



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1642号
学位記番号	第1177号
氏名	星川 真理子
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	Distribution of ASIC4 transcripts in the adult wild-type mouse brain (野生型成獣マウス脳における ASIC4 メッセージャーRNA の分布)  Neuroscience Lett 651, 57-64 (2017)
論文審査担当者	主査： 飛田 秀樹 副査： 浅井 清文, 鵜川 眞也

## 論文内容の要旨

【背景と目的】酸感受性イオンチャネル (acid-sensing ion channel; ASIC) 遺伝子ファミリーは、DEG/ENaC スーパーファミリーに属するアミロライド感受性の陽イオンチャネル分子群である。哺乳類では、4つの遺伝子 (*Accn1-4*) からスプライシングにより6種類のサブタイプ (ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3、ASIC4) が転写・翻訳され、互いにサブユニットとして3量体を構成している。この内、ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC3 は水素イオンによって直接活性化され、ASIC2b は水素イオンに応答しないものの、modulatory subunit として機能する。いずれのサブタイプも神経系 (主にニューロン) に広く発現し、多様な生理的・病理的役割を担っている。

ASIC4 は、2000年にラットの脳と下垂体からクローニングされた比較的新しいサブタイプである。他の ASIC 分子と異なり、培養細胞に強制発現させても細胞膜に移行しないことから、電気生理学的解析が進まず、チャネル特性は不明である。ASIC1a や ASIC3 と共発現させると、これらのサブタイプの細胞膜上への移行を抑制することから、他のサブタイプの発現量を (サブユニットとしてではなく) 間接的に調節している可能性が指摘されているが、実際の生体において ASIC4 がどの程度、他のサブタイプと共存しているかは、不明な点が多い。また、ノックアウトマウスを用いた実験から、ASIC4 が不安・恐怖の惹起に関与することが知られているが、その詳細なメカニズムについても未解明のままである。

本研究では、ASIC4 のリガンドの手がかりを得るため、さらに、脳における役割を解明するため、野生型成獣マウス脳における ASIC4 メッセンジャーRNA の分布解析を行った。

### 【材料と方法】

#### ① *in situ* hybridization 法

ASIC4 に特異的な <sup>35</sup>S- $\alpha$ UTP 標識 cRNA プローブを作製し、野生型成獣マウス (C57BL/6J、8-12週齢♂) の脳薄切切片 (厚さ 6  $\mu$ m) にハイブリダイズさせた。

#### ② ASIC4 レポーターマウスの作出

Knockout Mouse Project (KOMP) Repository から ASIC4 ノックインレポーターマウスの ES 細胞を入手し、ASIC4 プロモーター制御下で LacZ 遺伝子を発現するレポーターマウスを作出した。

#### ③ X-gal 染色

ASIC4 レポーターマウス (8-10週齢♂) の脳切片 (厚さ 20  $\mu$ m) を用いて、 $\beta$ -galactosidase 活性を利用した染色 (X-gal 染色) を行い、ASIC4 陽性細胞を青色に標識した。

#### ④ アセチルコリン神経核における ASIC4 陽性細胞の発現解析

X-gal 染色後に抗 choline acetyltransferase (ChAT) 抗体を用いた免疫染色を行い、X-gal 陽性細胞の ChAT 陽性細胞に対する割合を、8つのアセチルコリン神経核それぞれにおいて算出した。

### 【結果】

1) *in situ* hybridization 法により、嗅球、梨状葉、線条体、内側中隔核、対角帯垂直核および水平

核、側坐核、嗅結節、外側視索前野、室傍核、無名質、内側手綱核、扁桃体、視蓋前域、外側膝状体、腹側海馬の顆粒細胞層、上丘、脚間核、中脳網様体、二丘体傍核周囲、下丘、孤束核、三叉神経脊髄路核に ASIC4 メッセージャーRNA の強い発現を認めた。先行研究 (Eur J Neurosci. 2015 Jun; 41 (12): 1553-68) と異なり、小脳における明らかな発現は認められなかった。また、形態学的特徴から、ASIC4 陽性細胞はグリアではなく、神経細胞であることがわかった。

