

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20700300

研究課題名(和文) 受容体ダイナミクスとカルシウムシグナルによる神経制御機構あるいは病態の解明

研究課題名(英文) Studies on the physiological or pathological neuronal regulation based on the receptor dynamics and calcium signals

研究代表者

坂内 博子 (BANNAI HIROKO)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・研究員

研究者番号：40332340

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：抑制性シナプス カルシウム GABA<sub>A</sub> 受容体 1分子イメージング 量子ドット シナプス可塑性

## 1. 研究計画の概要

シナプス伝達の強さを決めるファクターとして、近年、細胞膜上におけるシナプス内外の受容体のやり取り、すなわち「受容体のダイナミクス」が注目されている。申請者は、GABA<sub>A</sub>受容体のダイナミクスがカルシウムシグナルによって制御されていることを発見した。この現象はシナプス可塑性の誘導や、てんかんの発症に関わる可能性がある。本研究では、GABA<sub>A</sub>受容体ダイナミクス制御に関わる分子とシグナルカスケードを明らかにすることを目的とする。最終的には、神経制御や脳神経疾患を、受容体ダイナミクスという視点から統一的に理解することを目指している。本研究では、以下の3点を行う。

- (1) GABA<sub>A</sub>ダイナミクス制御と抑制性シナプス可塑性の関連性を検討
- (2) IP<sub>3</sub>R1欠損マウスでのてんかん発症がシナプス内GABA<sub>A</sub>Rの不安定化に由来するかを検証
- (3) カルシウムシグナル依存的にGABA<sub>A</sub>Rダイナミクスを制御するタンパク質の同定

## 2. 研究の進捗状況

(1) 海馬初代培養ニューロンのGABA<sub>A</sub>受容体量子ドット1分子イメージング法を用いて細胞膜上のGABA<sub>A</sub>受容体の動きを1分子レベルで追跡したところ、興奮性神経活動の増加に伴って受容体の側方拡散が増加し、シナプス後膜における受容体の安定性が著しく減少していた。このときシナプス内のGABA<sub>A</sub>受容体数は減少するのに対し、細胞膜上のGABA<sub>A</sub>

受容体の総数は変化していなかった。この結果は、神経の興奮が高まると細胞膜上側方拡散が亢進しGABA<sub>A</sub>受容体がシナプス内に留まることができなくなったことにより、シナプス後膜の受容体数が減少することを示唆している。さらに、細胞内カルシウム濃度の上昇によるカルシニューリンの活性化が、受容体の側方拡散を増加させることも証明した。

(2) ロックアウトマウスと特異的な阻害剤を用いた実験から、細胞内小胞体カルシウムチャネルIP<sub>3</sub>受容体からのカルシウム放出がシナプスのGABA<sub>A</sub>受容体を安定化させていることを証明した。

(3) カルシウム信号を受容体の側方拡散へと変換する分子の探索を行った。抑制性シナプス足場タンパク質の関与を検討したところ、このタンパク質はカルシウム信号を最初に感知する役割はなく、逆に受容体の側方拡散変化に応じて安定性を変化させていることが分かった。この結果は、これまで受容体を安定化すると信じられてきた足場タンパク質には、積極的にGABA<sub>A</sub>受容体の側方拡散を制御する能力がないということを示唆する驚くべき結果であり、未同定のカルシウム感受性のGABA<sub>A</sub>受容体安定化因子が存在することを意味している。さらにカルシウム信号依存的なGABA<sub>A</sub>受容体の側方拡散制御を行うリン酸化/脱リン酸化酵素の候補を発見することができた。これにより、複数のカルシウム信号によるGABA<sub>A</sub>受容体の拡散制御機構を統合的に理解する見通しがたった。

### 3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

(理由)

おおむね当初の計画どおりに成果が得られているばかりでなく、実験計画どおりにすすめてうまくいかなかった部分も別のアプローチを取ることで成果が得られているから。

### 4. 今後の研究の推進方策

IP<sub>3</sub>/カルシウムシグナルの下流で働くタンパク質リン酸化酵素で、GABA<sub>A</sub>Rの安定化に関わるものを同定する。また、その酵素と calcineurin が GABA<sub>A</sub>R の動態制御に関して拮抗的に働くかどうかを検討する。具体的には候補リン酸化酵素の阻害剤が IP<sub>3</sub>/カルシウムシグナルの阻害剤 2APB と同じ効果をもたらすかどうか、2APB の効果がリン酸化酵素の強制的な活性化によりレスキューされるか否かを、GABA<sub>A</sub>R1 分子イメージングにより検討する。さらに、発見されたリン酸化酵素が calcineurin と拮抗的に働くかどうかを調べる。最終的には、同じカルシウムというシグナル分子が GABA<sub>A</sub>R のダイナミクスに関して正反対の効果を及ぼす分子機構のモデルを確立する。

### 5. 代表的な研究成果

(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5件)

① Fukatsu K, Bannai H, Inoue T, Mikoshiba K. "Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in Purkinje cells is regulated by calcium and actin filaments." *J Neurochem.* **114**,1720-1733. (2010) 査読有

② Bannai H, Lévi S, Schweizer C, Inoue T, Launey T, Racine V, Sibarita JB, Mikoshiba K, and Triller A. Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABA<sub>A</sub>R diffusion dynamics *Neuron* **62**,670-682. (2009) 査読有

③ Lévi S., Schweizer C., Bannai H., Pascual O., Charrier C., and Triller A. Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers and lateral diffusion. *Neuron* **59**, 261-273. (2008) 査読有

④ 坂内博子 御子柴克彦 “量子ドット1

分子イメージングによる生体膜分子動態の解析” *生体の科学* **61**, 194-200. (2010) 査読無

⑤ 坂内博子 “神経伝達物質受容体の側方拡散が抑制性シナプス伝達を決める” *神経化学* **49**, 25-33. (2010) 査読無

[学会発表] (計8件)

① 坂内博子 “1分子イメージングによるシナプス可塑性の研究”第47回日本生物物理学会年会 2009年11月1日 徳島

② Hiroko Bannai “La dynamique des recepteurs determine la transmission synaptique (受容体ダイナミクスがシナプス伝達を決める)” 第26回日仏科学者の集い 2009年10月17日 東京

③ Hiroko Bannai “Calcium-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABA<sub>A</sub>R diffusion dynamics” Gordon Research Conference on Calcium Signalling 2009年6月22日 Lucca (Italy)

④ 坂内博子 “Regulation of inhibitory synapses revealed by single molecule imaging with quantum dots (量子ドット1分子イメージングによる抑制性シナプス制御機構の解明)” 第46回日本生物物理学会年会, 2008年12月3日 福岡

⑤ 坂内博子 “Activity-dependent regulation of GABA<sub>A</sub>R lateral diffusion (神経活動依存的なGABA<sub>A</sub>受容体の側方拡散制御)”第31回日本神経科学学会年会 2008年7月10日 東京

[その他]