保した。以上、24年5月までに系統的行動解析（空間記憶・運動学習などを含む）を行う準備が完了した（24年7月より実験予定）。さらに次のステップとして、神経変性疾患モデルマウスを用いて当該遺伝子の欠損による影響を評価するため、交配用に神経変性マウス系統を入手した（25年度に実験予定）。

研究成果の概要（英文）：

By using a line of transgenic mouse line in which GFP expression is driven by a neural activity-dependent promoter, we mapped brain areas where neural activity is upregulated after exercise. In mice underwent voluntary exercise on running wheels, GFP fluorescence became significantly more intense than the control mice in the following areas: hippocampus (medial CA1 area, pyramidal layer, medial dentate gyrus), entorhinal cortex, somatosensory area (S1). Since a subset of the dentate gyrus neurons were positive in GFP and phosphorylated TrkB (indicating activation of the major BDNF receptor) we conducted proteomic analysis of this area using comparative shotgun LC-MS/MS method. The data indicated that a few cytoskeletal proteins, adaptor proteins, metabolic enzymes (whose identities will be disclosed upon publication of the study) were significantly upregulated in activity-dependent manner. After validation with immunoblot and immunohistochemistry, we focused on one candidate protein whose cognate gene knockout mouse line had been deposited in a public repository. We have already completed backcrossing of the line to the C57BL/6N background. Using mice with or without the candidate gene, we are preparing for comparative analysis on exercise-mediated biochemical, metabolic, behavioral changes and susceptibility against oxidative and/or proteotoxic stresses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：分子・細胞・神経生物学

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化時代を迎え、加齢に伴う認知機能の低下を遅延させる手段が求められている。有望なアプローチの1つは栄養や運動などの環境因子による神経系の賦活・保護メカニズムの強化である。運動による健康増進メカニズムの応用研究では米国が先導しており、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) や AMPK (AMP-activated protein kinase) など分子標的とした「運動模倣薬」が抗肥満・抗糖尿病薬候補として開発されている。神経系では、いわゆる豊かな環境が脳発達を促進するというRosenzweigらの報告が多数のグループにより追試された結果、回し車などによる運動が決定的な要素であることが確立した。運動による神経系の賦活効果に必要な現象として確立しているメカニズムは代表的な神経栄養因子の1つであるBDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) の増加とBDNFに依存した海馬歯状回の神経新生促進である。複数の神経変性疾患モデルマウスの症状と病態に対して長期間の運動が一定の神経保護効果を与えることも示されている。しかし、神経伝達物質、ホルモン、サイトカイン等を含む他の因子の関与や、神経新生に依存しない神経賦活・保護メカニズムに関しては研究が進んでいない。

### 2. 研究の目的

運動が一定の神経保護効果を与えることはこれまでの複数の研究から一貫して示されているが、神経新生に依存しない神経賦活・保護メカニズムに関しては不明な点が多いため、神経系の活動レベルを可視化できるトランスジェニックマウスを活用して運動に関連した遺伝子発現変化を解析し、上記課題を解決する糸口を得る。

### 3. 研究の方法

immediate early genes の1つである *Arc* 遺伝子のプロモーター下流に連結した dVenus (蛍光輝度を高めた改変型 GFP に分解シグナルを付加してクリアランスを高め、背景ノイ

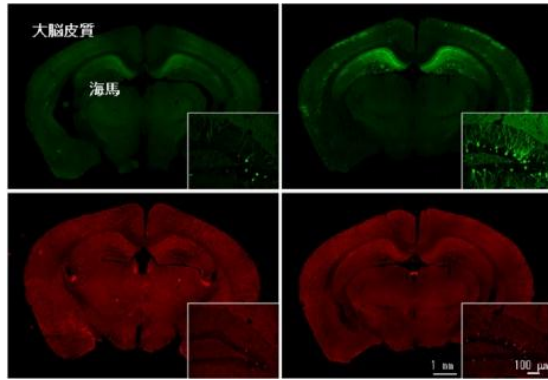
ズとなる蛍光を低減した蛍光蛋白質) で神経系の活動レベルが可視化できるトランスジェニックマウス Arc-GFP マウス (Yamaguchiら NeuroImage 2009; C57BL6J、成熟オス) を2群に分け、運動群には回し車を、対照群には回らないようにロックした回し車をケージ内に設置する。それ以外は同一条件として長期間 (運動開始から神経賦活・保護作用の発現まで通常2週間程度要するという複数の報告に基づき、安全のため1か月間程度) 自走運動が可能な環境で飼育する。回し車の回転計で計測した運動量、摂食量、体重、体温等に関する記録を残す。

1) 両群のマウス脳の連続冠状切片を作製し、BDNF-TrkB系の活性化部位と神経新生 (BrdU 陽性細胞) を免疫組織化学で解析し、GFP 陽性ニューロンの分布や微細形態と併せて3次元マッピングし、基礎データとする。

