

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870826

研究課題名(和文) 抑制性シナプス編成を制御する分子間相互作用と時空間ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Molecular dynamics and interactions regulating inhibitory synapse formation

研究代表者

中畑 義久 (Nakahata, Yoshihisa)

生理学研究所・発達生理学研究系・特別研究員

研究者番号：50726536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性シナプス編成過程の一端を明らかにするため、生きた単一の神経細胞におけるグリシン受容体とその足場タンパク質であるゲフィリンの時空間的な局在変化と相互作用を検討した。その結果、ゲフィリンはグリシン受容体の活性化にかかわらず安定的にシナプスに局在する一方、グリシン受容体は活性化依存的にゲフィリンクラスター領域で安定化していた。更に、グリシン作動性シナプス編成において、グリシン受容体に先行してゲフィリンの局在が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：GABA and glycine mediate fast inhibitory neurotransmission in the central nervous system. Although the molecular elements of inhibitory synapses, such as GABAA or glycine receptors and gephyrin, a scaffolding protein are important for establishing inhibitory synapses, dynamic interactions between these molecules in live neurons are still elusive. We studied trafficking and localizations of glycine receptors and gephyrin. The present results suggest that the mobility of gephyrin is lower than glycine receptors, and its stability is unaffected by glycine receptor activation within one hour. Furthermore, the synaptic localization of gephyrin may be a prerequisite for the postsynaptic clustering of glycine receptors.

研究分野：神経科学

キーワード：抑制性シナプス シナプス編成 培養神経細胞 グリシン受容体 ゲフィリン ライブセルイメージング

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、神経細胞間の主要な抑制性シナプス伝達は GABA とグリシンによって行われている。シナプスにおいて、放出される伝達物質に対応した適切な受容体の局在は神経回路編成に不可欠であり、記憶や運動学習をはじめ神経機能の基盤となる神経可塑性において極めて重要である。

近年、神経機能発現における抑制性局所回路の重要性が注目されるようになり (Hensch, 2005) AMPA 受容体のみならず GABA 作動性シナプス (Bannai et al., 2009) やグリシン作動性シナプス (Levi et al., 2008) についても、神経活動に応じて各受容体のシナプス局在が変化することが報告されてきた。シナプスにおける受容体の局在は、エクソサイトーシスによる膜挿入、ブラウン運動による側方拡散、エンドサイトーシスによる膜から細胞内への取り込みなど、受容体自体の供給経路によるものと、足場タンパク質であるゲフィリン、細胞接着分子であるニューロリギンなどのシナプス関連分子との相互作用によって制御されている (Craig & Kang, 2007)。従来、グリシン受容体はシナプス後膜においてゲフィリンと結合することで安定化すると考えられてきたが、近年の報告では、グリシン受容体が細胞内小胞輸送の過程でゲフィリンと複合体を形成し、樹状突起に共輸送されることが示されている (Maas et al., 2006, 2009)。これまで抑制性シナプス形成におけるゲフィリンとグリシン受容体の重要性が明らかとなっているが、グリシン作動性シナプス編成において、足場タンパク質であるゲフィリンと受容体がどこで、どのように相互作用するのか、という基本的問題は未だ十分に明らかになっていない。

2. 研究の目的

抑制性シナプス編成に関連した分子がどこで、どのように相互作用し、機能的な抑制性シナプスを編成するのか、という神経回路構築の基本原則は十分明らかになっていない。そこで、抑制性神経伝達物質受容体と関連分子に着目し、シナプス形成におけるそれら分子の相互作用と時空間的ダイナミクスを検討した。

3. 研究の方法

マウス脊髄由来の培養神経細胞へ蛍光タンパク質を付加した DNA コンストラクトを複製・導入し、グリシン受容体およびその足場タンパク質であるゲフィリンを可視化した。主に共焦点顕微鏡を用いて、光褪色後蛍光回復法により各分子の移動性を検討した。併せて、生細胞イメージングの結果を補完するため、免疫化学的染色法によって定量的な解析を行った。また、電気生理学的パッチクラン

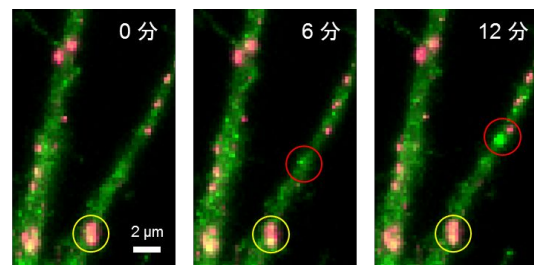
プ法を用いて抑制性シナプス応答の変化を検討した。

4. 研究成果

まず、免疫化学的染色法によって抑制性シナプスにおけるグリシン受容体とゲフィリンの局在率を検討した。抑制性シナプス前部のマーカーとして小胞抑制性アミノ酸輸送体 (VIAAT) を使い、グリシン受容体 1 サブユニットもしくはゲフィリンのシナプス局在率を計測したところ、いずれも抑制性シナプスにおいて同程度の局在を示すことがわかった。次に、グリシン受容体およびゲフィリンの共局在率を検討したところ、高い共局在率を示した。

Maas ら (2006, 2009) は、ゲフィリンがグリシン受容体の足場のみならず、グリシン受容体の細胞内輸送においてもアダプタータンパク質として働くことを報告している。そのため、単一の神経細胞において、グリシン受容体とゲフィリンの時空間的動態を同時に観察し、それら分子の移動性を比較検討した。リポフェクション法により、培養細胞にグリシン受容体 サブユニットおよびゲフィリンを発現させてライブセルイメージングを行ったところ、およそ 1 時間の経時観察において、いずれの分子も樹状突起上を移動することが認められた。しかし、グリシン受容体クラスターは樹状突起において出現と消失がみられ、高い移動性を示した一方、ゲフィリンの空間的变化はグリシン受容体に比べ非常に限局されており、1 時間の経時観察において新たなゲフィリンクラスターの出現と消失は認められなかった。

加えて、pH 感受性蛍光タンパク質を用いて細胞膜上のグリシン受容体を特異的に可視化すると、ゲフィリンがクラスター化していない樹状突起上の領域において、グリシン受容体は高い側方移動性を示した。そのため、グリシン受容体とゲフィリンの移動性は異なっており、少なくとも、グリシン受容体とゲフィリンが常に結合した状態で樹状突起を移動してシナプス局在するのではない、と考えられた。



グリシン受容体
ゲフィリン(足場タンパク質)

図1 .グリシン受容体およびゲフィリンを発現した神経細胞の突起

ゲフィリンクラスターの移動性は低く、安定

的な局在を示す。ゲフィリンと共局在したグリシン受容体クラスター(黄印)も安定的であるが、ゲフィリンクラスターのない突起上ではグリシン受容体の出現や高い移動性を示す(赤印)。

次に、グリシン受容体の活性化に伴うグリシン受容体およびゲフィリンの局在変化を検討した。ゲフィリンは活性化に関わらず安定的にシナプスに局在する一方、グリシン受容体は活性化阻害群において、対照群よりも有意に側方拡散が高いという結果を得た。しかしながら、グリシン受容体を活性化させると、受容体の側方拡散が有意に低下し、対照群と同程度になることが認められた。また、この活性化依存的な受容体の安定化はゲフィリンクラスターが存在する領域においてのみ観察された。そのため、グリシン作動性シナプス編成過程において、ゲフィリンはグリシン受容体に先行してクラスターを形成し、グリシン受容体はその領域で活性化することでグリシン受容体のクラスターを形成することが示唆された。

次に、既にゲフィリンクラスター上で安定化したグリシン受容体の時間的安定性を検討した。その結果、既に側方拡散が低下したグリシン受容体は、活性化を24時間阻害しても、その安定性が維持された。一方、阻害後48時間経過すると、再び側方拡散が上昇し、不安定化することが示唆された。

更に、活性化依存的なグリシン受容体の安定化が機能的な抑制性シナプス形成に寄与しているのか検証するため、電気生理学的パッチクランプ法を用いてグリシン作動性シナプス応答の変化を検討した。その結果、グリシン受容体の活性化を長期間阻害していた群では、阻害剤除去10分後に比べ、50分後では有意に振幅が増大していた。一方、対照群では経時的なグリシン作動性シナプス応答の振幅の増大は認められなかった。

本研究結果から、グリシン受容体の活性化はグリシン受容体のシナプス集積を促進させる一方、ゲフィリンの集積には関与しないことが示唆された。また、グリシン受容体とゲフィリンの相互作用は樹状突起上の輸送中よりもシナプス局在において重要であると考えられた。

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)(査読有)

1. Murakoshi H, Shibata AC, Nakahata Y, Nabekura J., A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer., Scientific Reports, 2015年10月5号,

15334, DOI: 10.1038/srep15334.

2. Hirao K, Eto K, Nakahata Y, Ishibashi Y, Nagai T, Nabekura J., Noradrenergic refinement of glutamatergic neuronal circuits in the lateral superior olivary nucleus before hearing onset., Journal of Neurophysiology, 2015年9月114巻3号1974-1986 頁 DOI: 10.1152/jn.00813.2014
3. Shibata AC, Maebashi HK, Nakahata Y, Nabekura J, Murakoshi H., Development of a Molecularly Evolved, Highly Sensitive CaMKII FRET Sensor with Improved Expression Pattern., PLoS One, 2015年3月10巻3号, DOI: 10.1371/journal.pone.0121109.

〔学会発表〕(計1件)

1. Nakahata Y, Ishibashi H, Nabekura J., Glycine receptor activation regulates its postsynaptic dynamics in mature neurons, 生理研研究会『シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス』, 2014年12月2日、自然科学研究機構生理学研究所(愛知県岡崎市)

〔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

1. オンライン脳科学辞典、「抑制性シナプス」, 中畑義久, 稲田浩之, 加藤剛, 鍋倉淳一, 2015年4月13日
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E6%8A%91%E5%88%B6%E6%80%A7>

[E3%82%B7%E3%83%8A%E3%83%97%E3%82%B9](http://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E3%82%B7%E3%83%8A%E3%83%97%E3%82%B9)

2. オンライン脳科学辞典、「ゲフィリン」、中畑義久, 石橋仁, 鍋倉淳一, 2015 年 3 月 20 日
<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E3%82%B2%E3%83%95%E3%82%A3%E3%83%AA%E3%83%B3>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中畑 義久 (Nakahata, Yoshihisa)
生理学研究所・発達生理学研究室・特別研究員

研究者番号 : 50726536

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :