

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590128

研究課題名(和文) P2X7受容体のスプライスバリエントによる活性制御の変動と精神神経疾患との関連

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of P2X7 receptor by its splice variants, and relationship of its altered functional expression to psychiatric diseases

研究代表者

長澤 一樹 (Nagasawa, Kazuki)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30228001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスアストロサイトにおけるP2X7受容体の活性は、そのスプライスバリエント3及び4の発現により変動し、それはアストロサイトの食作用活性を制御することが示された。さらに、アストロサイトに対してストレス負荷することで細胞が活性化状態となったとき、P2X7受容体の細胞膜での発現量はそのスプライスバリエント2及び3発現量が増加することにより低下し、それは食作用活性の低下に繋がることが分かった。以上の成績は、アストロサイトの機能制御にP2X7受容体が重要な役割を担い、それはスプライスバリエントの発現変動によって変動することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The activity of P2X7 receptors expressed in cultured astrocytes of SJL-strain mice, which exhibit extremely aggression characteristics, was greater than the case of ddY-strain mice, and this was due to the less expression levels of P2X7 receptor splice variant 2 and 3 in the formers. In addition, we demonstrated that spontaneous activation of P2X7Rs expressed by astrocytes plays a role in regulation of engulfing activity of astrocytes. Finally, we found that in activated astrocytes, which was induced by stress-load such as oxidative stress, expression of P2X7 receptors at the plasma membrane was decreased by increased expression of its splice variant 2 and 3, resulting in decreased engulfing activity. These findings indicated that P2X7 receptor is regulated by expression levels of its splice variants, and its activity plays a role in regulation of astrocytic functionality.

研究分野：神経科学

キーワード：ATP 脳・神経 受容体

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、death receptor として認識されてきた P2X7 受容体の細胞恒常性維持における役割について新たな概念を示してきた。

2. 研究の目的

当該研究課題は、P2X7 受容体活性制御におけるスプライスバリエーションの役割を解明し、表現型の異なるマウスにおけるそれらの機能的発現変動並びにストレス負荷の影響について明らかにすることである。

3. 研究の方法

培養アストロサイトをを用い、その P2X7 受容体活性を YO-PRO-1 取り込み実験により評価した。P2X7 受容体及びそのスプライスバリエーションの発現は western blot、免疫細胞染色、real-time PCR により評価し、それらの cDNA はミクログリアから単離・精製し、HEK293T 細胞に導入することで、それらの相互作用を検討した。

4. 研究成果

気性の荒い SJL 系マウス由来アストロサイトにおける P2X7 受容体の活性は、対象としての ddY 系マウスのそれと比較して高く、それは P2X7 受容体のスプライスバリエーション 3 及び 4 の発現量が低いことに起因することを明らかにした。また、恒常的活性化状態にある P2X7 受容体のアストロサイトの機能制御における役割について検討したところ、それはアストロサイトの食作用活性を制御することが示された。さらに、アストロサイトに対してストレス負荷することで細胞が活性化状態となったとき、P2X7 受容体の細胞膜での発現量はそのスプライスバリエーション 2 及び 3 発現量が増加することにより低下し、それは食作用活性の低下に繋がることが分かった。以上の成績は、アストロサイトの機能制御に P2X7 受容体が重要な役割を担い、それはスプライスバリエーションの発現変動によって変動することを示唆しており、精神神経疾患の予防・治療法を考案する上で新たな標的を提唱する重要なものである。

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 11 件)

1. Shohei Segawa, Nao Tatsumi, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, Characterization of zinc uptake by mouse primary cultured astrocytes and microglia, *Metallomics*, in press.
2. Yosuke Kamatsuka, Manami Fukagawa, Takahiro Furuta, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, Astrocytes, but not neurons, exhibit constitutive activation of P2X7 receptors in mouse acute slices under

non-stimulated resting conditions. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **37**, 1958-1962, 2014.

