

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07295

研究課題名(和文) 超解像イメージングと電気生理で解明する、神経でのCa依存性Kチャンネル新規調節機構

研究課題名(英文) A study of K(Ca) channels by using super-resolution fluorescence microscopy

研究代表者

入江 智彦 (Irie, Tomohiko)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SKチャンネルとBKチャンネルは活動電位の調節に役立っている。ほ乳類蝸牛神経核の抑制性神経細胞においては、SKとBKの両方が存在してバースト発火調節に役立っている。申請者のこれまでの研究により、CICRはSKを活性化しないという予想外の結果を得ていた。そこで、SKに対するCa²⁺のソースを同定する為に、マウス脳幹スライス標本にin vitroパッチクランプ法を適応し、薬理実験を行った。その結果、Cavチャンネルのうち、P/QタイプCavの活性化がSKの開口に必須という事がわかると同時に、P/QタイプCavとSKの距離は100ナノメートル以上と比較的離れている事も判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SKチャンネルは神経細胞の活動電位調節に重要な役割を果たしているが、その活性化に必要なCa²⁺ソースには不明な点が残されていた。本研究では、ほ乳類蝸牛神経核の抑制性神経細胞において、SKチャンネルは一般的に言われているCICRにより活性化されるのではなく、P/QタイプCavの活性化が直接SKチャンネルの活性化に関与している事を見いだした。また、P/QタイプCavとSKチャンネルの距離は100ナノメートル以上と比較的離れている事、すなわちCa²⁺マイクロドメインを形成している事も発見した。この成果は細胞内Ca²⁺シグナリングに新たな知見を加えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK) channels and large conductance potential/Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels are present in various neurons in the central nervous system and help regulate action potentials. In inhibitory neurons of the mammalian cochlear nucleus, both SK and BK channels are present and help regulate burst firing. In these cells, BK channels are activated by CICR via ryanodine receptors, but previous studies by the applicant had unexpectedly shown that CICR does not activate SK channels. Therefore, to identify the source of Ca²⁺ to SK channels, we adapted the in vitro patch-clamp technique to mouse brainstem slice preparations and conducted pharmacological experiments using voltage-gated Ca²⁺ (Cav) channel inhibitors. The results showed that activation of P/Q-type Cav channels is essential for SK channel opening, and that the distance between P/Q-type Cav and SK channels is relatively far (>100 nm), i.e., they form a Ca²⁺ microdomain.

研究分野：神経

キーワード：SK チャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} は、ニューロン内のイオンチャネルを直接的または間接的に調節する一般的なセカンドメッセンジャーである。 Ca^{2+} の主要な標的は、多くのニューロンの発火特性を強力に制御する Ca^{2+} 活性化 K^+ (KCa) チャネルである。KCa チャネルは主に 2 つのサブファミリーに分類される：大伝導の電位および Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK) チャネルと小伝導の Ca^{2+} 活性化 K^+ (SK) チャネルである。BK チャネルは、膜電位と細胞内 Ca^{2+} の両方によってゲートされ、0 mV 付近の膜電位で BK チャネルが強固に活性化されるには、高濃度 ($>10 \mu\text{M}$) の細胞内 Ca^{2+} が必要である。BK チャネルとは異なり、SK チャネルは細胞内 Ca^{2+} のみによってゲートされる。SK チャネルのサブユニットは SK1、SK2、SK3 からなる。SK チャネル複合体は、4 つの孔形成サブユニットとカルモジュリンからなるヘテロマーである。各サブユニットは構成的にカルモジュリンと結合し、カルモジュリンは Ca^{2+} センサーとして働く。 Ca^{2+} がカルモジュリンに結合すると、SK チャネル複合体の構造変化が誘導され、チャネルが開く。重要なことは、SK チャネルは低い細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($\sim 0.5 \mu\text{M}$) で活性化されるということである。従って、KCa チャネルの活性化は細胞質 Ca^{2+} の上昇に決定的に依存し、その特異性と上昇速度は、 Ca^{2+} の時空間ドメインである Ca^{2+} ナノドメインとマイクロドメインがどれだけ制限されているかによって決まる。一般に、 Ca^{2+} ナノドメインは、100 nm 未満に広がる Ca^{2+} 濃度の上昇したドメインと、100 nm を超える Ca^{2+} マイクロドメインに対応する。

