

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657058

研究課題名（和文） 哺乳類海馬における新生顆粒細胞の選択的刺激方法の開発

研究課題名（英文） Development of a methodology for the selective stimulation of new born granule cells in mammalian hippocampus

研究代表者

古川 康雄 (FURUKAWA YASUO)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号：40209169

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ラット海馬歯状回における新生顆粒細胞を特異的に刺激するための手法として、哺乳類脳に存在しないペプチド作動性イオンチャネル（FaNaC）に着目し、これを分子ツールとする海馬ニューロンの選択的刺激方法の開発を目的とした。その結果、野生型 FaNaC よりも 10 倍以上ペプチド感受性の高い変異体チャネルの作製に成功した。現在、この分子ツールを海馬ニューロンに発現させる手技の確立を試みている。

研究成果の概要（英文）：By using an invertebrate peptide-gated Na⁺ channel (FaNaC), we tried to establish a methodology to stimulate new neurons in the dentate gyrus of hippocampus. Several mutant channels of FaNaC were made, and two of them were found to be more sensitive to FMRFamide and show less desensitization compared to the wild-type channel. We are now trying to express these mutant channels in the dentate granule neurons.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経生物

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：ペプチド作動性イオンチャネル、FMRFamide、海馬

1. 研究開始当初の背景

海馬は、哺乳類の学習記憶にとって重要な脳部位であることは良く知られており、げっ歯類においては、空間学習との関連で多くの研究がなされている。海馬歯状回は、嗅内野から海馬に情報が入る初段にあたり、海馬内での情報処理の起点となる重要な脳部位である。一般に、成熟脳においては、ほとんどの脳領域で細胞増殖により新たなニューロンが生まれることはないが、海馬歯状回と脳室下帯では、生涯を通して幹細胞から新たな神経細胞が作られ続ける。歯状回での神経新

生は、この部位が学習記憶に関わる部位であることから注目されており、多くの研究がなされているが、新生ニューロンの機能に関しては未だ不明な点が多い。海馬歯状回での神経新生が脳機能、特に学習や記憶に関してどのような機能的意味合いを持つのかを明らかにするためには、神経ネットワークに組み込まれた新生ニューロンの機能を調べることが必要である。このためには、脳スライス標本などを用いた細胞生理学的な研究だけでなく、個体行動レベルでの解析を視野に入れた研究が必要であり、自由行動中の動物

において、新生ニューロンを特異的に刺激する手法が望まれる。

2. 研究の目的

本研究課題では、げっ歯類において学習記憶を研究する場合によく行われる水迷路学習課題などの行動実験において、自由行動中のラットの海馬歯状回の新生顆粒細胞を特異的に刺激するための手法の開発を目的としている。現在、脳内の特定のニューロンを刺激するためのすぐれた手法の一つとしてオプトジェネティクスが開発されている。この方法は、光感受性イオンチャンネルを使うことで、このチャンネルを発現させたニューロンを光刺激により興奮させることができるすぐれた手法であり、最近よく使われるようになってきた。しかしながら、オプトジェネティクスを行うためには、光刺激装置を含めやや特殊な実験設備が必要となる。また、通常、光ケーブルを動物に装着した状態で実験をすることが必要となる。そこで、動物を拘束せずに特定のニューロンを刺激することを可能にするより簡便な手法として、本研究課題では、哺乳類脳に内因性リガンドが存在しない無脊椎動物のリガンド作動性イオンチャンネルを利用する手法の開発を企画した。この目的に合うイオンチャンネルとして、現在のところ、軟体動物のみでその存在が知られている **FMRFamide** 作動性 Na^+ チャンネル (**FaNaC**) に着目し、この無脊椎動物のペプチド作動性イオンチャンネルを哺乳類のニューロンに発現させることにより、例えば浸透圧ポンプによってリガンドとなる **FMRFamide** を慢性的に投与することで特定のニューロンを刺激することが可能になるはずである。

3. 研究の方法

FMRFamide は哺乳類脳には存在しないので、内因性ペプチドが **FaNaC** を活性化する可能性はほぼないと考えられるが、刺激の特異性をあげるためには、**FaNaC** の **FMRFamide** 感受性ができるだけ高い方が望ましい。そこで、当研究室で行っている **FaNaC** の構造機能相関に関する研究とリンクさせながら変異体チャンネル作成を進め、より低濃度の **FMRFamide** で活性化される変異体チャンネルの開発を試みた。

変異体チャンネルの作製は、変異導入用のオリゴヌクレオチドを設計し、PCR法により変異を導入した cDNA 断片を作製し、野生型チャンネルの該当部位と交換する古典的な方法と、市販の変異導入用キットである **Quick Change** を使用する方法で行った。

チャンネルの機能発現実験はアフリカツメガエル卵を用いて行った。作製した変異体チ

ャネルの cRNA を合成キットを使用して作製し、cRNA を注入した卵を培養後、膜電位固定法によりチャンネル電流を計測した。また、**FaNaC** の発現部位を組織化学的に検出するために、チャンネル遺伝子末端にタグ (**FLAG**) をつけた改変チャンネルを作製した。**FLAG** 付加チャンネルの機能も膜電位固定法により確認した。

完成した変異体チャンネルを海馬ニューロンに発現させるための方法としては、次の二つの方法を検討した。一つは、分裂期の細胞が特異的に取り込むことが知られているレトロウィルスベクターを使う方法である。このベクターに変異体チャンネルを組み込んで海馬歯状回領域に注入することにより、**FaNaC** を新生ニューロンに特異的に発現させることが可能である。もう一つの方法は、最近よく使用されるエレクトロポレーションによる遺伝子導入である。この場合は、一般的な哺乳類発現用ベクターに変異体チャンネルを組み込み、脳室内、あるいは脳実質内に注入後に、頭蓋をピンセット電極ではさみ、パルス状の電圧をかけることでエレクトロポレーションを行う。本法は遺伝子導入効率が良いとされているが、新生細胞に特異的に発現させることは出来ない。