3. Shohei Segawa, Makiko Shibamoto, Mikayo Ogawa, Saori Miyake, Kaho Mizumoto, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, The effect of divalent metal cations on zinc uptake by mouse Zrt/Irt-like protein 1 (ZIP1). *Life Sciences*, **113**, 40-44, 2014.
4. Kentaro Nishida, Yuka Nomura, Kanako Kawamori, Yoshinori Moriyama, Kazuki Nagasawa, Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulation of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters*, **579**, 75-79, 2014.
5. Yuuka Kido, Chiyo Kawahara, Yasuko Terai, Akihiro Ohishi, Satoshi Kobayashi, Miki Hayakawa, Yosuke Kamatsuka, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, Regulation of activity of P2X7 receptor by its splice variants in cultured mouse astrocytes. *Glia*, **62**, 440-451, 2014.
6. Shohei Segawa, Takeshi Nishiura, Takahiro Furuta, Yuki Ohsato, Misaki Tani, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, Zinc is released by cultured astrocytes as a gliotransmitter under hypoosmotic stress-loaded conditions and regulates microglial activity. *Life Sciences*, **94**, 137-144, 2014.
7. Kentaro Nishida, Yukari Dohi, Yuri Yamanaka, Ai Miyata, Katsunobu Tsukamoto, Miharuru Yabu, Akihiro Ohishi, Kazuki Nagasawa, Expression of adenosine A2b receptor in rat type II and III taste cells. *Histochemistry and Cell Biology*, **141**, 499-506, 2014.
8. Mina Yamamoto, Yosuke Kamatsuka, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, P2X7 receptors regulate engulfing activity of non-stimulated resting astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **439**, 90-95, 2013.

9. Hiroto Okuda, Kentaro Nishida, Youichirou Higashi, Kazuki Nagasawa, NAD<sup>+</sup> influx through connexin hemichannels prevents poly(ADP-ribose) polymerase-mediated astrocyte death. *Life Sciences*, **92**, 808-814, 2013.
10. Kentaro Nishida, Tsuyoshi Kitada, Junki Kato, Yukari Dohi, Kazuki Nagasawa, Expression of equilibrative nucleoside transporter 1 in rat circumvallate papillae. *Neuroscience Letters*, **533**, 104-108, 2013.
11. Kentaro Nishida, Tsunetoshi Nakatani, Akihiro Ohishi, Hiroto Okuda, Youichirou Higashi, Takaaki Matsuo, Sadaki Fujimoto, Kazuki Nagasawa, Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal death. *Journal of Neurochemistry*, **122**, 1118-1128, 2012.

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 鎌塚洋祐、小林 哲、大堀健史、藤原麻紀子、西田健太郎、長澤一樹：マウス及びヒト P2X7 受容体活性に対する二価金属カオチンの影響の比較検討．日本薬学会第 134 年会（熊本），2014.3.28.
2. Kazuki Nagasawa, Mina Yamamoto, Yosuke Kamatsuka, Takahiro Furuta, Akihiro Ohishi, Kentaro Nishida: P2X7 receptors regulate engulfing activity of non-stimulated resting astrocytes. Purines2014 (Bonn), 2014. 7.24.
3. 古田能裕、須藤崇史、向井あゆみ、山本美菜、西田健太郎、長澤一樹：活性化アストロサイトにおける P2X7 受容体の機能的発現変動について．第 57 回日本神経化学会(奈良)大会・第 36 回日本生物学的精神医学会 合同年会 (奈良), 2014. 9.29.
4. 丸宮彩香、毛野祐花、須藤悠悟、宇田裕香子、松田衣代、森田由樹、古田能裕、西田健太郎、長澤一樹：SJL 系及び ddY 系マウス大脳皮質神経細胞における P2X7 受容体の機能的発現の比較．第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2014. 10.11.
5. 山本美菜、古田能裕、向井あゆみ、西田健太郎、長澤一樹：酸化ストレス負荷されたアストロサイトにおける engulfment 活性の低下は P2X7 受容体の局在変化に起因する．第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2014. 10.11.
6. 瀬川将平、辰巳菜穂、西田健太郎、長澤一樹：マウス初代培養大脳皮質アストロサイト及びミクログリにおける亜鉛輸送特性の比較．日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013. 3.30.
7. 鎌塚洋祐、藤本真知子、毛野祐花、須藤悠悟、丸宮彩香、西田健太郎、長澤一樹：マウス大脳皮質神経細胞における P2X7 受容体の機能的発現について．日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013. 3.28.
8. 山本美奈、鎌塚洋祐、西田健太郎、長澤一樹：初代培養マウスアストロサイトの engulfment 活性制御への P2X7 受容体の関与について．日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013. 3.28.
9. 小林 哲、早川美紀、寺井易子、松浦未工、宮本優里、向井あゆみ、森山洋子、西田健太郎、長澤一樹：マウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体 splice variant 3 及び 4 はその活性制御因子である．日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013. 3.28.
10. 芝本真紀子、水本果歩、小川未佳代、三宅沙央莉、西田健太郎、長澤一樹：亜鉛トランスポータ Zrt-and Irt-like protein 1 (ZIP1) 過剰発現系の構築とその機能評価．日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013. 3.28.

11. 山本美奈、鎌塚洋祐、西田健太郎、長澤一樹：アストロサイトに発現する P2X7 受容体による engulfment 活性の制御 . Neuro2013 (京都), 2013. 6.20.
12. 瀬川将平、辰巳奈緒、西田健太郎、長澤一樹：マウス初代培養大脳皮質アストロサイト及びミクログリアにおける亜鉛取り込み特性の比較 . Neuro2013 (京都), 2013. 6.20.
13. 藤本真知子、宇田裕香子、松田衣代、森田由樹、毛野祐花、須藤悠悟、丸宮彩香、西田健太郎、長澤一樹：マウス大脳皮質神経細胞における ATP 誘発性神経細胞死の P2X7 受容体の関与について . Neuro2013 (京都), 2013. 6.20.
14. 須藤嵩史、古田能裕、麻野浩史、弘田恵美、回淵俊生、大嶋千晶、竹林直人、松村真裕、向井あゆみ、西田健太郎、長澤一樹：活性化アストロサイトにおける亜鉛クリアランス機構の機能的発現について . メタルバイオサイエンス研究会 2013 (静岡), 2013. 9.26.
15. 瀬川将平、芝本真紀子、小川未佳代、三宅沙央莉、西田健太郎、長澤一樹：亜鉛トランスポータ Zrt-and Irt-like protein 1 (ZIP1) 過剰発現系の構築とその機能評価 . メタルバイオサイエンス研究会 2013 (静岡), 2013. 9.26.
16. 鎌塚洋祐、深川愛未、西田健太郎、長澤一樹：マウス急性脳切片を用いた大脳皮質アストロサイトに発現する P2X7 受容体の機能的発現について . 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2013. 10.12.
17. 早川美紀、大石晃弘、小林 哲、鎌塚洋祐、寺井易子、西田健太郎、長澤一樹：マウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体はその splice variants 3 及び 4 によって制御される . 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2013. 10.12.
18. 竹林直人、古田能裕、麻野浩史、弘田恵美、回淵俊生、須藤嵩史、大嶋千晶、松村真裕、向井あゆみ、西田健太郎、長澤一樹：活性化アストロサイトにおける亜鉛トランスポータ ZIP アイソフォームの発現並びに機能性について . 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都), 2013. 10.12.
19. Kazuki Nagasawa, Shohei Segawa, Yuki Ohsato, Misaki Tani, Takeshi Nishiura, Kentaro Nishida, Takaaki Matsuo: Zinc released from hypoosmotic stress-loaded astrocytes activates microglia. International Society for Zinc Biology 2012 Conference (Victoria, Australia), 2012. 1.17.
20. 松尾剛明、瀬川将平、西田健太郎、長澤一樹：亜鉛誘発ミクログリアの活性化における亜鉛トランスポータの関与 . 生物分子システムに基づく創薬科学フロンティア研究 成果発表会 (京都), 2012. 2.2.
21. 深川愛未、鎌塚洋祐、寺井易子、松尾剛明、西田健太郎、長澤一樹：マウス大脳皮質切片を用いた P2X7 受容体機能的発現評価系の構築 . 日本薬学会第 132 年会 (札幌), 2012. 3.29.
22. Yasuko Terai, Yuuka Kido, Chiyo Kawahara, Manami Fukagawa, Miku Matsuura, Yuri Miyamoto, Takaaki Matsuo, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa: P2X7 receptor channel opening is regulated by its splice variants in cultured mouse astrocytes. Purine 2012 (Fukuoka,

- Japan), 2012. 5.31.
23. Kazuki Nagasawa, Yasuko Terai, Miku Matsuura, Yuri Miyamoto, Satoshi Kobayashi, Miki Hayakawa, Takaaki Matsuo, Kentaro Nishida: Expression profile of P2X7 receptor splice variants is a determinant for P2X7 receptor functionality in cultured astrocytes. The 11<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, (Kobe, Japan), 2012. 9.30.
24. 松浦未工、宮本優里、寺井易子、深川愛未、松尾剛明、西田健太郎、長澤一樹：アストロサイトに発現する P2X7 受容体の splice variants による活性制御．第 62 回日本薬学会 近畿支部総会・大会 (兵庫), 2012. 10.20.
25. 西田健太郎、中谷庸寿、大石晃弘、松尾剛明、長澤一樹：P2X7 受容体を介した神経細胞死におけるミトコンドリア機能異常の関与．第 62 回日本薬学会 近畿支部総会・大会 (兵庫), 2012. 10.20.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長澤 一樹 (NAGASAWA KAZUKI)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：30228001

### (2) 研究分担者

西田 健太郎 (NISHIDA KENTARO)  
京都薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：20533805