2) ASIC4 レポーターマウスを使った X-gal 染色の結果は、*in situ hybridization* 法による解析結果と垂核に至るまで一致していた。

3) 上記解析結果に基づき、脳内に存在する 8 つのアセチルコリン神経核に ASIC4 が発現していると推測した。そこで、抗 ChAT 抗体を用いた免疫組織化学にて、アセチルコリン神経核における ASIC4 陽性細胞の発現を調べたところ、前脳基底部に存在する内側中隔核、対角帯垂直核および水平核、マイネルト基底核において、ChAT 陽性主ニューロンの大部分が X-gal 陽性 (ASIC4 陽性) であることがわかった。

【考察】本研究では、*in situ hybridization* 法を用いて、マウス脳における ASIC4 メッセージャー RNA の分布を解析し、多くの領域に渡り、神経細胞に局在していることを明らかにした。さらに、レポーターマウス解析にて、*in situ hybridization* の結果と一致した分布パターンを得た。遺伝子改変マウスを用いた先行研究では、小脳にも強い発現を認めており、本研究の結果とは異なっている。その原因は不明であるが、先行研究ではタンパク質レベルを、本研究ではメッセージャーRNA レベルでの分布を調べており、検出感度自体に違いがあることなどが考えられる。本研究では、2つの方法で同じ結果が得られており、ASIC4 転写産物の分布を正確に反映していると考えられる。

先行研究によると、マウス脳における ASIC4 陽性細胞は、CR (calretinin) 陽性、あるいは VIP (vasoactive intestine peptide) 陽性の介在ニューロン、海馬 NG2 (neuron-gial antigen 2) 細胞、小脳顆粒細胞の 3 種類であり、ASIC4 は海馬 NG2 細胞と小脳顆粒細胞でのみ ASIC1a (脳に発現する主要 ASIC チャンネル) と共存している。しかし、ASIC1a は、実質上、ほぼ全てのニューロンに発現しており、より広い領域において ASIC4 と共存しているはずである。細胞下レベルでの共存については、ASIC4 を特異的に認識する抗体が得られないことから、今後の課題とした。

ASIC4 遺伝子を欠損させたマウスでは、天敵のにおい等に対する恐怖反応が亢進するという報告がある。今回、ASIC4 の発現が確認された嗅球、梨状葉、分界条床核、扁桃体、室傍核、腹側海馬、背側中脳水道周囲灰白質、内側前頭前皮質は、恐怖反応への関与が示唆されている部位である。同じく、ASIC4 の発現が明らかとなった前脳基底部分アセチルコリン神経も、大脳皮質や海馬、扁桃体に投射し、恐怖記憶の条件付け学習や消去に関与する部位であり、この知見も、ASIC4 遺伝子欠損マウスの恐怖刺激に対する過敏反応を部分的に説明するものと考えられる。

最近、電気生理学的解析を行い、ASIC4 はナトリウムイオン透過性の漏れ型チャンネルであることが判明した。今後、遺伝子改変マウスを駆使し、ASIC4 の機能解明に迫りたい。

## 論文審査の結果の要旨

【背景と目的】 酸感受性イオンチャネル (ASIC: acid-sensing ion channel) 遺伝子ファミリーは、DEG/ENaC スーパーファミリーに属する水素イオン感受性の陽イオンチャネル分子群である。哺乳類には6種類のサブタイプ (ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3、ASIC4) が存在し、互いにサブユニットとして3量体を形成している。ASIC4 は、培養細胞に強制発現させても細胞膜に移行しないことから、電気生理学的解析が進まず、チャネル特性は不明である。生化学的解析から、ASIC1a や ASIC3 の細胞膜上での発現量を調節している可能性が指摘されているが、実際の生体において他のサブタイプと共存しているかについては未解明のままである。また、ノックアウトマウスを用いた実験から、ASIC4 が不安・恐怖の惹起に関与することが示唆されているが、その詳細なメカニズムも明らかではない。本研究では、ASIC4 の生理的役割の解明を目指し、マウス脳における ASIC4 メッセンジャーRNA の分布解析を行った。

【方法】 ASIC4 を特異的に認識する <sup>35</sup>S- $\alpha$ UTP 標識 cRNA プローブを作製し、野生型成獣マウスの脳薄切切片を用いて *in situ* hybridization を行った。次に、ASIC4 プロモーター制御下で LacZ 遺伝子を発現するレポーターマウスを作出し、 $\beta$ -galactosidase 活性を利用した染色 (X-gal 染色) を行った。さらに、X-gal 染色後に抗 choline acetyltransferase (ChAT) 抗体を用いた免疫染色を行い、アセチルコリン神経核における X-gal 陽性細胞の ChAT 陽性細胞に対する割合を算出した。

【結果】 野生型マウスの脳を対象とした *in situ* hybridization により、嗅球、梨状葉、線条体、内側中隔核、対角帯垂直核および水平核、側坐核、嗅結節、外側視索前野、室傍核、無名質、内側手綱核、扁桃核、視蓋前域、外側膝状体、腹側海馬の顆粒細胞層、上丘、脚間核、中脳網様体、二丘体傍核周囲、下丘、孤束核、三叉神経脊髄路核の神経細胞に ASIC4 メッセンジャーRNA の発現を認めた。ASIC4 レポーターマウスを使った X-gal 染色の結果は、垂核に至るまで、*in situ* hybridization の結果と一致していた。これらの解析結果に基づき、脳内に存在する8つのアセチルコリン神経核に ASIC4 が発現していると推測されたため、より詳細な発現解析を行ったところ、前脳基底部に存在する4つのアセチルコリン神経核 (内側中隔核、対角帯垂直核および水平核、マイネルト基底核) の ChAT 陽性主ニューロン (コリン作動性神経) の大部分は X-gal 陽性 (ASIC4 陽性) であることがわかった。

【考察】 脳全体における分布解析の結果は、2つの方法で一致していたことから、ASIC4 転写産物の分布を正確に反映していると考えられる。ASIC4 は、小脳を除いた多くの領域に発現しており、今後、ノックインマウスを使って、他のサブタイプとの共存解析を行う予定である。今回、ASIC4 の発現が確認された嗅球、梨状葉、分界条床核、扁桃核、室傍核、腹側海馬、背側中脳水道周囲灰白質、内側前頭前皮質は、恐怖反応への関与が示唆されている部位である。同じく、ASIC4 の発現が明らかとなった前脳基底部アセチルコリン神経 (コリン作動性神経) も、恐怖記憶の条件付け学習や消去に関与する部位である。これらの知見は、ASIC4 遺伝子欠損マウスの恐怖刺激に対する過敏反応を部分的に説明するものと考えられる。

【審査の内容】 約 20 分間のプレゼンテーションの後、主査の飛田教授より、レポーターマウスの相同組換えについて、ASIC の立体構造と酸感受性ドメインについてなど 11 項目、第一副査の浅井教授より、野生型マウスとレポーターマウス間での形態学的差異について、*in situ* hybridization 法に用いたプローブについて、ASIC4 の細胞内局在についてなど 9 項目、第二副査の鶴川教授より、脳において想定される ASIC4 の役割、DEG/ENaC 遺伝子スーパーファミリーについてなど 6 項目の質問がなされた。これらの質問に対して申請者から概ね適切な回答が得られ、申請者は学位論文の内容を十分に把握し、大学院修了者としての学力を備えていると判断した。本研究は、解析の進んでいない ASIC4 の生理的役割を明らかにする上で重要な手がかりを提供するものであり、学術的に高く評価される。よって、本論文著者は、博士 (医学) の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 飛田 秀樹

副査 浅井 清文 鶴川 眞也