様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　２３　年　６　月　２　日現在

機関番号：６３９０５
研究種目：特定領域研究
研究期間：2006～2010
課題番号：１８０７７００９
研究課題名（和文）　発達/障害による K-Cl 共役担体機能制御と GABA 応答のモーダルシフト

研究課題名（英文）Regulation of K-Cl transporter and modal shift of GABA response in development and recovery.

研究代表者
鍋倉　淳一　（NABEKURA JUNICHI）
生理学研究所・発達生理学研究系・教授
研究者番号：50237583

研究成果の概要（和文）： KCC2 は Cl くみ出しを行う分子であり、神経細胞に特異的に発現している。KCC2 のチロシン脱リン酸化を促進すると、モノマーになり、リピッドラフトへの集積が消失するとともに,細胞内 Cl 濃度の上昇が観察された。塩基配列内のチロシンリン酸化部位の変異を導入した株細胞では、細胞内 Cl 濃度が高く、GABA は脱分極を示した。この結果から、KCC2 は正常ではリピッドラフトにオリゴマーとして集積し、細胞内 Cl をくみ出すことにより、細胞内 Cl 濃度を低く保っている。その結果、GABA による Cl チャネルの開口により陰イオンの細胞内流入が起こり、神経細胞は過分極応用（抑制作用）を示すことが判明した。

研究成果の概要（英文）： The neuronal K(+)-Cl(-) cotransporter (KCC2) is a membrane transport protein that extrudes Cl(-) from neurons and helps maintain low intracellular [Cl(-)] and hyperpolarizing GABAergic synaptic potentials. Depolarizing gamma-aminobutyric acid (GABA) responses in neonatal neurons and following various forms of neuronal injury are associated with reduced levels of KCC2 expression. Mutation to the putative tyrosine phosphorylation site within the long intracellular carboxyl terminus of KCC2(Y1087D) or application of the tyrosine kinase inhibitor genistein shifted the GABA reversal potential (E(GABA)) to more depolarized values, indicating reduced KCC2 function. This was associated with a change in the expression pattern of KCC2 from a punctate distribution to a more uniform distribution, suggesting that functional tyrosine-phosphorylated KCC2 forms clusters in restricted membrane domains. A tyrosine phosphatase inhibitor increased the proportion of KCC2 associated with lipid rafts membrane domains. These results indicate that direct tyrosine phosphorylation of KCC2 results in membrane clusters and functional transport activity. Oxidative stress resulted in a rapid dephosphorylation of KCC2 that preceded the decreases in KCC2 protein or mRNA expression. Dephosphorylation of KCC2 is correlated with a reduction of transport activity and a decrease in [Cl-]i, as well as a reduction in KCC2 surface expression. Manipulation of KCC2 tyrosine phosphorylation resulted in altered neuronal viability in response to in vitro oxidative stress. We propose that neuronal stress induces a rapid loss of tyrosine phosphorylation of KCC2 that results in translocation of the protein and functional loss of transport activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2006 年度	8,600,000	0	8,600,000
2007 年度	8,700,000	0	8,700,000
2008 年度	8,700,000	0	8,700,000
2009 年度	16,000,000	0	16,000,000
2010 年度	16,500,000	0	16,500,000
総　計	58,500,000	0	58,500,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般
キーワード：KCC2, GABA, モーダルシフト

１．研究開始当初の背景

KCC ファミリーの中で、KCC2 は神経細胞に特異的に発現し（Payne 1996）、細胞内外の Cl とK⁺を感知し、神経細胞内 Cl 濃度の決定に最も重要な分子である。近年、Cl チャネルを介する GABA 作動性活動が回路可塑性に深く関わることが認識され、ダイナミックな KCC2 発現調節に注目が集まっている。KCC2 蛋白・機能の発達増加にともなって、GABA は未熟期の細胞興奮性作用(申請者 J. Neurosci, 1999, 2002)による神経回路の構築／再編の促進から、成熟／正常動物における抑制性シグナル伝達物質としての作用へスイッチする。さらに、成熟脳内においても KCC2 発現には部位／神経活動に多様性を示し、KCC2 発現量ーGABA 抑制様式に密な連関が存在する（申請者ら、J Biol Chem 2002）。一方、発達期における KCC2 の発現増加は GABA 自体による神経細胞興奮が必要であることが報告され(Poo, 2001)、Cl イオンセンサーKCC2 の発現制御と、伝達物質センサーである GABA 受容体機能の興奮―抑制ダイナミックスは密接に関連している。