4. 研究成果

この研究課題で中核となるのは、哺乳類脳内に存在する内因性物質により活性化されないリガンド作動性イオンチャンネルを用いることである。**FaNaC** の構造上の特徴から得られた知見を元に作製した変異体チャンネルである D552K および D552ND556N は、野生型 **FaNaC** よりも 10 倍程度感受性が高いことが明らかになった。**FaNaC** のリガンドとなる内因性物質は哺乳類の脳神経系には存在しないが、高濃度の **FMRFamide** がリガンドとして作用する受容体は存在する。野生型 **FaNaC** を活性化する程度の **FMRFamide** 濃度ではほぼそれらの受容体の関与は考えなくてもよいはずであるが、今回、より高感度の変異体チャンネルが作製できたので、**FaNaC** の分子ツールとしての有用性は一段と高まったといえる。また **FaNaC** は、他のリガンド作動性イオンチャンネルと比べて脱感作が顕著でなく、この性質もこのチャンネルを利用する上での利点の一つであるが、上記の変異体チャンネルは野生型 **FaNaC** に比べ、さらに脱感差が著しく減弱していたので、慢性的な **FMRFamide** 投与によるニューロン刺激実験により向いているものと思われる。これらの **FaNaC** を組み込んだ哺乳類細胞発現用ベクターを作製し、チャンネル発現ベクターを導入した細胞が **FaNaC** を発現することをアフリカツメガエル卵に直接発現ベクターを注入

することで確認した。

哺乳類脳に FaNaC を発現させて行動実験によりその影響を評価する場合、特に結果がネガティブであった場合には、チャンネルタンパクが発現していることを別途確認する必要がある。これを可能にするために、チャンネル遺伝子末端に FLAG をつけることで組織化学的検出を可能にした。FLAG 付きチャンネルのチャンネル機能が損なわれていないことを確認する必要があるため、やはりアフリカツメガエル卵を発現系としてチャンネル機能を解析した。その結果、FLAG を付加しても特にチャンネル機能に異常が認められなかったのでタグ付きの FaNaC をニューロン刺激用の分子ツールとして使用することが出来るようになった。

本研究課題では、新生ニューロンに特異的に FaNaC を発現させる手法としてレトロウイルスを使う方法を計画した。しかしながら、レトロウイルスを扱う実験に必要な P2 レベルの遺伝子組換え実験施設を研究期間内に整備できなかったため、この方法は一時棚上げせざるを得なくなった。上述のように FaNaC を基にした分子ツールは完成しているので、施設が整備され次第、レトロウイルスを用いた実験計画を実施する予定である。現在は、遺伝子導入の別法として採用したエレクトロポレーション法により、ラット胎児および新生ラットの脳に FaNaC を発現させる実験を行っている。現在のところ、試行段階の域を出ていないが、本法は、より安全に外来遺伝子を個体に導入出来る良い手法であるので、この手技の確立を目指しているところである。

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)

1. F. Morishita, Y. Furukawa, O. Matsushima, Molecular cloning of two distinct precursor genes of NdWFamide, a d-tryptophan-containing neuropeptide of the sea hare, *Aplysia kurodai*, *Peptides*, 38, 290-301, 2012, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 小谷 侑, 藤本秋彦, 古川康雄, FMRFamide 作動性 Na⁺チャンネルのポア外縁部に存在する陰性リングの機能, 第 83 回日本動物学会大会, 2012 年 9 月 13 日, 大阪

2. 小山友香, 濱崎佐和子, 椋田崇生, 古川康雄, レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系による成熟海馬神経新生の調節, 第 83 回日本動物学会大会, 2012 年 9 月 13 日, 大阪

3. Y. KODANI, Y. FURUKAWA, Effects of methanethiosulfonate reagents on D552C mutant of the FMRFamide-gated Na⁺ channel, 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2011 年 11 月 16 日, Washington DC, USA

4. T. Mukuda, Y. Koyama, S. Hamasaki, Y. Furukawa, Systemic angiotensin II and its type I receptor are essential for running-enhanced neurogenesis in adult rat hippocampus, 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2011 年 11 月 14 日, Washington DC.

5. 椋田崇生, 小山友香, 濱崎佐和子, 古川康雄, 血中アンギテンシン II の上昇は成熟海馬神経新生を促進する, 第 63 回日本生理学会中四国地方会, 2011 年 10 月 22 日, 広島

6. 小谷 侑, 古川康雄, FMRFamide 作動性 Na⁺チャンネルの脱感作を制御するアミノ酸残基の同定, 第 82 回日本動物学会大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川

7. 小山友香, 濱崎佐和子, 椋田崇生, 古川康雄, 運動による海馬神経新生の促進作用に対する血中アンギテンシン II の関与, 第 82 回日本動物学会大会, 2011 年 9 月 22 日, 旭川

8. Y. Kodani, Y. Furukawa, Electrostatic charge at position 552 of FMRFamide-gated Na⁺ channel affects channel activation and rectification, 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011 年 6 月 3 日, Nagoya, Japana

9. Y. Koyama, S. Hamasaki, T. Mukuda, Y. Furukawa, Increased systemic level of angiotensin II promotes adult hippocampal neurogenesis, 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011 年 6 月 3 日, Nagoya, Japana

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 康雄 (FURUKAWA YASUO)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号：40209169

(2) 研究分担者

椋田 崇生 (MUKUDA TAKAO)

広島大学・大学院総合科学研究科・助教

研究者番号：60346335

(3) 連携研究者

()

研究者番号：