

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

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

研究成果の概要（和文）：

シナプス伝達の強さを決めるファクターとして、近年、細胞膜上における受容体の側方拡散が注目されている。本研究では、細胞外からのカルシウム流入とカルシニューリンの活性化により誘導されるGABA_A受容体の側方拡散の促進が、抑制性シナプス可塑性の開始点であることを示した。また、細胞内カルシウム貯蔵庫からのカルシウム放出も、タンパク質リン酸化によりGABA_A受容体の側方拡散を抑制している可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：

The mobility of the neurotransmitter receptors on the plasma membrane is one of the factors determining the efficacy of synaptic transmission. In this study, we found that the increase in GABA_A receptor lateral diffusion, which is induced by Ca²⁺ influx from the extracellular space and subsequent the activation of calcineurin, is the starting point of inhibitory synaptic plasticity. Our result also suggested the possibility that Ca²⁺ release from the intracellular Ca²⁺ store contributes to the inhibition of GABA_A receptor lateral diffusion through protein phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：キーワード： 抑制性シナプス カルシウム GABA_A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. 研究開始当初の背景

シナプス伝達効率が柔軟に変化するシナプス可塑性は、記憶学習の分子基盤であると考えられている。一方シナプス伝達に異常がおこれば、認知症、精神神経疾患、てんかんなどの脳神経疾患を発症する。シナプス伝達は厳密に制御されており、私たちの正常な脳の活動にとって極めて重要な役割を担っているといえる。シナプス伝達の強さが変化する原因の1つは、シナプスにおける神経伝達物質受容体数の増減である。近年シナプス内の受容体の数を決めるファクターとして細胞膜上におけるシナプスへの受容体の出入りすなわち受容体の側方拡散というファクターが注目されている。

研究開始当時、研究代表者は、抑制性神経伝達を担う GABA_A 受容体 (GABA_AR) の側方拡散が細胞内カルシウム濃度の制御に依存していることを示唆する2つの発見をしていた。第1の発見は、海馬ニューロンにおける神経活動とカルシウム依存的に GABA_AR の側方拡散が制御されているということである。興奮性神経活動の増加に伴い細胞内にカルシウムが流入すると、GABA_AR の側方拡散が増加し、シナプスにおける GABA_AR の数が減少することが明らかになった。もう1つの発見は、GABA_AR 側方拡散の増加は「細胞内小胞体カルシウムチャネル IP₃ 受容体(IP₃R)」の活性阻害によっても引き起こされるという結果である。この結果は、IP₃/カルシウムシグナルも GABA_AR の側方拡散を制御していることを示唆している。このように、GABA_AR の側方拡散はカルシウムシグナルによって制御されており、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考えられた。しかしながら、カルシウムが GABA_AR の側方拡散を制御する具体的な分子機構は全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、GABA_AR の側方拡散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した。最終的には、シナプス可塑性といった神経制御や、てんかんなどの脳神経疾患を、「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た。

具体的には、まず、GABA_AR の側方拡散制御が、細胞内へのカルシウム流入を介して抑制性シナプス抑制性シナプス可塑性に関わる可能性を調べた。カルシウム流入という信号を GABA_AR の側方拡散へと変換する過程に関わるタンパク質群の同定を行った。

さらに、IP₃R タイプ1欠損マウスを用いて、IP₃R からのカルシウム放出が GABA_AR 側方拡散を抑制し抑制性シナプスを安定化していることの証明を試みた。さらに、カルシウム流入とカルシウム放出という異なるカルシウム経路が、GABA_AR という同一のターゲットに作用しどのように逆向きの制御を行うか、その仕組みの解明を目指した。

3. 研究の方法

「量子ドット1分子イメージング法」は、受容体1分子の動きやすさ、すなわち拡散係数の変化という形で、細胞膜上の受容体の安定性を直接定量化できるシステムである。この量子ドット1分子イメージングを用いて、本研究では、マウス・ラット海馬初代培養神経細胞シナプスにおける GABA_AR の側方拡散を様々な条件下において解析するというアプローチを行った。また、定量的免疫染色法を用いて、シナプスに集積する GABA_AR や、足場タンパク質の量を推定した。

4. 研究成果

(1) 量子ドット1分子イメージング法を用いて海馬初代培養ニューロンの細胞膜上の GABA_AR 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_AR 数は減少するのに対し、細胞膜上の GABA_AR 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_AR 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 (図1)。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。

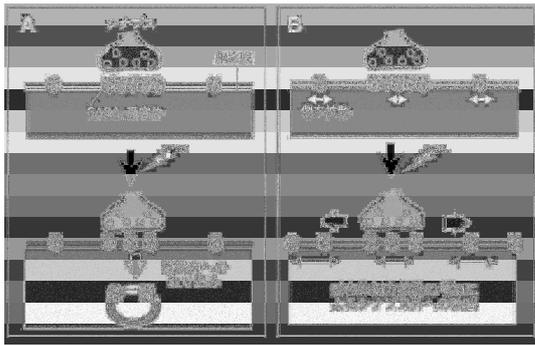


図1：本研究の結果から推測される、抑制性シナプス可塑性の新しい分子機構

(A) 細胞膜に存在する GABA_AR 数が減少する、という従来の考え方。(B) それに対して本研究では、「GABA_AR 側方拡散の増加」という新しい因子が存在することを示した。

(2) カルシウム流入という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。これまで報告されている唯一の抑制性シナプス足場タンパク質 gephyrin の関与を検討したところ、gephyrin に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の状態に応じてクラスターの安定性を変化させていることが分かった。カルシウム流入による GABA_AR と gephyrin のクラスターサイズの減少の経時変化を詳細に解析したところ、GABA_AR の変化が gephyrin より先行することがわかった。また、抗体を用いて GABA_AR の側方拡散を人為的に抑制し動けなくしたとき (図 2 A), カルシウム流入依存性の gephyrin クラスターの減少がおこらなくなった (図 2 B,C)。

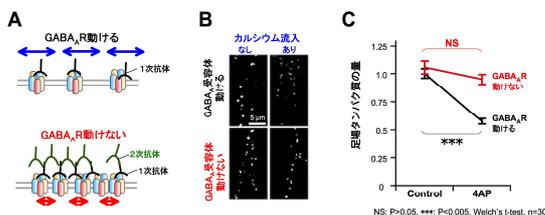


図2：gephyrin クラスターのサイズは GABA_AR の側方拡散に依存する

(A) GABA_AR の側方拡散を人為的に抑制する方法 (B,C) GABA_AR が動けなくなると、カルシウム流入依存性の gephyrin クラスターの減少がおこらなくなる。B:免疫染色のデータ, C: クラスターサイズの定量化の結果。

この結果は、これまで GABA_AR を安定化する

ると信じられてきた gephyrin には、積極的に GABA_AR 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_AR 安定化因子が存在することを意味している。

(3) 細胞内カルシウムシグナル経路としては、上記の細胞外からの「カルシウム流入」に加えて、細胞内カルシウム貯蔵庫からの「カルシウム放出」経路も存在する。カルシウム放出能力が低下している 1 型 IP₃ 受容体ノックアウトマウス由来の海馬神経細胞においては、シナプスにおける GABA_AR の側方拡散が著しく増大しており、シナプスに集積する GABA_AR の数が減少していた。また、野生型ラットの海馬神経細胞において、様々な阻害剤を用いてカルシウム放出を 1 時間阻害したところ、カルシウム流入を阻害した場合と逆に、GABA_AR が不安定化することが示された。この発見は、同じカルシウムでも、細胞外からのカルシウム流入はシナプスの GABA_AR を不安定化させる作用をもち、逆に細胞内からのカルシウム放出は GABA_AR を安定化させる作用を持つことを示唆する結果である。

(4) 一見真逆の効果を持つカルシウム流入経路と細胞内カルシウム放出経路の最終標的が GABA_AR 内の同じアミノ酸である可能性、また calcineurin によるタンパク質脱リン酸化と、カルシウム放出経路の下流でおこるタンパク質リン酸化のバランスにより GABA_AR の側方拡散が制御されている可能性をつきとめた。また、タンパク質のリン酸化にかかわる酵素も特定した。これにより、同じカルシウムというシグナル分子が GABA_AR のダイナミクスに関して正反対の効果および分子機構のモデルを確立する見通しが立った。

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 8 件)

① Niwa F, Bannai H, Arizono M, Fukatsu K, Triller A, Mikoshiba K.

“Gephyrin-independent GABA_AR mobility and clustering during plasticity.” *PLoS ONE* 7: e36148. (2012) 査読有

② Arizono M, Bannai H, Nakamura K, Niwa F, Enomoto M, Matsu-Ura T, Miyamoto A, Sherwood MW, Nakamura T, Mikoshiba K*. “Receptor-selective diffusion barrier enhances sensitivity of astrocytic processes to metabotropic glutamate receptor stimulation.” *Science Signaling* 5: ra27 (2012) 査読有

③ 坂内 博子 “生物物理が切り開く脳科学の未来” *生物物理* 52, 112-113 (2012) 査読有

④ 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

⑤ 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

⑥ 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

⑦ 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_AR diffusion dynamics *Neuron* 62,670-682. (2009) 査読有

⑧ 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

[学会発表] (計6件)

① 坂内 博子 “Membrane molecular dynamics supporting brain functions revealed by single molecule imaging in live cells.” 第49回日本生物物理学会年会 シンポジウム “Visualizing proteins in action-frontiers in biomolecular imaging”, 2011年9月16日 兵庫

② 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

③ 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

④ Hiroko Bannai “Calcium-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABA_AR diffusion dynamics” Gordon Research Conference on Calcium Signalling 2009年6月22日 Lucca (Italy)

⑤ 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

⑥ 坂内博子 “Activity-dependent regulation of GABA_AR lateral diffusion (神経活動依存的なGABA_A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

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

<http://researchmap.jp/read0140718/>

6. 研究組織

(1)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