SK チャネルは脳内で広く発現しており、例えば CA1 海馬錐体ニューロンにおける L 型 Ca^{2+} チャネル、聴覚外有毛細胞における Ca^{2+} 透過性ニコチン性アセチルコリン受容体、CA1 ニューロンの樹状突起スパインにおける N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体、網様核のニューロンにおける T 型 Ca^{2+} チャネル、台形体内側核の発達中の主ニューロンにおけるリアノジン受容体などである。蝸牛の外有毛細胞や CA1 ニューロンの樹状突起棘では、SK チャネルと SK の燃料となる Ca^{2+} チャネルは、 Ca^{2+} ナノドメイン ($<100 \text{ nm}$) にパッケージされていると考えられる。一方、網様核や台形体内側核の神経細胞では、SK も Ca^{2+} チャネルも Ca^{2+} マイクロドメインの距離 (100 nm 以上) に存在すると考えられる。しかし、 Ca^{2+} 発生源と SK チャネルの間の他の結合や、その Ca^{2+} ドメインの種類についてはよくわかっていない。

SK チャネルを発現する数種類のニューロンの中でも、脳幹の聴覚核である哺乳類の背側蝸牛核 (DCN) に存在するカートホイール抑制性介在ニューロンは、BK チャネルと SK チャネルを発現しており、どちらもスパイクバースト発火を形成している。我々は以前、BK チャネル、P/Q 型 Ca^{2+} 、リアノジン受容体のナノドメイン結合が、カートホイール細胞におけるバースト発火の発生を制御していることを示した (Irie and Trussell 2017)。その研究において、我々はまた、リアノジン受容体を介した Ca^{2+} 誘導性 Ca^{2+} 放出 (CICR) は SK の活性化において主要な役割を果たさないが、CICR は他のいくつかのタイプのニューロンにおいて SK の活性化を引き起こすことを示した。この予期せぬ違いは、どのような Ca^{2+} チャネルが SK チャネルを活性化するために Ca^{2+} を供給するのか、そして Ca^{2+} チャネルと SK の間にどのようなタイプの Ca^{2+} ドメインが形成されるのかという疑問を提起している。

2. 研究の目的

上記の疑問に答えるため、全細胞パッチクランプ法を用いて、マウス脳幹の脳スライス標本中のカートホイール細胞から電気生理学的データを記録し、どのような Ca^{2+} チャネルが SK チャネルを活性化するために Ca^{2+} を供給するのか、そして Ca^{2+} チャネルと SK の間にどのようなタイプの Ca^{2+} ドメインが形成されるのかという事を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

DCN を含む脳幹の冠状スライス (厚さ 200 μm) を、前述のように調製した (Irie and Trussell 2017)。簡単に説明すると、成熟に近い 18 ~ 27 日齢の ICR マウスを使用した。脳スライスを得るために使用した特定の動物取り扱いプロトコルは、国立医薬品食品衛生研究所の Institutional Animal Care and Use Committee によって承認された。スライスは、125NaCl、2.1KCl、1.7CaCl₂、1MgSO₄、1.2KH₂PO₄、20NaHCO₃、3HEPES-Na、10 グルコース、3 ミオイノシトール、2 ピルビン酸ナトリウムを含む室温の人工脳脊髄液 (ACSF) 溶液に移し、5%CO₂-95%O₂ でバブリングした。ACSF にはシナプス遮断薬を添加した：10 μM の NBQX、3 μM の MK-801、100 μM のピクロトキシン、1 μM のストリキニーネ。 Ca^{2+} を含まない ACSF をチャンバーに灌流する際、CaCl₂ を除いて等モルの MgSO₄ で置換し、0.25mM の EGTA-Na (NaOH で

pH を 7.4 に調整)を加えた。CdCl₂ および/または NiCl₂ を Ca²⁺チャネルブロッカーとして適用し、これらの場合、沈殿を避けるために ACSF から KH₂PO₄ を除外し、等モルの KCl で置換した。

脳スライスを記録チャンバーに移し、33~34 で ACSF を 2mL/分で灌流した。神経細胞を可視化し、カートウィール細胞を同定し、前述の方法でデータを収集した (Irie and Trussell 2017)。全細胞パッチクランプ記録は、125K-グルコン酸、10KCl、0.1EGTA、2Mg-ATP、3Na₂-ATP、0.3Na₂-GTP、13Tris₂-ホスホクレアチン、および 10HEPES を含む K-グルコン酸ベースの内部溶液を用いて行い、pH は KOH で 7.3 に調整した。パッチピペットはホウケイ酸ガラスのキャピラリー (1B150F-4 ; WPI、フロリダ州サラソタ) を用い、内溶液で満たされたときの抵抗は 2.5-3.5M Ω であった。ボルテージクランプ記録では、直列抵抗を 60-80%補正した (帯域幅 : 3-4kHz)。シナプス遮断薬、0.5 μM テトロドトキシン (TTX)、0.5mM 塩化テトラエチルアンモニウム (TEA)、1mM ペニトレム A (BK チャネル遮断薬) を含む ACSF 中で外向きの尾部電流を記録した。尾部電流は、-80mV の保持電位から 0mV まで 200ms の脱分極を行い、その後再分極することで誘発した。SK チャネルブロッカーであるアパミン (100 nM) を用いて SK 電流を単離した。アパミン非存在下で記録したトレースから、ブロッカー中で 5 分間インキュベートした後に記録したトレースを差し引くことにより、アパミン感受性の SK テール電流を得た。アパミン感受性テール電流のピークは、再分極後 50~100ms の間に記録されたピーク電流と定義した。電流の電荷は、ピーク時からピーク後 2000ms までの電流を積分して求めた。アパミン感受性尾部電流に対する Ca²⁺キレーターの影響を調べる際には、パッチピペットに高 EGTA (2 または 10mM) または BAPTA 含有 K-グルコン酸溶液を満たした。10mM の EGTA 含有 K-グルコン酸溶液は、110K-グルコン酸、10KCl、10EGTA、2Mg-ATP、3Na₂-ATP、0.3Na₂-GTP、13Tris₂-ホスホクレアチン、10HEPES からなり、pH は KOH で 7.3 に調整した。2 mM EGTA 含有溶液では、8 mM EGTA を 10 mM K-グルコン酸で置換した。BAPTA 含有溶液は、115K-グルコン酸、11KCl、10BAPTA、2Mg-ATP、3Na₂-ATP、0.3Na₂-GTP、13Tris₂-ホスホクレアチン、11HEPES からなり、pH は KOH で 7.3 に調整した。これらのキレート剤を用いて、アパミン塗布前に細胞を 5 分間透析した。データは分析され、細胞キャパシタンスは前述のように計算された (Irie et al. 2006; Irie and Trussell 2017)。統計的有意性は、特に断りのない限り、対応のない t 検定を用いて検定した (有意性、P < 0.05)。液体接合電位 (K-グルコン酸ベース、-10 mV) はオフラインで補正した。すべてのデータは、特に断りのない限り、平均値 ± SE で示した。図中の括弧内の数字および本文中の n は細胞数を示す。

4 . 研究成果

カートウィール細胞は P/Q 型、L 型、T 型 Ca²⁺チャネルを発現しているが、N 型は発現していない。このことから、どのようなタイプの VGCC がシグナル伝達に参与しているのかという疑問が生じる。これに答えるため、サブタイプ特異的 VGCC 遮断薬の存在下で外向きのテール電流を誘導し、アパミン感受性のテール電流が観察されるかどうかを調べた。アパミン感受性電流は、Aga-IVA (200nM) 含有 ACSF ではほとんど抑制された、一方、低濃度 (50 μM) の NiCl₂ (T 型および R 型 Ca²⁺チャネル遮断薬) または 20 μM のニモジピン中で記録された電流密度および電荷密度は、通常の ACSF 中のものと有意差はなかった。これらの結果は、SK チャネルの活性化が P/Q 型 Ca²⁺チャネルを介した Ca²⁺流入によって引き起こされることを示している。SK チャネルは、VGCC を含む様々な Ca²⁺ソースと結合する。これらの Ca²⁺ソースとターゲットの対は、Ca²⁺ナノドメインまたは Ca²⁺マイクロドメインのいずれかを構成する可能性がある。これまでのところ、SK チャネルと P/Q 型 Ca²⁺チャネルの間の Ca²⁺ドメインを決定した研究はない。ドメイン距離を実験的に推定するために、Ca²⁺キレーター-BAPTA または EGTA を用いて Ca²⁺シグナル伝達を妨害した。Ca²⁺結合速度は、BAPTA の方が EGTA よりも 40 倍速い。この結合速度の違いは、Ca²⁺がキレートされるまでにどの程度移動する可能性があるかに影響し、その結果、Ca²⁺ソースとターゲット間の距離を知ることができる。全細胞記録は、2mM または 10mM の EGTA または 10mM の BAPTA を含む細胞内溶液を用いて行い、アパミン塗布前に細胞内透析によって細胞内 Ca²⁺をこれらのキレート剤で平衡化した。標準的な 0.1 mM EGTA 含有 K-グルコン酸溶液を用いて記録した SK 電流を対照として用いた。10 mM BAPTA の細胞内透析はアパミン感受性のテール電流をブロックし、カートウィール細胞の SK 活性化には細胞内 Ca²⁺が必要であることが確認された。しかし、アパミン感受性のテール電流は、2mM EGTA 含有溶液を用いた透析によっても有意に減少し、アパミン感受性の電流密度は、0.1mM EGTA で記録された電流密度の 13.5%であった。実際、2mM の EGTA によるブロックは、EGTA を 10mM に増やして達成されたブロックと有意な差はなかった。このように、SK のテール電流はミリモル濃度の EGTA と BAPTA に等しく感受性であったことから、SK チャネルとその Ca²⁺源の結合は、ナノドメインではなく、Ca²⁺マイクロドメイン (>100 nm) 内にあるという結論に至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Azusa, Fujimoto Shinri, Irie Tomohiko, Suzuki Takehito, Miyazaki Yoko, Tanaka Kazuaki, Usami Makoto, Takizawa Tatsuya	4. 巻 589
2. 論文標題 Valproic acid promotes differentiation of adipose tissue-derived stem cells to neuronal cells selectively expressing functional N-type voltage-gated Ca ²⁺ channels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.005	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 -
1. 著者名 Irie Tomohiko, Yamazaki Daiju, Kikura-Hanajiri Ruri	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A potential of methoxpropamine to be a widespread recreational drug: it blocks NMDA receptors and inhibits NMDA receptor-mediated synaptic transmission in a brain preparation of mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forensic Toxicology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11419-021-00571-0	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 -
1. 著者名 Irie Tomohiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Essential Role of Somatic Kv2 Channels in High-Frequency Firing in Cartwheel Cells of the Dorsal Cochlear Nucleus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0515-20.2021	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 -
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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 入江 智彦
2. 発表標題 細胞体に存在するKv2 チャネルは背側蝸牛神経 核カートホイール細胞の高頻度発火に重要である.
3. 学会等名 第68回 中部日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 入江 智彦
2. 発表標題 細胞体に存在するKv2 チャネルは背側蝸牛神経 核カートホイール細胞の高頻度発火に重要である.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022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 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------