さらに、細胞障害後の数時間以内でおこる急速な KCC2mRNA/蛋白消失によって、細胞内 Cl 濃度の上昇が GABA 抑制の減弱／消失を引き起こし、細胞の過剰興奮を引き起こす(申請者 J Neurosci 2002)。その結果、細胞障害をさらに助長する重要な基盤となっていることが示唆される。一方、回路形成／回復様式に関して再生と発達過程には類似性が存在することから、未熟期(Ben-Ari 2000)と同様、GABA の興奮性が回復期における回路再編を推進している可能性も示唆される。これらのことから、KCC2 発現と神経細胞の生存・成熟応答には GABA の興奮・抑制作用を介し、密接な関連の存在が示唆される。

この KCC2 機能の発現制御に関しては、短時間での変化するダイナミックな$[Cl]_i$ から、局所的かつ短時間で働く KCC2 の細胞内アクセサリー蛋白の存在や、その配列内に PKC 燐酸化やチロシン燐酸化部位が存在するため、これらを介した KCC2 機能の調節機構の存在が期待される

２．研究の目的

本研究の目的は、1）ほとんど未解決である KCC2 の機能発現調節にかかわる因子とその細胞内動態ついて明らかにすることにある。2）障害後における KCC2 の発現消失にかかわる細胞内メカニズム、3）KCC2 消失よる GABA の脱抑制／興奮作用が障害細胞の生存または死に係わるメカニズムを解明する。

３．研究の方法

(1)KCC2 の制御機構と制御関連分子の探索：

神経細胞のダイナミックな[Cl]i 変化から、局所的かつ短時間で働く KCC2 の細胞内機能制御因子の存在が示唆される。

KCC2 の構造解析から、細胞膜内タンパクリン酸化部位を検索し、KCC2の機能を制御するリン酸化の種類のスクリーニングを行う。細胞内アクセサリー蛋白への結合、およびクラスタリングによる機能制御を明らかにする。

(2) KCC2 の細胞内動態の観察

KCC2 は、発達期において蛋白発現と機能が一致していない報告が多く、KCC2 蛋白自体の発現調節以外に、膜表面に存在する KCC2 の量／機能の短時間での変化が予測される。この機能変化として、1）KCC2 自体の細胞膜への短時間での挿入／内在化の存在、2）KCC2 アミノ酸配列にはチロシン燐酸化と PKC 燐酸化部位が存在するため、その燐酸化／脱燐酸化によるものが考えられる。

①KCC2 の細胞膜分布ー細胞質移動の存在の検証。

GFP-KCC2 cDNA を用いて、培養神経細胞に EGFP-KCC2 を強制発現させ、障害/BDNF/ILG 負荷により、GFP-KCC2 の細胞膜ー細胞質内への動態を検討する。

②KCC2 の燐酸化・脱燐酸化による KCC2 機能の real time 観察。

従来の電気生理学的機能評価法では細胞内 Cl 濃度動態を intact に保つことが不可能であったため、KCC2 の燐酸化／脱燐酸化と KCC2 機能的連関の報告はない。これを解

決するために、グラミシジン穿孔パッチ法を適用し、薬理学的に PKC およびチロシンキナーゼを活性化し、KCC2 と細胞内 Cl 濃度変化および GABA 受容体機能連関のリアルタイム記録を行なう。

(3) KCC2 発現制御による GABA 応答のダイナミックスと細胞生存応答

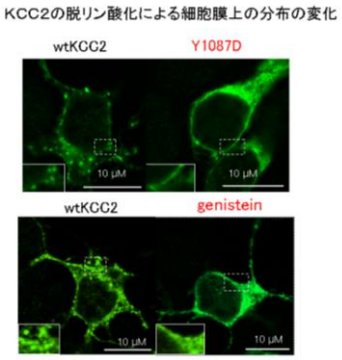
①傷害シグナルによる KCC2発現制御：傷害による KCC2 発現抑制のメカニズムを、各種神経障害モデルを用いて、検討する。

②細胞生存／回復応答： KCC2 発現を過剰発現させた細胞群に各種障害を負荷し、対照群と比較し、急性期細胞障害（細胞生存）と KCC2 の関連を検討する。

4. 研究成果

(1)KCC2 の制御機構と制御関連分子の探索：

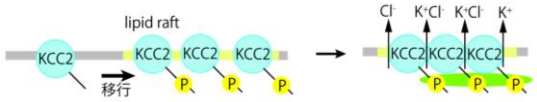
KCC2 のチロシン脱リン酸化を促進すると、モノマーになり、リピッドラフトへの集積が消失するとともに，細胞内 Cl 濃度の上昇が観察された。塩基配列内のチロシンリン酸化部位の変異（Y1087D）を導入した株細胞では、細胞内 Cl 濃度が高く、GABA は脱分極を示した。この結果から、KCC2 は正常ではリピッドラフトにオリゴマーとして集積し、細胞内 Cl をくみ出すことにより、細胞内 Cl 濃度を低く保っている。その結果、GABA による Cl チャネルの開口により陰イオンの細胞内流入が起こり、神経細胞は過分極応用（抑制作用）を示すことが判明した。



(2) KCC2 の細胞内動態の観察

①KCC2 の細胞膜移動の存在の検証。

KCC2のリン酸化―脱リン酸化による細胞膜上の分布の変化は、海馬培養細胞およびKCC2を強制発現させた株細胞において、リン酸化により、細胞膜上のドット状の分布の増加、脱リン酸化により、ドット状分布の消失と均一な分布になることが判明した。このことは、前述の脱リン酸化によるラフト分画からの消失の観察と一致すると考えられる。



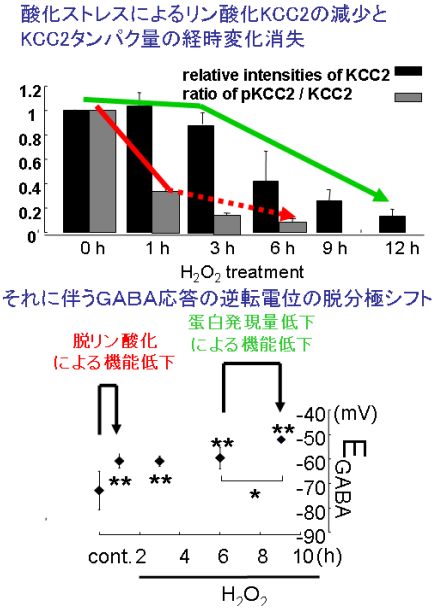
②KCC2 の燐酸化・脱燐酸化による KCC2 機能の real time 観察

KCC2の脱リン酸化によるKCC2の機能消失により、細胞内Cl濃度の変化、その結果としてGABAの過分極から脱分極へのモーダルシフトを検討するために、グラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いて検討を行った。海馬神経細胞において、チロシンリン酸化酵素阻害薬を投与すると、GABAの逆転電位が−70mV 程度から=40mV程度まで、急速にシフトし、脱リン酸化阻害薬の投与中止とともに、速やかに過分極シフトした。

この結果から、KCC2の細胞内Cl濃度くみ出し機構は、KCC2のリン酸化によって短時間でダイナミックに変化することが判明した。

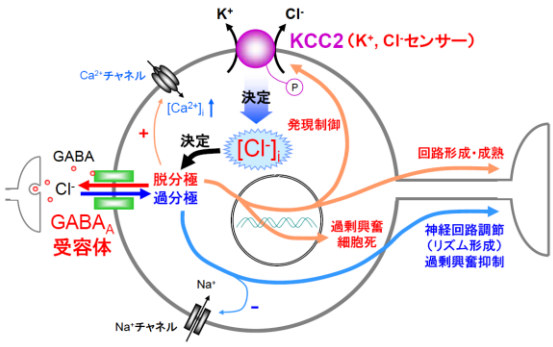
(3) KCC2 発現制御による GABA 応答のダイナミックスと細胞生存応答

傷害による KCC2 発現抑制メカニズムを、障害部位からのシグナルについて、薬理学／分子生物学的方法で検討した結果、酸化ストレス後には KCC2 の急速な脱燐酸化が起こり、細胞膜における均一分布を経て、KCC2 の細胞内への内



在化が起こることを確認した。また、それによる細胞内Clくみ出しの低下と細胞内Clイオンの濃

度の上昇がおこり、GABA の脱分作用が惹起された。その後、KCC2 自体の蛋白発現低下が起こり、細胞内のCl濃度の更なる上昇が起こることにより GABA は興奮性を獲得することが判明した。その結果、障害細胞においてGABA は細胞死を促進することが示唆された。
また、長時間の過剰入力刺激によりNMDA 受容体の活性化、細胞内カルシウムの上昇により、KCC2 の機能低下を引き起こし、GABA 脱分極が引き起こされる。この結果が、posttetanic GABA excitation のメカニズムと考えられる。



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）

〔雑誌論文〕（計２２件、すべて査読有り）

１，Nakahata Y, Miyamoto A, Watanabe M, Moorhouse AJ, Nabekura J, Ishibashi H. Depolarizing shift in the GABA-induced current reversal potential by lidocaine hydrochloride. Brain Research 1345:19-27, 2010.

２，Mizokami A, Tanaka H, Ishibashi H, Umebayashi H, Fukami K, Takenawa T, Nakayama KI, Yokoyama T, Nabekura J, Kanematsu T, Hirata M. GABA(A) receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice. Journal of Neurochemistry 114:302-310, 2010

3, Fujii M, Kenematsu T, Ishibashi H, Fukami K, Takenawa T, Nakayama K, Moss S, Nabekura J, Hirata M. Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of gamma-amino acid type A receptors. Journal of Biological Chemistry 285: 4837-4846, 2010.

４, Inada H, Maejima T, Nakahata Y, Yamaguchi J, Nabekura J, Ishibashi H. Endocannabinoids contribute to metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of GABA release onto hippocampal CA3 pyramidal neurons in an isolated neuron/bouton preparation. Neuroscience 165: 1377-1389, 2010.

５, Ishibashi H, Nakahata Y, Eto K, Nabekura J. Excitation of locus coeruleus noradrenergic neurons by thyrotropin-releasing hormone. Journal of Physiology 587:5709-5722, 2009.

６，Watanabe M, Wake H, Moorhouse A, Nabekura J. Clustering of neuronal K+-Cl- cotransporter in the lipid rafts by tyrosine phosphorylation, Journal of Biological Chemistry 284:27980-27988, 2009

７, Takatsuru Y, Yoshitomo M, Nemoto T, Eto K, Nabekura J. Maternal separation decreases the stability of mushroom spines in adult mice somatosensory cortex. Brain Research 1294:45-51, 2009.

８, Takatsuru Y, Fukumoto D, Yoshitomo M, Nemoto T, Tsukada H, Nabekura J. Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. Journal of Neuroscience 29: 10081-10086, 2009.

９, Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. Journal of Neuroscience 29:3974-3980, 2009.

１０，Ishibashi H, Hirao K, Yamaguchi J, Nabekura J. Inhibition of chloride outward transport by gadolinium in cultured rat spinal cord neurons. Neurotoxicology 30:155-159, 2009.

１１, Kitamura A, Ishibashi H, Watanabe M, Takatsuru Y, Brodwick M, Nabekura J. Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate receptor activation in hippocampal neurons. Neuroscience Research 62:270-277, 2008.

１２, Eto K, Arimura Y, Nabekura J, Noda M, Ishibashi. The effect of zinc on glycinergic inhibitory postsynaptic currents in rat spinal dorsal horn neurons. Brain Research 1161: 11-20, 2007.

１３, Shimada H, Uta D, Nabekura J, Yoshimura M. Involvement of Kv channel subtypes on GABA release in mechanically dissociated neurons from the rat substantia nigra. Brain Research 1141: 74-83, 2007.

１４，Nishimaki T, Jang IS, Ishibashi H, Yamaguchi J, Nabekura J. Reduction of metabotropic glutamate receptor-mediated heterosynaptic inhibition of developing MNTB-LSO inhibitory synapses. European Journal of Neuroscience 26:323-330, 2007.

１５, Ishibashi H, Jang IS, Nabekura J. High potassium-induced facilitation of glycine release from presynaptic terminals on mechanically dissociated rat spinal dorsal horn neurons in the absence of extracellular calcium. Neuroscience. 146:190-201, 2007.

１６, Munakata M, Watanabe M, Otsuki T, Nakama H, Arima K, Itoh M, Nabekura J, Iinuma K, Tsuchiya S. Altered Distribution of KCC2 in Cortical Dysplasia in Patients with Intractable Epilepsy. Epilepsia. 48:837-844, 2007.

１７, Kanematsu T, Fujii M, Mizokami A, Kittler JT, Nabekura J, Moss SJ & Hirata M. Phospholipase C-related inactive protein is implicated inthe constitutive internalization of GABAA receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex. Journal of Neurochemistry 101: 898-905, 2007.

１８, Mizokami A, Kanematsu Ti, Ishibashi H, Yamaguchi T, Tanida I, Takenaka K, Nakayama K, Fukami K, Takenawa T, Kominami E, Moss S, Yamamoto T, Nabekura J, Hirata H. Phosholipase C－Related Inactive Protein is involved in Trafficking of gamma2 Subunit Containing GABAA Receptor to Cell Surface. Journal of Neuroscience, 27: 1692-1701, 2007.

１９, Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K,, Ojika K, Hirata M, Nabekura J. Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress results in functional downregulation. Journal of Neuroscience, 27:1642-1650, 2007.

２０, Mizoguchi T, Kitamura A, Wake, H, Ishibashi H, Watanabe M, Nishimaki T, Nabekura J. BDNF Occludes GABAB Receptor-mediated Inhibition of GABA Release in Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. European Journal of Neuroscience, 24:2135-2144, 2006.

２１, Kanematsu T, Yasunaga A, Mizoguchi Y, Kuratani A, Kittler JT, Jovanovic JN, Takenaka K, Nakayama KI, Fukami K, Takenawa T, Moss SJ, Nabekura J, Hirata M: Modulation of GABAA Receptor Phosphorylation and Membrane Trafficking by Phospholipase C-related Inactive Protein/Protein Phosphatase 1 and 2A Signaling Complex Underlying Brain-derived Neurotrophic Factor-dependent Regulation of GABAergic Inhibition. Journal of Biological Chemistry; 281:22180-22189, 2006.

２２, Matsumoto N Noda E Nabekura J: Run down of GABAergic depolarization during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. Life Science, 79:1021-1026, 2006.

〔学会発表〕（計１１件）

1. 中畑義久、宮本愛喜子、渡部美穂、鍋倉淳一、石橋仁
「リドカインによるK^+-Cl^-共輸送体(KCC2)の機能抑制」
第33回日本神経科学大会、神戸、2010年、9月

2. 鍋倉淳一、渡部美穂
「チロシンリン酸化による神経特異的カリウムークロール共役担体の機能制御」第 87 回日本生理学会大会、盛岡、2010 年、5 月

3. Moorhouse A, Watanabe M, Wake H, Nabekura J
Modulation of KCC2 function by tyrosine phosphorylation. The 30th Annual Meeting of the Australian Neuroscience Society/ the 50th Anniversary Meeting of the Australian Physiological Society, Sydney, 2010, Feburary.

4. Watanabe M, Wake H, Nabekura J
Clustering of neuronal K^+-Cl^- cotransporter in the lipid rafts by tyrosine phosphorylation. 40th NIPS International Symposium-International Joint Symposium : PAT-CVR, Okazaki, Japan, 2009, August.

5. Nabekura J and Watanabe M
Functional regulation of neuronal K-Cl transporter by tyrosine phosphorylation. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, Japan, 2009, August.

6. Watanabe M, Wake H, Nabekura J
Tyrosine phosphorylation regulating neuronal-specific K^+-Cl^- cotransporter, KCC2 in mature hippocampal neurons. 6th Forum of European Neuroscience, Geneve, 2008, July.

7. 渡部美穂、和氣弘明、鍋倉淳一
「カリウム-クロライド共役担体KCC2の機能発現制御」
第31回日本神経科学大会、東京、2008年、7月

8. 渡部美穂、和氣弘明、鍋倉淳一
「GnRH ニューロンにおけるカルシウムオシレーションのメカニズムの解明」
第 85 回日本生理学会大会，東京、2008 年、3 月

9. 鍋倉淳一、渡部美穂
「神経細胞特異的Cl濃度調節分子K-Cl共役担体のリン酸化による機能制御とGABA機能のモーダルシフト」
第30回日本分子生物学年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007年、12月

10. Wake H, Watanabe M, Nabekura J
Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress results in functional downregulation. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, Atlanta, 2006, October.

11. Tanaka N, Watanabe M, Chengzhu Y, Sakuma Y, Kato M
GABA increased the intracellular calcium concentration of GnRH neurons isolated from adult GnRH-EGFP transgenic rats. Sixth International Congress of Neuroendocrinology, Pittsburgh, PA, 2006, June.

〔その他〕
ホームページ：
http://www.nips.ac.jp/hsdev/

６．研究組織

(1)研究代表者

鍋倉　淳一（NABEKURA JUNICHI ）
生理学研究所・発達生理学研究系・教授
研究者番号：50237583

(2)研究分担者

平成１８年度

前島　隆司（Maejima Takashi）
生理学研究所・発達生理学研究系・助教
研究者番号：70399319

渡部　美穂(Watanabe Miho)
生理学研究所・発達生理学研究系・特任助教
研究者番号 10399321

高鶴　裕介（Takatsuru Yusuke）
生理学研究所・発達生理学研究系・特別協力研究員
研究者番号 30446265

(3)連携研究者

平成 19-22 年度

渡部　美穂(Watanabe Miho)
生理学研究所・発達生理学研究系・特任助教
研究者番号 10399321