

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08513

研究課題名(和文)リアノジン受容体による、新規な神経細胞自発発火パターン調節機構の統合的解明

研究課題名(英文) A study of ryanodine receptor-mediated modulation of spontaneous firings in neurons

研究代表者

入江 智彦 (Tomohiko, Irie)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・主任研究官

研究者番号：20546551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,550,000円

研究成果の概要(和文)：複数の活動電位が高頻度で発火する現象はバースト発火とよばれ、ニューロンにおける情報処理において重要な役割を果たすが、これを制御する電流については解明されていない。本研究で背側蝸牛神経核のカートホイール神経細胞で、バースト発火の頻度は二重のCa²⁺ナノドメインにおけるCa²⁺シグナル伝達により制御されることを見出した。二重のナノドメインは、細胞膜のCavチャンネルと小胞体膜のリアノジン受容体とのあいだ、および、リアノジン受容体と細胞膜のBKチャンネルのあいだに形成されていた。活動電位にともなう脱分極によりCavチャンネルが活性化し、これにより流入するCa²⁺がCICRを起こす事がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の活動電位が高頻度で発火する現象はバースト発火とよばれ、ニューロンにおける情報処理において重要な役割を果たすが、これを制御する電流については解明されていない。本研究で聴覚系の抑制性神経細胞で、バースト発火の頻度は二重のCa²⁺ナノドメインにおけるCa²⁺シグナル伝達により制御されることを見出した。二重のナノドメインは、細胞膜のCavチャンネルと小胞体膜のリアノジン受容体とのあいだ、および、リアノジン受容体と細胞膜のBKチャンネルのあいだに形成されていた。活動電位にともなう脱分極によりCavチャンネルが活性化し、これにより流入するCa²⁺がCa²⁺誘発性Ca²⁺放出を起こす事がわかった。

研究成果の概要(英文)：Action potentials clustered into high-frequency bursts play distinct roles in neural computations. However, little is known about ionic currents that control the duration and probability of these bursts. We found that, in cartwheel inhibitory interneurons of the dorsal cochlear nucleus, the likelihood of bursts and the interval between their spikelets were controlled by Ca²⁺ acting across two nanodomains, one between plasma membrane P/Q Ca²⁺ channels and ER ryanodine receptors and another between ryanodine receptors and large-conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels. Each spike triggered CICR from the ER immediately beneath somatic, but not axonal or dendritic, plasma membrane. Moreover, immunolabeling demonstrated close apposition of ryanodine receptors and BK channels. Double-nanodomain coupling between somatic plasma membrane and hypolemmal ER cisterns provides a unique mechanism for rapid control of action potentials on the millisecond timescale.

研究分野：神経生理学

キーワード：リアノジン受容体 CICR BKチャンネル バースト発火

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経細胞の多くは自発発火を示し、これは中枢パターン発生など重要な生理機能を担う。しかし、自発発火パターンに対して、小胞体膜上のリアノジン受容体による Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (CICR) が果たす役割は全く不明である。

2. 研究の目的

蝸牛神経核に存在する抑制性神経細胞は *in vitro* でも自発発火を示すので、これをモデル神経細胞とし、CICR による自発発火パターンの調節メカニズムを解明する事が本研究の目的である。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスから蝸牛神経核を含む脳スライスを作成し、パッチクランプ法により抑制性神経細胞から記録を行い、自発発火活動に対するリアノジン受容体の阻害剤を投与し、その後も記録を行った。また、活動電位発生に伴い後過分極が観察された時にもリアノジン受容体阻害剤や K チャネル阻害剤を投与し、記録を行った。

4. 研究成果

2016 年度は文献調査、更には蝸牛神経核におけるリアノジン受容体の発現の有無を遺伝子発現データベースサーチにより行なった。データ解析の結果、自発発火パターンの変化が有意に生じていることが明らかになった。また、リアノジン受容体阻害剤存在下では後過分極が変化すること、更には、この変化は Ca^{2+} 活性化型 K チャネルが関与していることが分かった。データベースサーチの結果、リアノジン受容体のうち、蝸牛神経核には RyR1 が豊富に発現している事が分かった。

2017 年度は、生後 16~24 日齢のマウスを用いて脳幹新鮮スライス標本を作製し、この蝸牛神経核に存在する神経細胞からパッチクランプ記録を行い、リアノジン受容体の阻害剤であるルテニウムレッドが CICR で誘発される電流を抑制するか否か、更には CICR で誘発される K 電流に SK チャネルの活性化による成分が含まれているか否かを SK チャネル特異的な阻害剤アパミンを用いて検討した。これらのデータと昨年度以前のデータを解析した結果は論文投稿の後、米国の神経科学雑誌 *Neuron* に受理された。

2018 年度は、CICR により調節を受ける BK チャネルの生物物理学的特性を解析する事を試みた。シングルチャンネルレベルで BK チャネルを通して流れる電流を記録する為に、whole-cell patch clamp 法の変法である nucleated patch clamp 法を用いた。Nucleated patch 法により、細胞膜の一部のみを神経細胞全体から抜き出す事で、記録対象の BK チャネルの数が少なくなるようにした。その後、細胞膜に脱分極パルスを与えて BK チャネルが活性化するようにしたが、想定に反して BK 電流が殆ど観察されなくなった。原因として考えられる事は、細胞膜の一部を細胞体から抜き出す過程で、リアノジン受容体が存在する小胞体と細胞膜で形成される構造が壊れてしまった可能性が考えられる。

2019 年度は樹状突起に存在するリアノジン受容体が果たす役割の解明を目指した。蝸牛神経核に存在する神経細胞にはグルタミン酸作動性興奮性シナプスが入力するが、このシナプスで、

depolarization-induced suppression of excitation (DSE)とよばれる短期可塑性現象が生じる事が知られている。DSEの発現には細胞内カルシウムシグナリングが重要であるが、このDSEにおけるリアノジン受容体を介したカルシウム放出(CICR)の役割を新鮮脳スライス標本とパッチクランプ法により検討した。まず、興奮性入力を1Hzの電気刺激により刺激してEPSCを神経細胞から継続的に記録した。細胞体に対して5秒間、10mVからなる強い脱分極を与える事でDSEを誘発した。通常グルコン酸カリウムベースの電極内液を用いた場合、先行報告と同様に脱分極直後にDSEを観察する事が出来た。次に、CICRを阻害するルテニウムレッドを含んだ電極内液を用いて同様のDSE誘発刺激を行った。ルテニウムレッドでDSE誘発時におけるCICRを阻害する事が出来れば、DSE現象が観察されなくなると予測していた。しかしながら、予想に反して、ルテニウムレッド含有電極内液でも、DSEは観察された。また、DSEによるEPSCの変化量もコントロール群とルテニウムレッド群を比較しても優位な差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomohiko Irie, Laurence O. Trussell	4. 巻 96
2. 論文標題 Double-Nanodomain Coupling of Calcium Channels, Ryanodine Receptors, and BK Channels Controls the Generation of Burst Firing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NEURON	6. 最初と最後の頁 856-870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2017.10.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 入江智彦 Laurence O. Trussell	4. 巻 -
2. 論文標題 電位依存性Ca ²⁺ チャネル，リアノジン受容体，電位/Ca ²⁺ 活性化型K ⁺ チャネルからなる二重のCa ²⁺ ナノドメインはニューロンにおいてバースト発火を制御する	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ライフサイエンス 新着論文レビュー	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7875/first.author.2017.141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Irie Tomohiko	4. 巻 122
2. 論文標題 Loose coupling between SK and P/Q-type Ca ²⁺ channels in cartwheel cells of the dorsal cochlear nucleus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1721～1727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jn.00515.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomohiko Irie
2. 発表標題 Intracellular Ca ²⁺ source for SK channels in cartwheel cells of the mouse dorsal cochlear nucleus.
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江 智彦
2. 発表標題 P/Q-タイプCa ²⁺ チャネル、リアノジン受容体、BKチャネルからなる2重Ca ²⁺ ナノドメインにより、バースト発火が調節される
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Irie
2. 発表標題 Loose coupling between SK and P/Q-type Ca ²⁺ channels in cartwheel cells of the dorsal cochlear nucleus
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Irie
2. 発表標題 Loose Coupling Between SK and P/Q-type Ca ²⁺ Channels in Cartwheel Cells of the Dorsal Cochlear Nucleus
3. 学会等名 ARO 43rd annual midwinter meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Irie, Laurence O Trussell
2. 発表標題 Double nanodomain coupling of P/Q-type calcium channels, ryanodine receptors and BK channels controls generation of burst firing
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiko Irie
2. 発表標題 Intracellular Ca ²⁺ source for SK channels in cartwheel cells of the mouse dorsal cochlear nucleus.
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko Irie, Laurence O. Trussell
2. 発表標題 Double nanodomain coupling of calcium channels, ryanodine receptors and BK channels controls generation of burst firing
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiko Irie, Laurence O. Trussell
2. 発表標題 Double nanodomain coupling of calcium channels, ryanodine receptors and BK channels controls generation of burst firing
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ライフサイエンス 新着論文レビュー http://first.lifesciencedb.jp/archives/17579</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	伊藤 哲史 (Ito Tetsufumi) (90334812)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	
研究 協力者	ローレンス トウルツェル (Trussell Laurence)	OHSU・Vollum Institute・Professor	