2) 両群のマウス脳の連続切片を作製し、GFP 陽性ニューロンの多い領域に局限して脳組織を実体顕微鏡下に、あるいは laser microdissection 法にて採取する。両群の同一部位由来の蛋白質を抽出して網羅的に比較解析するためにショットガン質量分析を行い、プロテオームの相違を群間比較する。プロテオーム解析は量的変化だけでなく、リン酸化、ユビキチン化など翻訳後修飾に関しても行う。長期間の運動による明白な量的・質的変動を示す蛋白質を網羅的に同定し、長期間の運動による *Arc* 遺伝子発現と発現量が強く相関 (逆相関) する分子群を同定する。神経機能賦活や神経保護のバイオマーカーとなり得る遺伝子ないし蛋白質を同定する。マウス個体レベルでの候補分子の遺伝子抑制や破壊による神経賦活・保護効果の検証は次年度以降に行う。

### 4. 研究成果

神経活動依存的な転写亢進が GFP で可視化できるトランスジェニックマウスを運動群 (running wheel) と対照群 (ロックした running wheel) に分けて解析を行った。体重・脳重量に群間有意差は認めなかった。運動群のみで転写活性化する脳領域をマッピングしたところ (50  $\mu$ m 毎の連続冠状切片を 500  $\mu$ m 毎に観察)、GFP 陽性ニューロンが観



察される脳領域とパターンは個体差を超えて一貫していた。

図1：対照群（左）と運動群（右）の脳冠状断におけるGFPシグナル(上段)リン酸化TrkB(下段)の比較。このレベルでは海馬と大脳皮質（体性感覚野と外嗅皮質）にGFP発現細胞が多く、海馬歯状回にリン酸化TrkB陽性細胞が散在していた。

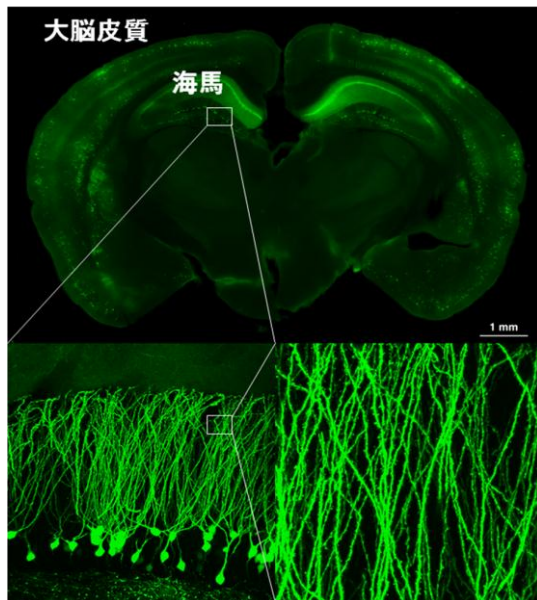


図2：運動群の脳冠状断の拡大図（レーザー共焦点顕微鏡像）  
海馬歯状回ニューロンの細胞体と樹状突起だけでなく、樹状突起棘まで可視化できており、使用したトランスジェニックマウス系統の有用性を示している。

対照群と比較して、運動群では予想された海馬領域（CA1内側錐体細胞層、歯状回内側）に加えて、内嗅皮質、体性感覚野（S1）にもGFP陽性神経細胞のクラスターが観察された。このうち海馬歯状回の一部のニューロンにおいてBDNFの主要な受容体TrkBのリン酸化が亢進（活性化状態を反映）していたため、海馬歯状回に着目してその全体を摘出し、質

量分析（LC-MS/MS）によってプロテオームを解析した。詳細なデータは論文発表まで非開示とするが、本研究では発現レベルの群間差が見られた細胞骨格蛋白質、アダプター蛋白質、代謝系酵素に着目し、免疫ブロットと免疫組織染色を行った。運動ないし神経活動依存性が組織染色レベルで確認できた遺伝子の1つは、遺伝子欠損マウスが公的レポジトリに寄託されていたため、これを入手し、空間記憶・学習を含む行動解析を行う準備を進めた（24年度上半期に実験予定）。次のステップとして、神経変性モデルおよび脳虚血モデルなどによる神経細胞死および作業記憶学習障害のパラダイムを用いて当該遺伝子の欠損による影響を評価する予定である。

## 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1件）

木下 専「ドーパミン神経伝達と変性におけるセプチン細胞骨格系の役割」日本神経精神薬理学会誌、査読無、32、25-29、2012.

〔学会発表〕（計3件）

June 27-29, 2011, Makoto Kinoshita. Probing physiological roles of septins in neurons and glia. Symposium 5 "Cytoskeleton" The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology (Sapporo, Japan)

平成23年9月21日 木下 専「細胞突起の機能的組織化・区画化を支えるスカフォールド系の生理的意義の解析」第84回日本生化学会大会 シンポジウム「突起生物学：細胞突起の共通基本原理と多彩な生理機能の解明」（京都）

平成24年1月8日 真野 善有、栗田浩之、深澤有吾、上田（石原）奈津実、重本隆一、木下 専、「電子顕微鏡連続切片像から3次元再構築した樹状突起棘の定量解析」定量生物学の会 第4回年会（名古屋）

〔図書〕（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/kinoshitalabnagoya/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 専 (KINOSHITA MAKOTO)

研究者番号 : 32373460

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし