

同定神経細胞へのイオンチャネル及び伝達物質受容体遺伝子導入による神経機能の解析

Functional analysis of exogenous ion channels and receptors expressed in identified neurons

代表研究者 広島大学総合科学部助手 古川康雄
Research Assoc. Faculty of Integrated Arts and Sciences,
Hiroshima Univ.
Yasuo Furukawa

Characteristics of an cloned K⁺ channel, AKv1.1a, was examined using *Aplysia* neurons as the expression system. The expression plasmid, pNEXAK01a, which includes a coding region of AKv1.1a, was injected into nucleus of *Aplysia* neurons in situ, and the ganglia were cultured for some periods. Kinetics of the expressed channel currents were extremely different depending on the culture. Although a prominent feature of AKv1.1a is a fast inactivation, substantial neurons expressed apparently non-inactivating K⁺ currents. Moreover, such non-inactivating currents were insensitive to 4-aminopyridine, which is a potent blocker of the inactivating AKv1.1a currents. Examination of time course for the expression of non-inactivating currents suggested that relatively large amount of AKv1.1a is necessary to modify the channel kinetics and pharmacology. Although precise mechanisms to produce such heterogeneity following the expression of a single species of channel protein are still unknown, the results imply that functional properties of the channel protein may be quite different depending on its expression level.

研究目的

脳神経系は動物個体の最上位中枢であり、外界や体内からのさまざまな入力情報を統合し、行動発現や体内諸器官の機能調節を行なっている。従って脳神経系が行なう情報処理活動は膨大で、反射のような比較的単純なものから記憶や学習、或いは情動といった高次の精神活動まで非常に多岐

にわたっている。これら複雑な情報処理機能の分子機構を調べようとする場合、比較的構築が単純な下等動物の神経系を研究対象とする事で、基本的な分子機構をよりの確に解析できると考えられる。この点から、海産無脊椎動物であるアメフラシの中枢神経系は、巨大な神経細胞を持ち、細胞の局在もよくわかっているために有用な実

験材料である。近年の分子生物学的手法の発展により、神経機能に必須な膜蛋白であるイオンチャネルや受容体の一次構造が続々と決定されてきており、これら基本的な機能素子の性質が例えばアフリカツメガエル卵母細胞などの系を用いて分子レベルで明らかにされつつある。しかしながら、それら分子をそれが実際に働く場所である神経系において発現させ、機能解析をする研究はほとんどなされていない。そこで本研究は、下等無脊椎動物である軟体動物アメフラシの中枢神経系を材料とし、そこに同定される神経細胞にクローニングされたイオンチャネルや受容体を人為的に発現させる事で、それらが実際の中枢神経系内でのような情報処理機能をはたしているかを分子レベルで明らかにすることを目的としている。

研究経過

本研究における実験では、アメフラシの神経細胞核内に、発現させたいチャネル或いは受容体遺伝子を含む発現プラスミドを圧注入し、適当な時間培養した後、発現したチャネルの性質を電気生理学的手法を用いて解析する。アメフラシの中枢神経系は複数の神経節からなるが、その中から、巨大細胞が多くその局在が最もよくわかっている腹部神経節を選んだ。発現プラスミドとしてはpNEX¹を用いた。解析対象としたイオンチャネルは、アメフラシ中枢からクローニングされたK⁺チャネルであるAKv1.1a²である。このチャネルは他のクローニングされているK⁺チャネルと同様一つのサブユニットであり、4個のサブユニットが重合してチャネルを形成すると考えられている。以前の研究^{2,3}によりこのチャネルは、RNAレベルではアメフラシ中枢でよく発現しているK⁺チャネルであるが、ホモオリゴマーのチャネルとしては、

ごくわずかの細胞においてのみ発現している事が示唆されている。神経細胞におけるこのチャネルの機能をより詳細に解析するために、主としてこのチャネルを発現していない神経細胞を選び、発現プラスミドを注入する事でチャネルを発現させ、その機能解析を行った。

1. Kaang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1133-1137,1992
2. Pfaffinger et al., J.Neurosci., 11:918-927, 1991
3. Furukawa et al., J.Neurosci., 12:989-1000,1992

研究成果

アメフラシ神経細胞に発現させたAKv1.1aは、測定される膜電流量から推測されるチャネル蛋白の発現量が比較的少ない時は、一過性のK⁺電流を運ぶイオンチャネルとして機能する(図1A)。すなわち、チャネル電流は、電位依存性の活性化と共に顕著な不活性化を示した。一方、培養期間を延長すると、発現するK⁺電流の大きさが大きくなると同時に、チャネルのキネティクスに大きな変化がみられる例が現れた。すなわち、もともと単一の指数関数で近似できたチャネルの不活性化過程に、明らかに別の過程が重畳する例が観察された。極端な場合、不活性化がほとんど認められないチャネル電流成分が発現した(図1B)。チャネル電流の増大は、蛋白発現が継続する事によるチャネルの蓄積として理解されるが、チャネルキネティクスの変化は、蛋白量の増大だけでは説明できない。また、不活性化が顕著でないチャネル電流は、AKv1.1aの特異的な阻害剤である4-アミノピリジンに対する感受性が大きく減少していた(図2)。これらの結果から、形成されたチャネルになんらかの構造的変化が惹起されていると思われる。この過程

の時間変化を追うために、多数例の発現実験を繰り返し、任意の時点でチャンネル電流を測定し、得られたチャンネル電流をその不活性化過程の様子からグループ分けし、測定時間との対応を調べたところ、遺伝子注入後チャンネル電流が観察される初期の時点では(注入後10時間以内)、ほとんどの例で顕著な不活性化を示すチャンネル電流が観察された。それに対し、注入後長い時間培養を続けた細胞では、不活性化がみられないチャンネル電流が観察される確率が高くなった(図3)。これらの結果は、チャンネルの基本的な性質や機能がその蛋白の発現量に応じて変化する事を示している。

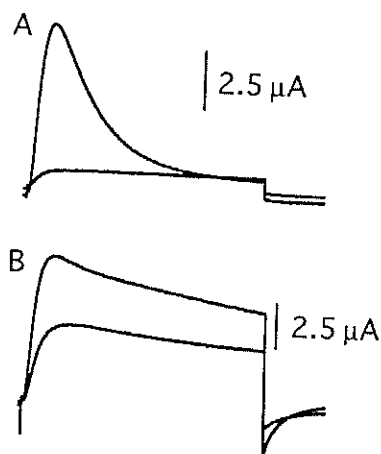


図2. 1mM 4-アミノピリジンの作用
保持電位：-80mV
テストパルス：+10mV(A),0mV(B)
A、B共大きい電流がコントロール

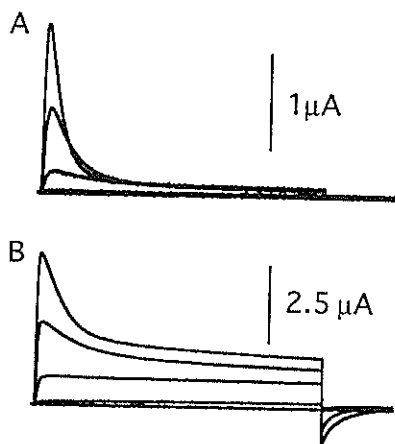


図1. 異なる不活性化を示すAKv1.1a電流
保持電位：-80mV
テストパルス：1秒、-40～0mV

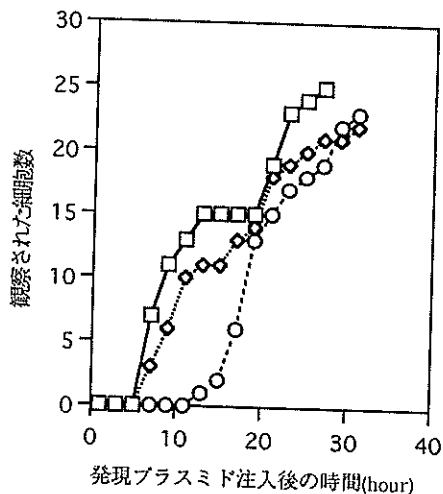


図3. AKv1.1aの発現型の時間依存性
□：単一指数関数で不活性化する電流
◇：2つ以上の不活性化成分を示す電流
○：ほぼ不活性化を示さない電流

今後の課題と発展

今回イオンチャネル遺伝子の発現に用いた、アメフラシの巨大神経細胞核内への遺伝子圧注入法は、微量注入法に習熟さえすれば成功率の高い手法であり、中枢神経系の構築を保ったまま培養される神経節内の目的とする神経細胞を発現系として、イオンチャネルに限らず、任意の蛋白の機能解析を可能とする点から、今後とも様々な発展性が期待される実験手法である。現在、ムスカリン性アセチルコリン受容体とシナプス機構との関連を解析するために、発現ベクターに脊椎動物ムスカリン受容体のm1、m2、m3及びm4サブタイプを各々プラスミドベクターに挿入した発現プラスミドの調整を終えたところであり、次の発現実験を計画している段階である。今後の応用課題の一つとして、この手法を脊椎動物の海馬スライス標本のような小細胞からなる系へ応用する事が考えられる。例えば、パッチピペットを用いれば、遺伝子を細胞内へ拡散により導入する事は可能である。この場合、核内への直接注入よりは成功率が低いと思われるが、適切なプラスミドベクターを開発すれば発現実験が可能であろうと思われる。今回のK⁺チャネル(AKv1.1a)の発現実験により、蛋白の機能を適当な発現系を用いて解析する場合、蛋白によっては発現量を適切にコントロールする事が必要となる事が明かとなった。この事は、全ての遺伝子発現実験において考慮すべき問題であると同時に、このチャネルの構造と機能を考える上で更に検討を重ねるべき現象であると思われる。

発表論文リスト

現在準備中