

機関番号：3 2 4 0 9

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 0 2 1 7

研究課題名(和文) シナプス成熟過程におけるイオンチャネル局在化のメカニズム

研究課題名(英文) The regulation mechanisms of subcellular localization of ion channels in developing neurons.

研究代表者

中平 健祐 (NAKAHIRA KENSUKE)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：1 0 2 6 0 0 4 3

研究成果の概要(和文):

シナプスの興奮性を抑制する電位依存性 K⁺チャネルである Kv4.2 は、細胞体と樹状突起に発現し、シナプスの活動に応じてシナプス近傍に集積する。このしくみを明らかにするために蛍光タンパク(EGFP)を付加した変異体を作成して強制発現させ、細胞膜への発現経路を検討した。Kv4.2 結合タンパクがゴルジ体への輸送促進効果を通じて細胞膜への発現を促進していることを示した。

研究成果の概要(英文):

Kv4.2, an A-type K⁺ channel, changed its subcellular localization from soma to the dendrites and synapses during synaptogenesis. In order to investigate the mechanisms of this regulation, we used EGFP-tagged-fusion channels. The fusion proteins were found mainly in ER when cDNA was transfected in culture cells. The Kv4.2 binding proteins, such as KCHIP1, enhanced the surface expression of the channels by promoting translocation from ER to Golgi body.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2 0 0 8 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2 0 0 9 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2 0 1 0 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総 計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：シナプス伝達、電位依存性 K チャネル、小脳顆粒細胞、培養神経細胞

1. 研究開始当初の背景

シナプスが形成され機能的に成熟するためにはさまざまな分子の集積が必要であるが、この集積の制御には、細胞間接触に始まる構造構築の過程と、形成されたシナプスの

活動によるダイナミックな制御がある。近年、シナプス機能の中心を担う受容体/イオンチャネル分子の集積にもシナプスの活動に依存して制御される部分があることが明らかになってきた。例えば、グルタミン酸受容

体の NMDA 受容体分子はシナプスの入力
低下するとシナプスおよび樹状突起へと集積する。一方、興奮性を抑制する電位依存性 K⁺チャンネルの Kv4.2 は逆に、興奮性のシナプス入力によってシナプス近辺の樹状突起へと集積する。これらの知見は、活動依存的なイオンチャンネル局在制御が、シナプスからの入力レベルを一定に保つためのフィードバック制御メカニズムとしてはたらいっている可能性を示している。さらに、このような活動依存的な制御はシナプスの機能的成熟のみならず、回路網形成期におけるシナプスの取捨選択や、成熟シナプスにおけるシナプス可塑性の機構とも関わっている可能性が考えられる。そこで本研究ではイオンチャンネルの局在制御の分子メカニズムを明らかにすることによってシナプス形成と成熟の過程を理解したいと考えた。

2 . 研究の目的

電位依存性 K⁺チャンネル Kv4.2 は一過性 K⁺電流を担うイオンチャンネルで、細胞体から樹状突起に多く発現している。このチャンネルは神経細胞の興奮（脱分極）を抑制することにより、樹状突起の分枝の機能的な区画化、樹状突起への活動電位の逆伝播抑制などの役割を果たしていると考えられている。以前の研究で申請者は、Kv4.2 チャンネルがシナプス形成時に活動依存的に樹状突起とシナプスに局在化することを、小脳顆粒細胞と苔状線維の *in vitro* シナプス形成の実験系をもちいて明らかにした(文献 1)。このことは、Kv4.2 が脱分極の抑制による Ca²⁺流入調節などを通じて、回路網形成期におけるシナプスの取捨選択や、成熟シナプスにおけるシナプス可塑性の機構と関わっている可能性を示唆している。本研究では、培養細胞系を用いてチャンネル分子の局在機構に関与する機能ドメインと、そのドメインに相互作用する

タンパクを明らかにすることを目的とした。

(1) Shibasaki, K., Nakahira, K., Trimmer, JS., Shibata, R., Akita, M., Watanabe, S., Ikenaka, K. (2004) Mossy fibre contact triggers the targeting of Kv4.2 potassium channels to dendrites and synapses in developing cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* 89, 897-907.

3 . 研究の方法

小脳初代培養細胞において Kv4.2 は主に顆粒細胞の細胞体に発現するが軸索には分布しない。さらに、苔状線維（橋核細胞）との共培養によるシナプス形成によってシナプス近傍への集積が観察される (Shibasaki et al. 2004)。この実験系は *in vivo* の状況をよく反映している。そこで、培養細胞をモデル系として、変異型 Kv4.2 の局在を調べるために強制発現させた Kv4.2 の局在を観察する系を作成した。

(1) タグを付加した変異体 Kv4.2 の強制発現と局在

EGFP をそれぞれ N-末端または C-末端（細胞外ドメイン）、もしくは S1-S2 ループ（細胞外ドメイン）に付加した変異体を株化細胞および小脳初代培養細胞に導入し、それらの細胞内局在を抗 GFP 抗体と抗 Kv4.2 抗体を用いた染色によって検出した。

変異体 Kv4.2 の機能的発現解析は、ホールセルパッチクランプ法でおこなった。

(2) Kv4.2 の機能ドメインと結合タンパクの解析

さまざまなイオンチャンネルの例から考えて、Kv4.2 のシナプスへの局在は直接結合するタンパクを介して制御されている可能性が高いと思われるこれまでに Kv4.2 に対しては KChIPs/DREAM/calsenilin、ncs-1 が N-末端側細胞質ドメインに、PSD-95、NIL16 などが C-末端側細胞質ドメインに結合する

ことがわかっている。そこで、結合タンパクを共発現させ、細胞内局在に対する効果を検討した。

結合タンパク KChIPs、ncs-1 の cDNA を用いて強制発現ベクターを作製し、Kv4.2 変異体の局在に対する影響を観察した。細胞内局在は ER マーカーとして抗 KDEL 抗体、ゴルジマーカーとして抗 Golgi58K 抗体をもちいて二重染色をおこなった。

4 . 研究成果

Kv4.2 は、単独で野生型の cDNA から過剰発現させた場合、ほとんどの発現産物が核周辺に蓄積して細胞表面へと移行しないことがわかっている。そのため、Kv4.2 結合タンパクが細胞膜発現、細胞体・樹状突起局在、シナプスへの集積といった正常な発現のために重要な役割を担っているのだろうと考えられた。これらの結合タンパクは N-末端または C-末端の細胞内ドメインと相互作用することが多いため、Kv4.2 タンパクの N-末端、C-末端、中間の細胞外ドメインに EGFP を付加した融合タンパク cDNA をもちいることで局在マーカーおよび立体障害の効果を期待できると考えた。

まず、これらの変異型 Kv4.2 の強制発現と機能に関して株化細胞である COS-1 細胞を用いて検討した。ホールセルパッチクランプ法で機能的発現を検討したところ、野生型類似のチャンネル不活性化を示す A タイプ(一過性)の K 電流が確認された(表 1)。ただし EGFP を N-末端に付加した変異体はチャンネル不活性化の時定数が野生型より大きかった。Kv4.2 の N-末端はチャンネルの不活性化を担っているため、そこに EGFP を付加したことによって活性が阻害されたものと考えられた。

表 1 強制発現させた EGFP 付加型チャンネルの不活性化特性

	野生型 Kv4.2	N-末端 付加型	C-末端 付加型
不活性化 時定数 ()	28.3 ± 2.8	326 ± 5.3	27.9 ± 3.4

COS-1 細胞で強制発現されたチャンネルタンパクは、ER マーカーである抗 KDEL 抗体、およびゴルジ体マーカーである抗 Golgi58K 抗体をもちいた 2 重染色で、主に ER マーカーと分布が一致していた。融合タンパクの細胞内局在は、付加された EGFP の部位による違いはなかった。このことは野生型のタンパクを単独発現させた場合と一致していた。

ここで、Kv4.2 結合たんぱく質である KChIP-1 を変異型 Kv4.2 とともに強制発現させると、チャンネルの分布は主にゴルジ体マーカーと一致した。KChIP-1 と類似のタンパクである NCS-1 でも同様の効果がみられた。L 細胞をもちいても基本的に同じ結果が得られた。これらから COS および L 細胞の発現系では ER からゴルジ体へ移行促進がチャンネルの発現促進の主因になっていると考えられた。また、これら結合タンパクはチャンネルの N-末端側に結合すると考えられているため、N-末端融合タンパクに対しても同じ効果があることは興味深い。N-末端への GFP 付加はチャンネルの A タイプ不活性化の性質を阻害するが、その近傍でおこるタンパク相互作用には影響しないと考えられる。

次に、これらの変異型チャンネルを小脳初代培養細胞に導入して強制発現させた。顆粒細胞の内因性 Kv4.2 とは付加された EGFP 自体の蛍光と、固定後の染色によって区別できる。

その結果、変異型チャネルのうち N-末端付加型と C-末端付加型は主に細胞体、部分的に樹状突起に分布している様子が観察されたが、同時に軸索でも弱い染色が観察された。すなわち、細胞体・樹状突起への局在性が失われていると考えられた。このことは、内因性の結合タンパクによって ER 以降の輸送がおこなわれたことに加えて、 a) 過剰発現によって正常なソーティング機構をバイパスした可能性、 b) 細胞内ドメイン (N-末端または C-末端) への変異によって特異的な局在性が失われた可能性があることを示唆している。しかしながら、これらの初代培養細胞の変異体チャネル発現は、全体の染色強度が非常に低く、定量的な解析をするには至らなかった。この問題は強制発現条件の改良では改善されなかった。融合体 EGFP の発光効率が低い可能性と、立体阻害のために発現量が低くなっている可能性が考えられた。

細胞内・細胞外ドメインにマーカーを導入した変異型チャネルは、細胞内局在メカニズムの解析に有効であった。しかし、小脳初代培養細胞をモデル系として活動依存的な局在変化を調べるツールとしては、実験系の感度が低すぎるために有効とは言えなかった。今後はさらに感度のよいタグ等をもちいた改良をおこなっていきたい。

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1件)

中平健祐 「チャネル分子局在解析のための改変型 Kv4.2 の細胞内発現パターンと機能」第88回日本生理学会 2011年3月28日 パシフィコ横浜(神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中平 健祐 (NAKAHIRA KENSUKE)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10260043