

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：30121

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640022

研究課題名(和文) 電位依存性カリウムイオンチャネルによる神経活動依存的なシナプス形成機構の解明

研究課題名(英文) Voltage-dependent synapse formation by voltage dependent potassium ion channel, KCNX

研究代表者

木村 一志 (Kimura, Kazushi)

北海道文教大学・人間科学部・教授

研究者番号：20314180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では申請者が新たに細胞接着活性を持つ分子として見出した電位依存性カリウムチャネル、KCNXのシナプス形成における役割を明らかにすることを目的として、GFP-KCNXノックインマウスを作成し、抗GFP抗体による免疫染色を行い、外来性のKCNXの局在を検討したところ、海馬CA3領域透明層に発現することを確認した。また、KCNXの機能を解明するために、KCNX結合蛋白質を探索し、微小管関連タンパク質CLIP115とエンドサイトーシス関連タンパク質Dynaminを同定した。これらのことから、KCNXはイオンチャネルとして機能するのみならず細胞骨格や小胞輸送にも関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have tried to elucidate the role of KCNX, which was identified as a new cell adhesion molecule, in synapse formation. To reveal the localization of KCNX in brain, I prepared GFP-KCNX knock-in mouse and stained the brain sections with anti-GFP antibody. Immunoreactivity for GFP were localized as dots in stratum lucidum of the CA3 area, where mossy fiber terminals form synapses with pyramidal cells. Next, to reveal function of KCNX, I performed immunoprecipitation of anti-KCNX antibody from mouse brain membrane extracts. CLIP115, one of plus-end tracking proteins and Dynamine, a GTPase responsible for endocytosis were co-immunoprecipitated with KCNX. These result suggest that KCNX is involved in regulating microtubules and endocytosis in neuron.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：イオンチャネル シナプス

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞同士のシナプス形成過程において軸索と樹状突起の最初の接触時にどのような細胞間シグナル交信が行われるかは不明である。また、シナプス形成の決定には、神経活動非依存性シグナルと神経活動依存的シグナルが協調的に働くことが予想されているが、その作用点も未同定である。そこで、申請者は、この最初の接触からシナプス形成決定に働く細胞接着分子を、細胞接着活性を指標として、シナプス形成期の海馬で発現している cDNA の発現ライブラリーから探索した。その結果、電位依存性 K<sup>+</sup> チャンネル、KCNX を見出している。KCNX はホモフィリックな細胞間接着活性を示し、しかもこの接着活性は cAMP シグナル依存性の増強を示す。これらの性質から、KCNX は、cAMP などの化学シグナルと細胞膜電位変化という物理シグナルを統合する重要な分子である可能性が高いと考えられる。

### 2. 研究の目的

神経活動に依存したシナプス形成の分子メカニズムを解明することを最終目標として、申請者が新たに細胞接着活性を持つ分子として見出した電位依存性カリウムチャンネル、KCNX のシナプス形成における役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

電位依存性カリウムイオンチャンネル KCNX 遺伝子が、いつ、どこで、どのようにしてチャンネル活性と細胞接着能を活性化させるのか、その結果、どのような生理機能を発揮するのかを神経活動電位とシナプス形成の関係に着目して、明らかにしていく。

KCNX 抗体を作成し、KCNX の局在を培養細胞や神経組織で明らかにしていく。特異的抗体が作成できなかった場合、GFP - KCNX ノックインマウスを作成し、抗 GFP 抗体による免疫染色により明らかにする。

KCNX の細胞接着活性を詳細に検討するため、弱い細胞間相互作用を検出できる新たなアッセイをすでに構築している。この新たな細胞間相互作用アッセイを用いて、KCNX がいつどのように細胞接着活性を発揮するかを検討する。

KCNX のシナプス形成における作用機構を解明するために、KCNX 細胞内領域に結合する蛋白質を、免疫沈降法などを用いてマウス大脳抽出物から探索する。

### 4. 研究成果

#### KCNX の局在解析

まず、KCNX の詳細な発現時期や局在部位を組織や培養神経細胞を用いて、免疫電顕により解析するために、様々な抗体を作成し検討したが、免疫に染色に使用できる特異的な抗体が作成できず、内在性 KCNX の局在を明

らかにすることはできなかった。そのため、GFP-KCNX ノックインマウスを作成し、抗 GFP 抗体による免疫染色を行い、外来性 KCNX の局在を検討したところ、海馬シナプス領域 (CA3 透明層: 歯状回顆粒細胞苔状線維が CA3 錐体細胞にシナプスを形成する領域) に局在することを確認した (図 1)。現在、電顕レベルでの局在や初代培養神経細胞での局在など更なる解析を進めているところである。

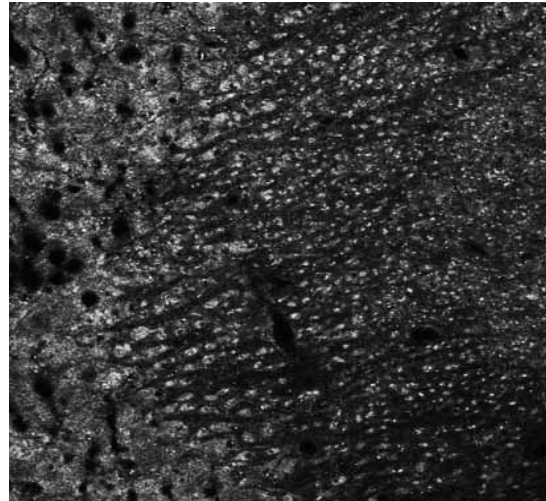


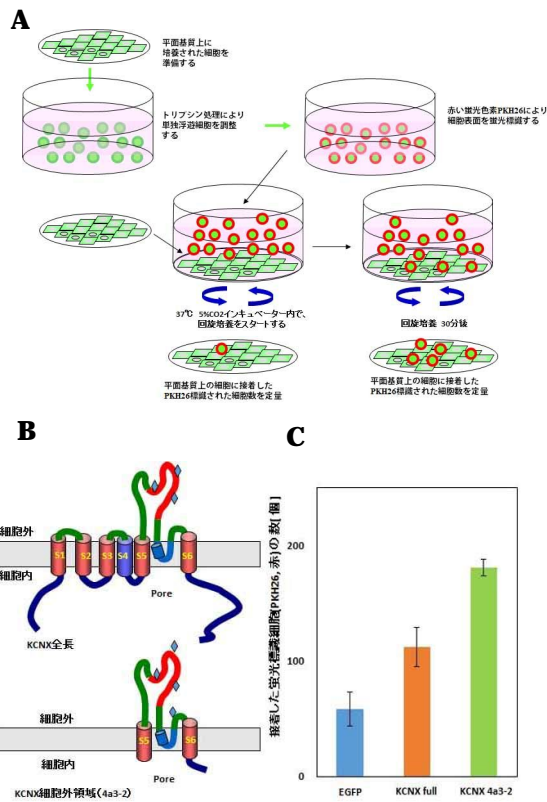
図 1. GFP-KCNX ノックインマウス海馬 CA3 領域における GFP-KCNX の局在

#### KCNX の細胞接着活性

KCNX を恒常的に発現する線維芽細胞を作成し、KCNX に依存した弱い細胞接着活性を検出できるアッセイを構築し、KCNX による細胞接着活性が細胞外領域に依存し、ホモフィリックな活性であることを確認した (図 2)。現在、細胞膜電位や細胞内外シグナルにより細胞接着活性が変化するかどうか、初代培養神経細胞との共培養により artificial シナプスが形成されるのかどうかを検討している。

#### KCNX 結合タンパク質の探索

KCNX のシナプス形成における作用機構を解明するために、内在性 KCNX をイムノプロットで認識できる抗体を作成し、その抗体を用いた免疫沈降法と In-gel digestion 法による質量分析により、マウス大脳抽出液から KCNX と結合するタンパク質を探索した。その結果、微小管関連タンパク質 CLIP115 とエンドサイトーシス関連タンパク質 Dynamin を同定した (図 3)。これらのことから、KCNX はイオンチャンネルとして機能するのみならず細胞骨格や小胞輸送にも関与することが示唆された。現在、詳細な結合領域を同定しているところである。

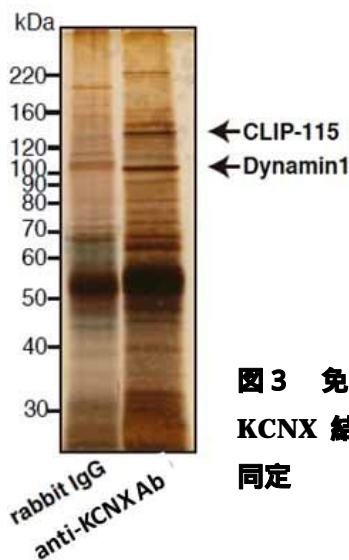


**図2 KCNXの細胞接着活性**

**A.新規細胞接着アッセイの概略**

**B.KCNXの構造**

**C.細胞接着アッセイの結果**



**図3 免疫沈降法による  
KCNX 結合タンパク質の  
同定**

**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)

Tagawa, T., Sakuraba, S., Kimura, K. and Mizoguchi, A. Sevoflurane in combination with propofol, not thiopental, induces a more robust neuroapoptosis than sevoflurane alone in the

neonatal mouse brain. *J. Anesth.*, 28(6):815-820, 2014.

Gheni, G., Ogura, M., Iwasaki, M, Yokoi, N., Minami, K., Nakayama, Y., Harada, K., Hastoy, B., Wu, X., Takahashi, H., Kimura, K., Matsubara, T., Hoshikawa, R., Hatano, N., Sugawara, K., Shibasaki, T., Inagaki, N., Bamba, T., Mizoguchi, A., Fukusaki, E., Rorsman, P. and Seino, S. Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. *Cell Reports* 9(2):661-73, 2014.

Inoue, T., Fujiwara, T., Rikitake, Y., Maruo T., Mandai, K., Kimura, K., Kayahara, T., Wang, S., Itoh, Y., Sai, K., Mori, M., Mori, K., Mizoguchi, A. and Taki, Y. Nectin-1 Spots as a Novel Adhesion Apparatus that Tethers Mitral Cell Lateral Dendrites in a Dendritic Meshwork Structure of the Developing Mouse Olfactory Bulb. *J. Comp. Neurol.*, in press.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 1 件)

名称: 生体染色剤  
発明者: 溝口明、藤原武志、田中光司、王淑杰、崔煌植、木村一志  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2014059351  
出願年月日: 2014年9月9日  
国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
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

木村 一志 (KIMURA, Kazushi)  
北海道文教大学・人間科学部・教授  
研究者番号：20314180

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：