

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500321
 研究課題名（和文）細胞内シグナルにより細胞接着能を変える電位依存性K⁺チャンネルとシナプス形成機構
 研究課題名（英文） K⁺ channel changing cell adhesion-activity by signal transduction and mechanism of synapse formation.
 研究代表者 木村 一志 (Kazushi Kimura)
 三重大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：20314180

研究成果の概要：

複雑かつ正確に秩序だった脳の神経回路の形成において、“シナプス形成”はその基本となる重要なステップである。シナプス形成の最初のステップである標的細胞の認識は重要であると考えられる。申請者は、数年来、細胞間接着活性を指標として、新たなシナプス形成に関わる細胞接着分子の探索を試みてきた。その結果、電位依存性カリウムイオンチャンネルの一種、KCNH3 をその候補として見いだしている。KCNH3 は物理的信号（細胞膜電位変化）と化学的信号（cAMP濃度変化）の両方を感知して、シナプス強度を制御する全く新しい機能分子であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：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、シナプス、チャンネル、細胞接着

1. 研究開始当初の背景

複雑かつ正確に秩序だった脳の神経回路の形成において、“シナプス形成”はその基本となる重要なステップである。この過程において、シナプスは、構造上、一種の細胞間接着装置と見なすことができ、前シナプス膜と後シナプス膜の“特異的接着”は、様々な細胞接着分子によって制御されていると予測されてきた。しかし、シナプス形成の分子メカニズムは既知の接着分子だけでは説明できず、未知のメカニズムが存在すると考えられている。

申請者は、数年来、シナプス形成期のマウス海馬の発現ライブラリーより、細胞間接着活性を指標として遺伝子の同定をおこない、新たなシナプス形成に関わる細胞接着分子の探索を試みてきた。その結果、電位依存性カリウムイオンチャンネルの一種、KCNH3 をその候補として見いだしている。

2. 研究の目的

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、この電位依存性カリ

ウムチャンネル、KCNH3のシナプス形成における役割を明らかにする。具体的には、いつ、どこで、どのようにしてKCNH3のチャンネル活性と細胞接着能が活性化させるのか、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。

3. 研究の方法

1. KCNH3の詳細な発現時期やシナプスのプレ、ポストいずれに局在するかどうかなど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。
2. KCNH3の細胞接着能が細胞内cAMP濃度や細胞膜電位の変化や細胞外領域の限定分解によって影響を受けるのかどうかをアグリゲーションアッセイにより検討する。
3. KCNH3をその抗体、変異体やsiRNAなどで細胞接着能やチャンネル活性などを機能阻害したとき、あるいはKCNH3が限定分解を受けない時に及ぼす影響を、培養神経細胞を用いて検討する。
4. このチャンネル活性が細胞内cAMP濃度や細胞外領域の限定分解の影響を受けるのかどうかをパッチクランプ法などを用いて電気生理学的に解析する。
5. KCNH3は細胞接着能を有すると思われる細胞外領域で限定分解を受けることが明らかになっている。この切断を行うプロテアーゼを細胞外領域を固定したアフィニティーカラム法などにより同定する。
6. KCNH3はそのアミノ酸配列から他のカリウムイオンチャンネルにはない長い細胞内領域を持つと予想されている。このことから、マウス大脳シナプス画分よりKCNH3細胞内領域に結合する蛋白質を探索する。
7. KCNH3の*in vivo*でのシナプス形成における役割を明らかにするために、遺伝子産物の脳内部位特異的過剰発現や機能阻害を行い、神経回路形成への影響を形態学的に明らかにする。また、KCNH3を導入した線維芽細胞と培養神経細胞との共培養によりartificial(擬似)シナプスが形成されるかどうかを検討する。
8. 既知の細胞接着分子と同定した分子のシナプスにおける役割分担を明らかにする。
9. 現在、KCNH3のノックアウトマウスを作製しつつあり、今後、ノックアウトマウスを用いて、形態学的、電気生理学的、行動学的解析を行い、神経回路形成にどのような異常が起きているかを詳細に検討する。

4. 研究成果

以下のことを研究成果として見出している。

1. KCNH3は細胞内cAMP濃度に依存したホモフィリックな細胞接着活性を有すること。(図1)

KCNH3を発現させた線維芽細胞を用いて細胞凝集塊形成アッセイを行うと、細胞内cAMP濃度を上昇させた条件のときに、細胞凝集塊を形成することを見出した。

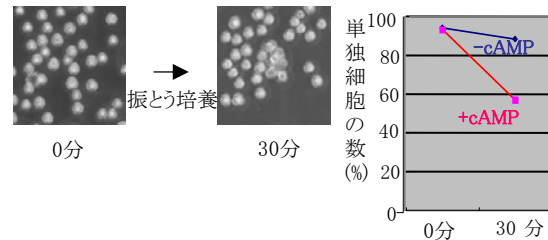


図1 KCNH3発現細胞の細胞凝集塊形成

2. 海馬において成長円錐やシナプスに局在すること。(図2)

抗KCNH3抗体を作成し、海馬組織や培養海馬神経細胞において免疫染色を行ったところ、シナプスやシナプスを形成すべき標的の探索を行う成長円錐に局在することを見出した。

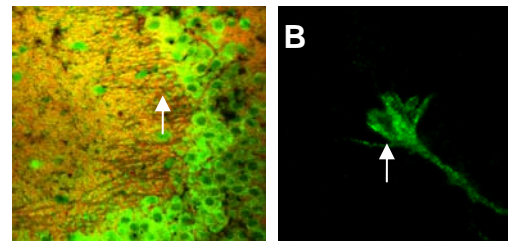


図2 KCNH3の局在

- A: マウス海馬における抗KCNH3抗体による染色像。矢印の先端がシナプスに相当する。
- B: 培養海馬神経細胞におけるKCNH3局在。矢印は成長円錐を示す。

3. KCNH3が電気生理学的にカリウムイオンチャンネル活性を持つこと。(図3)

KCNH3を発現させた培養細胞を用いて、パッチクランプ法により、KCNH3が電位依存的なイオンチャンネルであることを確認した。

4. KCNH3が細胞接着能を有すると予想される細胞外領域で限定分解(プロテオリシス)されること。(図4)

KCNH3の発現レベルを発生段階の海馬において検討したところ、シナプス形成期に発現が多く、シナプス形成が落ち着いた時期になるとKCNH3タンパク質が分解されていくことを見出した。

5. 生体内において、感覚系シグナルを脳に伝える長距離の軸索先端に局在すること。(図5)

KCNH3の局在を海馬のみならず神経系全体において調べたところ、嗅脳系球体や大脳皮質一次体性感覚野のバレル構造などの感覚系シグナルを大脳に伝える長距離軸索の先

端に局在することを見出した。

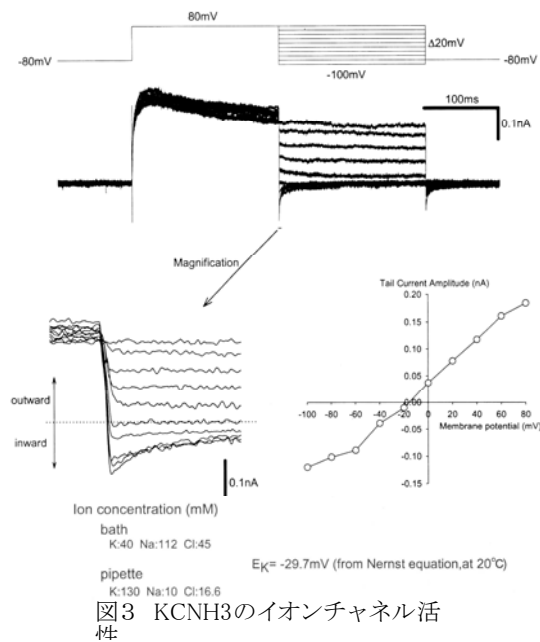


図3 KCNH3のイオンチャネル活性

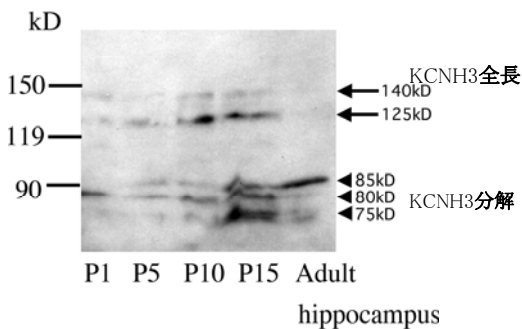


図4 KCNH3の発生時期依存性分解

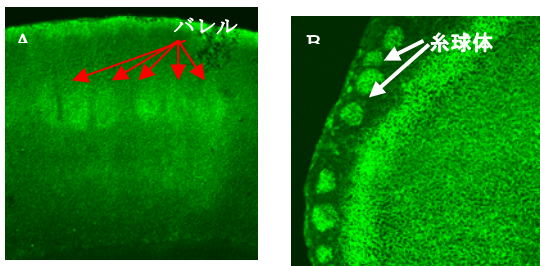


図5 KCNH3は長距離投射軸索先端に局在する
 A: 大脳皮質、一次体性感覚野パレル構造における局在。視床からの投射部位に相当する。
 B: 嗅脳糸球体における局在。嗅神経からの投射部位。

6. 報告されている遺伝子配列とは異なる配列の KCNH3 が多数種類 (少なくとも 30 種類以上) 存在していること。

KCNH3 の mRNA をシナプス形成期の海馬より抽出し、塩基配列を決定したところ、報告されている遺伝子配列とは異なる配列を数多く見出し、KCNH3 タンパク質に多様性があることが示唆された。

7. mRNA レベルで非常に発現量が多いこと (全 mRNA の 0.5%)。

KCNH3 の mRNA 量を見積もったところ、全 mRNA の約 0.5% を占めることを見出した。これは、細胞骨格などに匹敵するほど多い。しかし、タンパク質レベルではこれほど多くなく、現在、その意味を検討中である。

8. KCNH3 に特異的な細胞外領域における糖鎖の修飾がチャネル活性に必要なことを明らかにしている。

KCNH3 に特異的な細胞外領域に存在する糖鎖修飾部位に変異を入れたところ、イオンチャネル活性が失われ、これは、KCNH3 の細胞膜表面への輸送が阻害されたためと考えられた。(現在投稿準備中)

以上のことから、KCNH3 は物理的信号(細胞膜電位変化)と化学的信号(cAMP 濃度変化)の両方を感じて、シナプス強度を制御する全く新しい機能分子であると考えられる。このことから、申請者が同定した KCNH3 は中枢神経における細胞接着活性を持ち、かつ、シナプス形成に関わるイオンチャネルとして期待できる。(図 6)

今までにイオンチャネルと中枢神経シナプス形成の直接的な関係は知られておらず、本研究はシナプス形成のメカニズム解析に新たなアプローチと視点を与えるものである。また、本研究は活動電位とシナプス形成を直接結びつけ理解することができる可能性がある。

現在、ノックアウトマウスの作成が完了し、さらなる生理的機能を解析していく予定である。さらなる KCNH3 の機能解析により神経活動電位とシナプス形成の直接的な関係が理解されることが期待され、シナプス形成の分子メカニズムの解明に大きく寄与し、新しい神経ネットワーク形成機構を提唱できると考えられる。

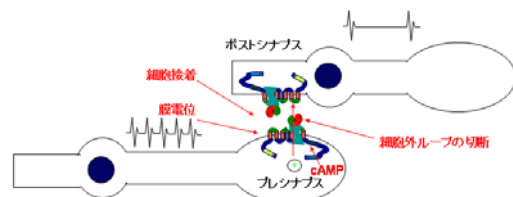


図6 細胞接着活性を有する電位依存性陽イオンチャネル、KCNH3 の特性

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)

1) Tsutsumi T, Kosaka T, *Ushiro H, Kimura K, Honda T, Kayahara T, Mizoguchi A. PASK (proline-alanine-rich Ste20-related kinase) binds to tubulin and microtubules and is involved in microtubule stabilization. **Arch Biochem Biophys.** 477(2):267-78. 2008. 査読有

2) Toiyama Y, Mizoguchi A, Kimura K, Hiro J, Inoue Y, Tutumi T, Miki C, *Kusunoki M. TTYH2, a human homologue of the *Drosophila melanogaster* gene tweety, is up-regulated in colon carcinoma and involved in cell proliferation and cell aggregation. **World J Gastroenterol.** 13(19):2717-21. 2007. 査読有

3) Sadakata T, Kakegawa W, Mizoguchi A, Washida M, Katoh-Semba R, Shutoh F, Okamoto T, Nakashima H, Kimura K, Tanaka M, Sekine Y, Itohara S, Yuzaki M, Nagao S, *Furuichi T. Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. **J. Neurosci.** 27(10):2472-82. 2007. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1) Noma K, Kimura K, Mizoguchi A, Fujiyoshi Y. The N-linked glycosylation controls the cell surface expression of KCNH3 potassium channel. *Neuroscience* 2008, 19 Nov. 2008. Washington D.C.

2) 野間 健太郎, 木村 一志, 溝口 明, 藤吉好則. 電位依存性 K チャネル KCNH3 の機能的発現に対する糖鎖修飾の影響. 第60回日本細胞生物学会大会、平成20年6月29日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 一志 (Kazushi Kimura)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20314180

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者