

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700299

研究課題名（和文）スパインにおける IP₃ 受容体の密度変化と長期抑圧制御機構の解明研究課題名（英文）Regulatory mechanism for the distribution of IP₃ receptor in spines and long-term depression

研究代表者 深津 和美 (FUKATSU KAZUMI)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：60435675

研究成果の概要：学習・記憶の細胞レベルでの基礎過程として、神経細胞間での情報伝達部位であるシナプスにおける可塑性が考えられている。シナプス可塑性には、小胞体膜上のカルシウムチャネルであるIP₃受容体 タイプ1 (IP₃R1) からの局所的なカルシウム放出が関与している。本研究ではプルキンエ細胞のスパインにおけるIP₃R1の動態に着目し、IP₃R1のスパインでの動態と、それが、神経活動依存的に変化することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：

キーワード：プルキンエ細胞、スパイン、拡散、IP₃受容体、カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

近年、神経細胞のシナプスにおいて細胞膜上の受容体はその密度や動態が神経活動依存的にダイナミックに変化することが分かっている。それが、シグナル伝達効率の変化、さらにシナプス可塑性の誘導につながることも示唆されている。例えば、AMPA受容体は神経活動依存的に動態が変化すること、シナプスの中と外で動態が異なることが明らかになっており、それがAMPA受容体のシナプスでの密度変化に

関与する可能性が示されている (Borgdorff et al., Nature 2002; Groc et al., Nat. Neurosci. 2004)。小脳プルキンエ細胞におけるシナプス可塑性の誘導には、細胞膜上の受容体に加えて、小胞体膜上のカルシウムチャネルであるIP₃受容体タイプ1 (IP₃R1) からのカルシウム放出がスパインの中で局所的に起こらなければならない。しかしIP₃R1の動態や、その動態の制御機構については明らかにされていなかった。そこで私はIP₃R1にも神経伝達物質受容体と同様

の動態制御機構が存在し、それにより局在や密度変化が制御されているのではないかと考えた。

小胞体からのカルシウム放出は、神経の正常な発達、記憶学習に関わるシナプス可塑性の誘導を始めとする多くの神経活動に重要な役割を持っている。IP₃R1 は小胞体からのカルシウム放出を担うチャンネルの一つであり、IP₃R1 からのカルシウム放出は神経細胞の軸索の突起伸長、海馬・小脳におけるシナプス可塑性の維持と誘導に関与している。特に、シナプス可塑性を引き起こすIP₃R1 からのカルシウム放出は、シナプスにおいて情報を受け取る側の構造体であるスパイン（棘突起）内で局所的に起こることも分かっている。しかし、小胞体はスパインの中も含めて神経細胞全体に一様に分布しており、局所的なカルシウム放出がどのように引き起こされるのかは明らかになっていない。スパインにおける局所的なカルシウム放出制御機構を明らかにすることは、シナプス可塑性を理解する上で必要不可欠である。そこで私はIP₃R1 にも細胞膜上の受容体と同様の動態制御機構が存在し、それにより局在や密度が変化して、局所的なカルシウム放出が制御されているのではないかと予想した。まず、海馬培養神経細胞を用いて実験を行った所、IP₃R1 が樹状突起において小胞体膜上を側方拡散していること、その動態制御にはアクチン骨格が関与しており、4.1Nタンパク質がIP₃R1 とアクチン骨格のリンカーとして働いていることが明らかになった。次にIP₃R1 からのカルシウム放出がシナプス可塑性の誘導に重要な役割を持っている、小脳プルキンエ細胞に着目した。この実験ではより vivo に近い系であるマウス小脳スライス培養系を用いて、二光子励起顕微鏡下でIP₃R1 の動態観察を行った所、プルキンエ細胞の樹状突起ではIP₃R1 の動態がアクチン骨格依存的に制御されていること、また海馬とは異なり、4.1N タンパク質はリンカーとしては働いていないことが明らかになった。さらに、小胞体膜上のカルシウムポンプである SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase) の拡散はIP₃R1 よりも速く、アクチン骨格による制御は受けていなかった。これより、海馬神経細胞とプルキンエ細胞どちらの細胞においても、アクチン骨格依存的な

IP₃R1 の動態制御機構が存在するが、アクチン骨格とIP₃R1 をつなぐリンカータンパク質は両者の間で異なることが分かった。本研究により、生物は細胞種ごとにリンカータンパク質を使い分け、IP₃R1 の動態を厳密に制御していることが分かった。

2. 研究の目的

私は本研究においてIP₃R1 の動態制御機構の生理的意義を明らかにすることを試みた。シナプス可塑性にはスパイン内のIP₃R1 からの局所的なカルシウム放出が重要であることが分かっている。そこで私はスパインにおけるIP₃R1 の動態に着目した。スパイン内にはアクチン骨格が豊富に存在し、海馬神経細胞では神経活動依存的にアクチン骨格が再編成することが報告されている。これより私は、「小脳プルキンエ細胞において神経活動依存的にスパイン内でアクチン骨格が増え、それに伴いIP₃R1 の動態が制限されスパイン内IP₃R1 密度が増えることにより、局所的カルシウム放出が引き起こされる」という新しい仮説を着想した。本研究では、プルキンエ細胞のスパインにおけるIP₃R1 の動態と、それが神経活動依存的に変化するか解析した。

3. 研究の方法

本研究ではマウス小脳スライス培養系を用いて、蛍光タンパク質を融合したIP₃R1 を発現させ、二光子励起顕微鏡によるリアルタイムイメージングにより、その動態を観察した。

以下に研究方法の詳細を述べる。

生後 14 日から 16 日目の ICR マウスから小脳を取り出し、ビブラトームを用いて、厚さ 250 μm の小脳スライスを作製する。小脳スライスはミリセルと呼ばれるナイロンメッシュの上で培養する。次に蛍光タンパク質を融合したIP₃R1 のプラスミドを付着させた金粒子を用意し、これを遺伝子銃の弾とする。この弾を遺伝子銃を用いて、小脳スライスに撃ち込み、細胞へIP₃R1 遺伝子をトランスフェクションする。弾を撃ち込む際は、ヘリウムガスを使い、ガスの圧は 100 psi に固定した。このスライスを 33 度、5% 二酸化炭素のインキュベーターで 3 日間培養する。発現した蛍光タンパク質を融合したIP₃R1 の動態は、二光子励起顕微鏡を用いて、

蛍光退色回復法 (FRAP法) により観察した。観察する際、小脳スライスには 95%酸素、5%二酸化炭素の混合ガスを通した脳脊髄液中におき、観察中はずっと還流を続けた。また脳脊髄液は 34.5 度を保った。

以上の方法により、マウス小脳スライスに GFP-IP₃R1 を発現させた所、プルキンエ細胞のスパインにおいて、GFP-IP₃R1 が発現していることが確認できた(図 1)。

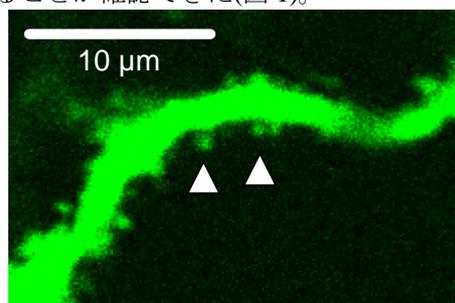


図 1: GFP-IP₃R1 を小脳プルキンエ細胞に発現させ、二光子励起顕微鏡により観察した。樹状突起上に見られる丸い突起がスパイン。白矢印でスパインを示した。

スパインにおける IP₃R1 の動態解析方法

本研究は IP₃R1 の動態観察に FRAP法を用いる。私は先行研究においても、FRAP法を用いて樹状突起における IP₃R1 の動態観察を行ったが、樹状突起は観察中に形態が大きく変わることは無いため IP₃R1 の動態解析は容易であった。これに対し、スパインはダイナミックにその形が変化するので、IP₃R1 の動態の変化を正確に解析するためには、スパインの形状の変化を計算に入れなければならない。しかし、スパインの形状のモニターは困難なため、本研究に先立って、新しい小胞体膜タンパク質の動態解析方法を確立した。これは、異なる波長の蛍光タンパク質を融合した二種類の小胞体膜タンパク質を単一スパイン内で発現させ、これらのタンパク質の拡散の比を求めることにより、スパインの形状の変化をキャンセルし、小胞体膜タンパク質の動態を明らかにするという非常に新しい方法である。IP₃R1 以外の小胞体膜タンパク質として、小胞体膜上のカルシウムポンプである SERCA を用い、これに赤色蛍光タンパク質を融合した SERCA を作成し、GFP-IP₃R1 と同時に発現させ、二種類の小胞体膜タンパク

質の拡散の比を求めた。

4. 研究成果

(1) スパインにおける IP₃R1 の動態を観察

スパインにおける IP₃R1 の動態を観察するために、異なる波長の蛍光タンパク質を融合した二種類の小胞体膜タンパク質の拡散の比を求めることにした。GFP と波長が重ならない蛍光タンパク質として、赤色蛍光タンパク質を選んだ。赤系の蛍光タンパク質として、DsRed の改変タンパク質が幾つか報告されているが、その中で DsRed2, monomeric RFP, DsRed monomer, dtomato, tdtomato について、二光子励起顕微鏡において観察する場合の、蛍光強度、安定性、さらに各蛍光タンパク質の融合タンパク質を作成した時の aggregation の有無について比較検討した。その結果、tdtomato が最も蛍光強度が強く、二光子励起顕微鏡によってスパインにおける発現を検出することが可能であり、安定性もあった。さらに DsRed2 などに見られた、蛍光タンパク質の aggregation も一切見られなかった。よって、今後の実験では赤系の蛍光タンパクとして全て tdtomato を用いて実験を行うことにした。

SERCA に tdtomato を融合した tdtomato-SERCA を作製した。作製した tdtomato-SERCA はウェスタンブロッティングによって分子量を、また培養細胞に発現させて、小胞体膜上に分布するかを確認した。次に tdtomato-SERCA と GFP-IP₃R1 を同時に発現させる実験を行った。二種類の小胞体膜タンパク質を同時に発現させる場合、IP₃R1 と SERCA では、それぞれの発現効率が異なる。そこで、小脳スライスにトランスフェクションする遺伝子の量比の条件検討を行い、最適条件を決定した。その条件で GFP-IP₃R1 と tdtomato-SERCA を同時に発現させ、二種類の小胞体膜タンパク質の拡散を FRAP法により観察した。図 2 に示すように、GFP-IP₃R1、tdtomato-SERCA 共に退色後に蛍光シグナルが回復してくる様子が観察できた。この蛍光シグナルの回復を数値化し、両者の拡散の比を計算した。

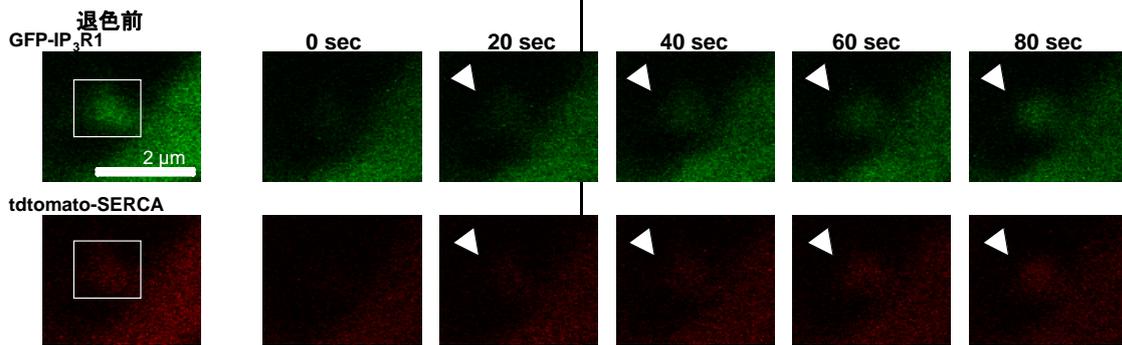


図2：スパインにおける GFP-IP₃R1 と tdtomato-SERCA のFRAP実験。白矢印で示したように、蛍光シグナルが回復してくる様子が観察できる。

GFP-IP₃R1/tdtomato-SERCAの値を求めた所、比は1より小さいことが分かった。つまり、プルキンエ細胞のスパインにおいても樹状突起の結果と同様にGFP-IP₃R1の拡散はtdtomato-SERCAに比べて遅いという結果が得られた。この実験は異なる蛍光タンパク質を用いているので、退色のしやすさなど、蛍光タンパク質の性質の違いがある。今回の実験結果が、蛍光タンパク質の性質の違いによる物ではないことを明らかにするために、融合する蛍光タンパク質を逆にしたGFP-SERCAをtdtomato-IP₃R1の組み合わせで同様の実験を行った。tdtomato-IP₃R1を作製し、tdtomato-SERCAと同様に、ウェスタンブロッティングにより分子量を、また培養細胞に発現させて、小胞体膜上に分布するかを確認した。次に、tdtomato-IP₃R1とGFP-SERCAを同時に発現させ、FRAP実験を行った。その結果、こちらもtdtomato-IP₃R1/GFP-SERCAの値は1よりも小さい、つまりtdtomato-IP₃R1はGFP-SERCAに比べて遅いという結果が得られた。また、対照実験として、全く同じ小胞体膜タンパク質を蛍光タンパク質のみを変えて発現させ、拡散の比を求めた。この実験では、蛍光タンパク質の違いによる差がほとんど無い場合は、その比はほぼ1になることが予想される。GFP-SERCAとtdtomato-SERCAを同時に発現させ、その値を求めた所、拡散の比はほぼ1になった。このGFP-SERCAとtdtomato-SERCAの拡散比のデータと、先ほど求めた、GFP-IP₃R1/tdtomato-SERCAとtdtomato-IP₃R1/GFP-SERCAの値を、マン・ホ

イットニーのU検定により検定すると有意差があることが分かった。これより、プルキンエ細胞のスパインにおけるIP₃R1の拡散は、SERCAに比べて遅いということが明らかになった。

(2) 神経活動依存的にIP₃R1の動態は変化するのか。

次にIP₃R1の動態が神経活動依存的に変化するかどうか明らかにするために、神経伝達物質の一つであるグルタミン酸でプルキンエ細胞を刺激した際の、GFP-IP₃R1の動態を観察した。まず、グルタミン酸による刺激条件を決定するために、カルシウム感受性蛍光タンパク質Inverse-Pericamをプルキンエ細胞に発現させ、グルタミン酸の濃度や刺激時間を変えて、カルシウムシグナルの反応を観察した。この条件検討により、常にカルシウムシグナルの反応が見られ、かつ細胞の膨張等のダメージが起こらない条件を決定した。

次に、GFP-IP₃R1とtdtomato-SERCAを同時に発現させ、グルタミン酸刺激前と刺激後で拡散の比がどう変わるか調べた所、グルタミン酸刺激後、GFP-IP₃R1/tdtomato-SERCAの値は、グルタミン酸刺激前に比べて、有意に減少することが分かった。この実験について、蛍光タンパク質を変えたtdtomato-IP₃R1とGFP-SERCAを同時に発現させ、同様のグルタミン酸刺激実験を行った所、同じ傾向を示すことが分かった。この結果から、グルタミン酸刺激により、IP₃R1の拡散がSERCAに比べてさらに遅くなっている可能性が示唆された。

以上の実験から、プルキンエ細胞のスパインにおいてIP₃R1の動態は神経活動依存的に変化する可能性が示された。

以上、本研究では、プルキンエ細胞のスパインにおけるIP₃R1の動態を明らかにするために

に、IP₃R1 とSERCAを単一スパイン内で発現させ、これらのタンパク質の拡散の比を求めるといふ新しい動態観察方法を確立した。その結果スパインにおいて、IP₃R1 はSERCAよりも拡散が遅いということが明らかになった。

また、グルタミン酸刺激により、神経活動を変化させると、IP₃R1 の動態が刺激依存的に変化することが明らかになった。これは、空間的なカルシウム放出の制御機構にもつながる重要な発見であると言える。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 深津和美、Regulatory mechanism of IP₃ receptor type1 lateral diffusion in neurons、1st European Synapse Meeting、2008年3月26日、フランス ボルドー
- ② 深津和美、IP₃ receptor type1 dynamics in dendrites of Purkinje cells、日本生物物理学会、2008年12月4日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深津 和美 (FUKATSU KAZUMI)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物
研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：60435675