

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22631

研究課題名（和文）神経可塑性を生むPIP2を介したイオンチャネルの時空間動態制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of spatio-temporal regulation of ion channel dynamics via PIP2 generating neuroplasticity

研究代表者

好岡 大輔 (Yoshioka, Daisuke)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00883084

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：電位依存性カリウムチャネルの一種であるKCNQ2/3は、イノシトールリン脂質PIP2により活性制御されることがよく知られている。高度に偏光した神経細胞では、KCNQ2/3は軸索起始部に局在し、その特徴的な空間分布は神経細胞の興奮性に直接関係する。本研究では、PIP2がチャネルのトラフィック制御に果たす役割を明らかにするため、生きた神経細胞におけるKCNQ3の空間動態を多分子および1分子レベルで定量的に解析した。その結果、PIP2結合能を持たない変異型KCNQ3は、チャネル活性に応じてトラフィック効率が低下することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経におけるKCNQ2/3の空間動態を初めて1分子レベルで検出し、定量解析することに成功した。さらに、KCNQ2/3のトラフィック制御におけるPIP2結合サイトの新たな役割を明らかにした。病理学的にもAISの変容は双極性障害や統合失調症を含む神経精神疾患で一貫して観察される他（Iqbal, Hum. Mol. Genet., 2013）、KCNQ2/3のPIP2結合サイトにおける遺伝子変異はてんかんの発症原因ともなり得る。そのため、本研究で得られた成果はこれら疾患の発症機序の理解を助け、新たな治療・創薬戦略の基盤となることで医学・臨床の分野へも貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The inositol phospholipid PI(4,5)P2 is well known signaling molecules, and regulate a wide variety of membrane proteins. In particular, a kind of the voltage-gated potassium channel, KCNQ2/3, has long been investigated for its regulation by PI(4,5)P2. In highly polarized neurons, KCNQ2/3 asymmetrically localized to axon initial segment (AIS), and the characteristic spatial distribution of KCNQ2/3 is directly related to the neuronal excitability. In this study, to elucidate the role of PI(4,5)P2 in the regulation of channel trafficking, the spatial dynamics of KCNQ3 were quantitatively analyzed in living neurons at multiple- and single-molecule level. As a result, it was revealed that the trafficking efficiency of mutant KCNQ3, which lacks PI(4,5)P2 binding ability, was decreased depending on its channel activity.

研究分野：神経科学

キーワード：1分子イメージング 神経可塑性 軸索起始部（AIS） イオンチャネル PIP2 拡散 エンドサイトーシス エキソサイトーシス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

脳が正常な機能を維持するためには、個々のニューロンが入力に応じて出力を適切に調節する必要があり、この出力は複数種のイオンチャネルが非対称的に集積した軸索起始部 (Axon Initial Segment = AIS) によって決定される。AIS は形態的・機能的な可塑性を持ち、神経活動の変化に応じて柔軟に変化する (Grubb MS, *Nature*, 2010; Kuba H, *Nature*, 2010)。しかしながら、神経におけるチャネルの空間配置を決定する因子は未だ完全には解明されていない。本研究では、チャネルの動態制御因子の候補としてイノシトールリン脂質である PIP2 に着目した。PIP2 は受容体、イオンチャネル、トランスポーターなど、様々な膜タンパク質の活性を制御するシグナル分子として知られている (Hilgemann DW, *Science*, 1996)。さらに、PIP2 はエキソ・エンドサイトーシスといったトラフィック経路を制御することに加え (Chung SH, *J. Biol. Chem.*, 1998; Jost M, *Curr. Biol.*, 1998)、アクチン重合や脂質ラフトとも深く関わり、膜タンパク質の拡散制御にも間接的に寄与する。しかし、チャネルの AIS 局在制御における PIP2 の役割についてはこれまで調べられていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経の AIS におけるイオンチャネルの特徴的な局在形成機構における PIP2 の役割を解明することを目的とする。そのために、これまで粗い時間・空間スケールで断片的にしか捉えられてこなかったチャネルの時空間ダイナミクスを高い分解能でイメージング計測することを試みる。そして、チャネルの局在制御に関わるエキソ・エンドサイトーシス、膜内拡散という主要なトラフィック経路を全て可視化することにより、チャネルの時空間動態を体系的に定量化することを目指す。特に、PIP2-チャネル相互作用を人為的に操作することにより、PIP2 がチャネルの空間動態をどのように制御するのか明らかにする。

## 3. 研究の方法

イオンチャネルの空間ダイナミクスを可視化するために、蛍光標識用タグ (Halo タグ) をチャネルの N 末端に融合させた。HEK293T 細胞または海馬ニューロンに Halo タグ融合チャネルを発現させ、Halo タグ特異的蛍光リガンド (AF660, TMR) で染色することによりチャネルの空間分布を共焦点イメージングした。また、低濃度の Halo タグ特異的蛍光リガンド (TMR) で Halo タグ融合チャネル染色し、全反射照明蛍光 (TIRF) 顕微鏡を用いることでチャネルの空間動態を 1 分子イメージングした。これにより、チャネルのトラフィック過程を 1 分子レベルで解析した。チャネルの活性 (電流密度や電圧感度など) は HEK293T 細胞を用いた全細胞パッチクランプ記録により測定した。

## 4. 研究成果

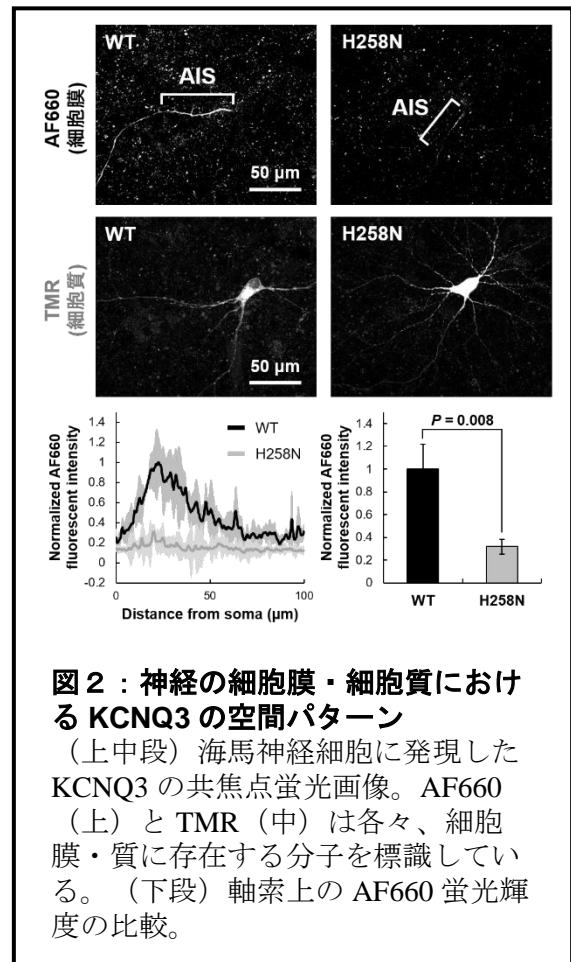
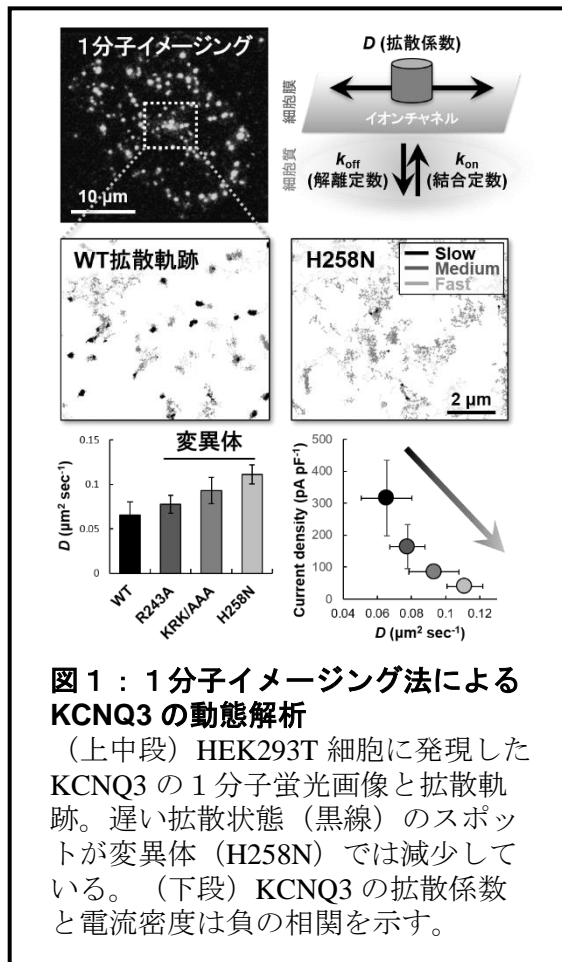
まず、AIS に局在するイオンチャネル (Nav1.6, GABAAR, KCNQ2/3) を対象として Halo タグ融合チャネルの作成を試みた。この内、GABAAR, KCNQ2/3 は Halo タグを融合させ、細胞内で正常に遺伝子発現させることに成功した。特に、KCNQ2/3 は培養神経細胞における発現効率も良く、PIP2 による機能制御に関する知見も多いことから、以降の計測は主に KCNQ2/3 を対象として進めた。

まず、TIRF 顕微鏡を用いて KCNQ2/3 の細胞内動態を 1 分子イメージングできる実験系を確立した。この方法を用いることで、チャネルの膜への結合、膜内拡散、膜からの解離という各反応ステップを 1 分子分解能で検出することに成功した (図 1 上中段)。次に、チャネルの空間動態制御における PIP2 の役割を調べることを試みた。当初の予定では AIS 局在 VSP を作成して、細胞膜の PIP2 レベルを実験的に操作する予定であったが、残念ながらこの方法は困難であった。そこで代替案として、KCNQ3 の PIP2 結合サイトに変異を導入することで遺伝学的に PIP2-チャネル相互作用を操作することを試みた。これにより、チャネル活性 (電流密度や電圧感度など) が様々な変化した変異型 KCNQ3 を多数得られた。予備実験として HEK293T 細胞を用いて、野生型および変異型 KCNQ3 の空間動態を 1 分子イメージングした結果、興味深いことに KCNQ3 の拡散係数がチャネル活性の低下に依存して減少することが分かった (図 1 中下段)。

次に、野生型および変異型 KCNQ3 の神経細胞における空間パターンを共焦点イメージングした。ここでは、細胞膜非透過性 (AF660)、透過性 (TMR) の Halo タグ特異的蛍光リガンドを用いることで細胞表面と細胞質に存在するチャネルをそれぞれ染め分けることに成功した。細胞表面に発現した分子に注目すると、野生型 KCNQ3 は既に知

られているように AIS 領域に集積していたが、PIP2 結合サイトに変異導入した変異型 KCNQ3 は細胞質における遺伝子発現は正常であるにも関わらず、AIS 領域における分子密度が顕著に低下することが明らかとなった (図 2)。さらに、AIS における KCNQ3 表面密度はやはり、そのチャネル活性と相関することも明らかとなった。最後に、この変異型 KCNQ3 の神経細胞における 1 分子動態も解析した結果、少なくともその拡散動態に異常が生じており、AIS 領域に固定化される遅い拡散状態の割合が野生型と比較して有意に減少していることが分かった。

以上のように本研究では、KCNQ2/3 のトラフィック制御における PIP2 結合サイトの新たな役割が多分子および 1 分子レベルで明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 好岡大輔
2. 発表標題 1分子イメージングによるPIP2を介したイオンチャネル動態制御の解析
3. 学会等名 第113 回近畿生理学談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 好岡大輔
2. 発表標題 イノシトールリン脂質により制御されるイオンチャネルの活性・空間動態の相関
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 好岡大輔
2. 発表標題 神経におけるイオンチャネルの非対称的な空間動態のイメージング解析
3. 学会等名 2022年度 文部科学省 学術変革領域研究 【先端モデル動物支援プラットフォーム】 若手支援技術講習会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Yoshioka
2. 発表標題 SINGLE MOLECULE IMAGING REVEALS A RELATIONSHIP BETWEEN PI(4,5)P2 BINDING SITES AND TRAFFICKING REGULATION OF VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNELS
3. 学会等名 67th Biophysical Society Annual Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 好岡大輔
2. 発表標題 PI(4,5)P2結合部位の関連した電位依存性カリウムチャネルのトラフィック制御
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023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

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