

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：35311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460323

研究課題名(和文) 飼育環境のストレスに反応し、不安様行動に關与するイオンチャネルの同定

研究課題名(英文) Ion channel involved in stress-response and anxiety-like behavior

研究代表者

岡田 誠剛 (Okada, Masayoshi)

倉敷芸術科学大学・生命科学部・教授

研究者番号：40334677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：パッチクランプ法で2ポドメイン型K<sup>+</sup>チャネル(TREK-1)活性化作用を持つ植物由来化合物を見出した。この化合物は、マウスの行動実験で不安様行動並びにうつ様行動の両方を抑制した。抗c-fos抗体免疫染色による検討で、本化合物は基礎的な神経活動には影響を与えず、ストレス反応性の活性化を抑制することが示され、その作用部位も既存の抗不安薬、抗うつ薬の作用部位とは異なり、新しい機序で環境のストレスによる不安様、うつ行動を抑制したことが示唆された。

また、TREK-1チャネル活性が細胞内輸送によって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have screened botanical compounds and found a novel 2-pore-domain type K<sup>+</sup> channel activator with patch-clamp recordings. This compound showed both anxiolytic and antidepressive effects in the mouse behavior tests. The compound had no effect on anti-c-fos immunoreactivity in the brain of nontreated-mouse but suppressed a stress-induced increase in the anti-c-fos immunoreactivity in a nucleus. This site of action was different from those of current anxiolytic or antidepressant, suggesting a novel mechanism this compound.

We also revealed the involvement of intracellular transport in the run-up of TREK-1 channel current.

研究分野：神経科学

キーワード：K<sup>+</sup>チャネル TREK うつ 不安

1. 研究開始当初の背景

不安障害やうつはストレスが発症のきっかけとなる。うつ患者のおよそ3割は既存の抗うつ薬に抵抗性である。また、現在用いられている抗不安薬には依存性の問題があり、新しい機序の薬の開発が望まれている。

K<sup>+</sup>チャンネルは中枢神経系に広く発現し、神経活動の調節に中心的な役割を果たしており、創薬研究の標的になる。しかし、K<sup>+</sup>チャンネルには100近いサブタイプがあり、特異的な遮断、活性化薬が存在するサブタイプはごくわずかである。2ポアドメイン型K<sup>+</sup>チャンネルは中枢神経系に発現しているが、特異的な活性化薬は存在せず、その調節機構も未解明である。

2. 研究の目的

本研究は2ポアドメイン型K<sup>+</sup>チャンネルTREK-1 (TWIK-related K<sup>+</sup> channel)の不安様、うつ様行動への作用を検討し、その作用機序を検討することを目的とする。また、チャンネル活性の調節機序を検討する。

3. 研究の方法

培養細胞にK<sup>+</sup>チャンネルを発現させ、パッチクランプ法で同チャンネル電流を記録し、化合物の作用を検討した。抗不安作用はマウスを用いて、オープンフィールド、高架式十字迷路、明暗箱試験における不安様行動、抗うつ作用は強制水泳、尾懸垂試験における無動時間をうつ様行動の指標として検討した。植物由来化合物はベトナム天然物化学研究所のTran博士らが抽出、精製したものの供与を受けた。

TREK-1チャンネルと赤色蛍光タンパク(mCherry)融合タンパクはPCRによって作成し、レンチウイルスベクターを用いて発現させ、レーザー共焦点顕微鏡によって細胞内分布を検討した。

4. 研究成果

パッチクランプ法により、2ポアドメイン型K<sup>+</sup>チャンネル活性化作用を持つ植物由来化合物をスクリーニングし、TREK-1チャンネルを活性化する化合物を見出した。この化合物を腹腔投与すると、マウスのオープンフィールド、高架式十字迷路、明暗箱試験のいずれにおいても不安様行動を減少させ、抗不安作用があることが示された。次にうつ様行動への作用を検討すると、強制水泳、尾懸垂試験の両方をうつ様行動(無動時間)を減少させ、本化合物が抗うつ作用を持つことが明らかになった。神経活動のマーカーであるc-fosタンパクの免疫染色によって、本化合物の作用部位を検討した。まず、無処置マウスに本化合物を投与しても、マウス脳の抗c-fos抗体免疫反応性に変化は認められず、基礎的な神経活動には影響を与えないことが示唆された。次に、ストレス負荷前に本化合物を投与しマウスに尾懸垂のストレスを負荷した

後に検討すると、対照のPBS投与マウスでは複数のストレスに関連する神経核でc-fos陽性細胞の増加が見られストレスへの反応がみとめられた。本化合物を前投与マウスでは、視床下部室傍核、視床室傍核などでは、PBS投与マウスと同様にc-fos免疫反応性の増加がみとめられた。しかし、外側中隔でのストレス反応性のc-fos陽性細胞の増加は本化合物によって抑制され、同神経核が抗うつ作用に関与することが示唆された。既存の抗不安薬の作用部位である扁桃核、抗うつ薬の作用部位である縫線核、青斑核には化合物投与による差は認められず、本化合物は既存薬とは異なる機序で、飼育環境のストレスによる反応を抑制して、抗不安、うつ作用を発揮したと考えられ、今後の創薬研究の有望なシードになると考えられる。

また、TREK-1チャンネルの活性が、培養細胞への全細胞記録の開始により自発的に増加するrun-upと呼ばれる現象が知られているが、そのメカニズムは未解明であった。我々は、この活性が細胞膜への輸送によって制御されていると考え、パッチクランプ法で同チャンネル電流を記録し、細胞内輸送の阻害剤の影響を検討した。その結果細胞内タンパク輸送の阻害剤であるN-methylmaleimide(NEM)やbrefeldin-Aは、run-upを抑制し(図1)、エンドサイトーシス阻害剤であるpitstop2はrun-upを促進した(図2)。

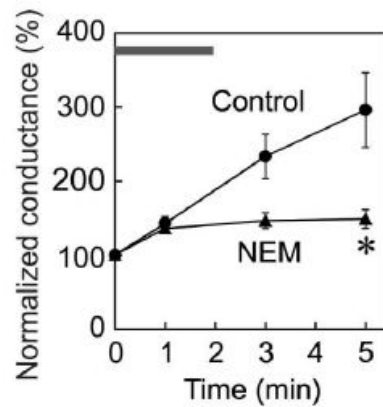


図1 . NEM 処理による run-up の阻害。

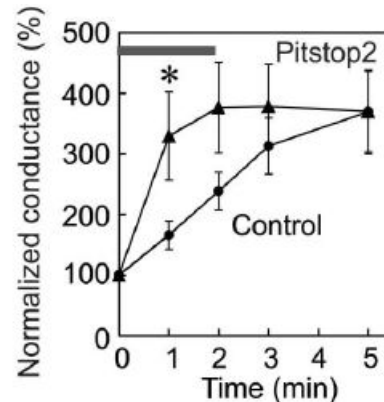


図2 . Pitstop2 による run-up の促進。

次に、赤色蛍光タンパク mCherry と TREK-1 チャンネルの細胞内分布を、赤色蛍光を指標にして検討し、NEM 処理が細胞内分布を増やすこと、pitstop2 が細胞膜での分布を増やすことから、TREK-1 チャンネルの活性が細胞内輸送によって制御されていることを確認した。細胞内 TREK-1 チャンネル輸送に関与するタンパクをあらかじめするため、微小管結合タンパク (Mtap2) の拮抗ペプチドを細胞内投与するとチャンネル電流の増加が抑制された (図 3)。さらに、Ezrin の阻害剤 (NSC668394) 適用も同様に阻害作用を示した (図 4)。これらの阻害剤を同時投与すると、相加的な阻害がみとめられ、両者が相加的な関与がされた。さらに、両タンパクの関与を免疫共沈降によって生化学的に確認した。

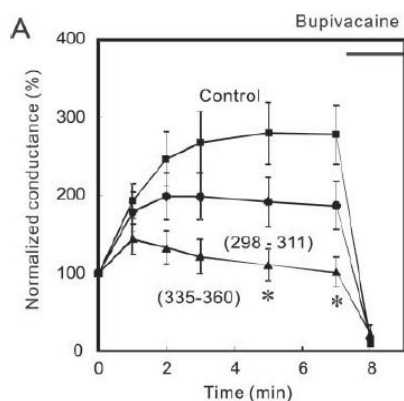


図 3 .Mtap2 拮抗ペプチドによる run-up の阻害。

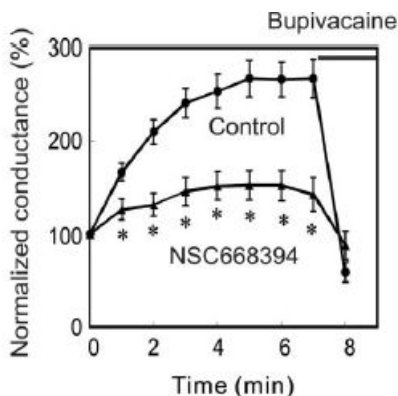


図 4. ezrin 阻害剤による run-up の阻害

##### 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)

Involvement of intracellular transport in TREK-1c current run-up in 293T cells. Naaz Andharia, Ancy Joseph, Mikio Hayashi,

Masayoshi Okada, Hiroko Matsuda. Channels (Austin). 2017, 11, 224-235.

A pore forming peptide from spider *Lachesana sp.* venom induced neuronal depolarization and pain. Masayoshi Okada, Gerardo Corzo, Gustavo A Romero-Perez, Fredy Coronas, Hiroko Matsuda, Louval Possani, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 2015, 1850, 657-666

Increase in the titer of lentiviral vectors expressing potassium channels by current blockade during viral vector production, Msayoshi Okada, Naaz Andharia, Hiroko Matsuda, BMC Neuroscience, 2015, 16, Article number 30.

The degradation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1, depends on the expression level: Examination with fluorescent proteins. Masayoshi Okada, Masataka Kano, Hiroko Matsuda. Brain Research, 2013, 1528, 8-19.

[学会発表](計 3 件)

平成 26 年 7 月  
Gordon Research Conference “Ion channels” 米国、マサチューセッツ州

平成 29 年 3 月  
第 94 回日本生理学会大会、静岡県、浜松市

平成 29 年 4 月  
Experimental Biology、米国、イリノイ州

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡田 誠剛 (OKADA MASAYOSHI)  
倉敷芸術科学大学・生命科学部・教授  
研究者番号：40334677

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )