

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 18 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830058

研究課題名(和文) GABA作動性シナプス制御機構の解明

研究課題名(英文) GABAergic synaptic regulation mechanism

研究代表者

丹羽 史尋(Fumihiro, Niwa)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50641974

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)：GABA作動性の抑制性シナプス伝達は神経回路における興奮-抑制バランスの制御を通じて適切な脳の制御を行うのに不可欠である。GABA作動性シナプス伝達の恒常性の維持にはIP3受容体を介した小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出が必要である。本プロジェクトで研究代表者はこのIP3受容体の活性が代謝型グルタミン酸受容体の活性によるものであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：GABAergic synaptic transmission regulates brain function by establishing the appropriate excitation-inhibition (E/I) balance in neural circuits. The structure and function of GABAergic synapses are sensitive to destabilization by impinging neurotransmitters. This GABAAR destabilization pathway is counteracted by the maintenance system which required Ca<sup>2+</sup> release from ER via IP3 receptor. In this project, I found that the slow metabotropic glutamate receptor signaling activated IP3 receptor-dependent calcium release and promote GABAAR clustering and GABAergic transmission.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：GABA<sub>A</sub>受容体 IP3受容体 代謝型グルタミン酸受容体 1分子イメージング 量子ドット 抑制性シナプス

### 1. 研究開始当初の背景

正常な脳の機能は神経細胞間の情報伝達が適切に行われることで成立している。シナプスは神経細胞間での情報伝達が行われる場であり、シナプスにおける情報伝達の効率の変化は記憶や学習の分子基盤と考えられている。シナプスには興奮性シナプスと抑制性シナプスの2種類があり、両者からの伝達の絶妙なバランスにより神経細胞の脱分極が制御されている。哺乳類の中樞神経系において速い抑制性シナプス伝達は主に、ガンマアミノ酪酸(GABA)を伝達物質とするGABA<sub>A</sub>受容体によって担われている。このGABA<sub>A</sub>受容体を介したGABA作動性神経伝達の適切な制御は脳の正常な機能や、発生・発達に不可欠である。さらに、この抑制性シナプス伝達の異常が、てんかんや統合失調症、うつ病といった様々な神経疾患の原因に関わっていることも報告されている。そのため、このGABA<sub>A</sub>受容体を介した抑制性シナプス伝達制御の分子機構を明らかにすることは、脳の機能や発生を理解するためだけでなく、神経疾患の新たな治療ターゲットの提示といった観点からも非常に重要である。

### 2. 研究の目的

神経細胞内に局在する神経伝達物質受容体の数は、シナプス伝達の大きさに直接影響する要因である。抑制性シナプスにおいてGABA<sub>A</sub>受容体は多数が集まり、クラスターを形成している。海馬では神経細胞の興奮に応じて数分以内にシナプス内GABA<sub>A</sub>受容体の数が減少し、抑制性シナプス伝達の効率が低下する。このGABA<sub>A</sub>受容体の迅速な減少は細胞膜上のGABA<sub>A</sub>受容体の側方拡散が増大することによって引き起こされていることが近年の研究で明らかになった。このようにGABA<sub>A</sub>受容体は神経伝達に応じてシナプス内での安定性が容易に変化し、シナプスから流出する一方で、興奮性の入力がなくなると再びシナプスに再集積する。このGABA<sub>A</sub>受容体のシナプスへの集積・維持の分子機構について明らかにするのが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

研究代表者は神経細胞における主要な小胞体カルシウムチャンネルであるIP<sub>3</sub>受容体1型がシナプスへのGABA<sub>A</sub>受容体の集積に必

要であることを発見した。そこで、これを手がかりに、その上流、下流の経路の探索を行った。

また、海馬神経細胞の興奮に伴うGABA<sub>A</sub>受容体の側方拡散増大の際にはGABA<sub>A</sub>受容体のγ2サブユニットの脱リン酸化が関与しているという報告があるが、このリン酸化サイトがこのIP<sub>3</sub>受容体1型依存的な抑制性シナプスへのGABA<sub>A</sub>受容体の集積に関与しているのかどうかを検討した。

GABA<sub>A</sub>受容体の動態解析には「量子ドット1分子イメージング」を用いた。この方法を用いることで細胞膜上の受容体1分子の拡散係数、すなわち動きやすさという形で細胞膜上の受容体の安定性を可視化・定量できるシステムである。この方法に定量的な免疫染色や生化学的な定量を併用し、抑制性シナプス内のGABA<sub>A</sub>受容体の量を増減させている仕組みの解明を目指した。

### 4. 研究成果

神経細胞において小胞体からのカルシウム放出を司るIP<sub>3</sub>受容体1型の欠損マウス、或いはIP<sub>3</sub>受容体の阻害剤を用いることでシナプス内のGABA<sub>A</sub>受容体のクラスターが縮小した(図1A.)。また、神経細胞の興奮により、GABA<sub>A</sub>受容体のクラスターが縮小した後にIP<sub>3</sub>受容体の阻害剤を用いたところ、GABA<sub>A</sub>受容体のクラスターの抑制性シナプスへの回復は見られなかった(図1B.)。さらに、GABA<sub>A</sub>受容体のクラスターが縮小する条件ではGABA作動性シナプス伝達の振幅が小さくなることを確認した(図1C.)。以上の結果から、IP<sub>3</sub>受容体による小胞体からのカルシウム放出はGABA<sub>A</sub>受容体のシナプスへの集積・維持を介してGABA作動性シナプス伝達が維持されていることが示唆される。

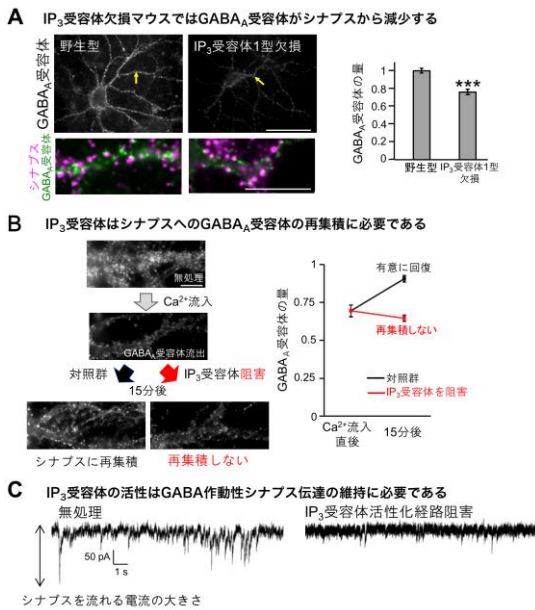


図 1. IP<sub>3</sub>受容体による GABA 作動性シナプス伝達制御

IP<sub>3</sub>受容体は様々な G タンパク共役型受容体によって活性化される。その1種である代謝型グルタミン酸受容体、そしてその下流で活性化されるホスホリパーゼCの阻害は IP<sub>3</sub>受容体の阻害と同様にシナプスからの GABA<sub>A</sub>受容体の流出を引き起こした(図 2A.)。また、代謝型グルタミン酸受容体の阻害は IP<sub>3</sub>受容体の阻害と同様に神経細胞の興奮後のシナプスへの GABA<sub>A</sub>受容体の再集積を完全に阻害した(図 2B.)。これらの結果は GABA<sub>A</sub>受容体のシナプスへの集積・維持に代謝型グルタミン酸受容体、ホスホリパーゼCによる IP<sub>3</sub>受容体の活性化が必要であることを示している(図 2C.)。

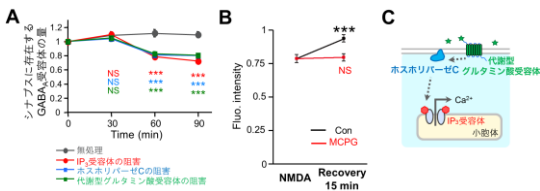


図 2. IP<sub>3</sub>受容体を活性化し GABA 作動性シナプス伝達を制御する経路

IP<sub>3</sub>受容体から放出されたカルシウムは様々なリン酸化/脱リン酸化酵素を活性化する。我々は GABA<sub>A</sub>受容体をリン酸化すると報告されているリン酸化酵素プロテインキナーゼ C の分布が IP<sub>3</sub>受容体に制御されていることを発見した(図 3A.)。カルシウム依存性プロテインキナーゼ C の中でも、GABA<sub>A</sub>受容体と共在しているプロテインキナーゼ Cβ2 とプロテインキナーゼ Cγ の量は IP<sub>3</sub>受容

体の阻害により有意に減少した(図 3B.)。

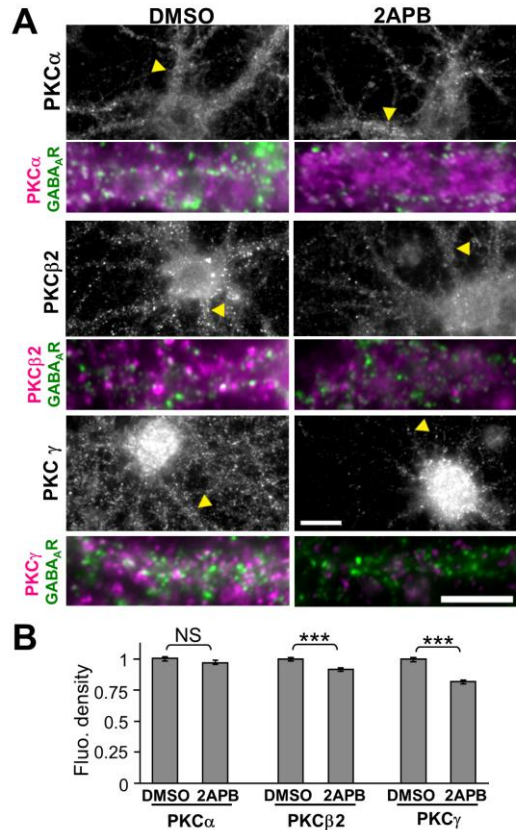


図 3. IP<sub>3</sub>受容体/カルシウム放出はカルシウム依存性プロテインキナーゼ C の分布を制御する

シナプスでの GABA<sub>A</sub>受容体の量は IP<sub>3</sub>受容体の阻害により減少した。しかしながらこの際、細胞内、或いは細胞膜上の GABA<sub>A</sub>受容体の総量は変化しなかった。そこで我々はこのシナプスにおける GABA<sub>A</sub>受容体の量の減少は細胞膜上の GABA<sub>A</sub>受容体の動態の変化によるものと考え、GABA<sub>A</sub>受容体の細胞膜上の側方拡散を解析した。その結果、IP<sub>3</sub>受容体の阻害剤(図 4A-B.)、カルシウム依存性プロテインキナーゼ C の阻害剤(図 4C-D.)のいずれも GABA<sub>A</sub>受容体の側方拡散を増大させ、シナプス滞在時間の減少を引き起こした。またプロテインキナーゼ C の活性化を PMA により誘導することで、IP<sub>3</sub>受容体阻害剤による GABA<sub>A</sub>受容体の側方拡散増大は打ち消された(図 4E-F.)。この結果は IP<sub>3</sub>受容体の下流でプロテインキナーゼ C の活性が GABA<sub>A</sub>受容体のシナプスへの集積・維持を細胞膜上の側方拡散の制御により行っていることを示している。

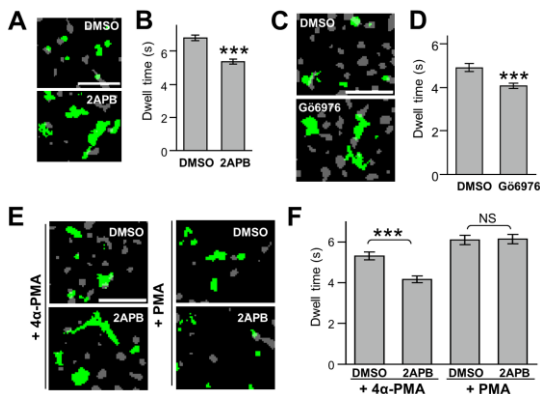


図 4.  $IP_3$  受容体/プロテインキナーゼ C は  $GABA_A$  受容体の側方拡散を制御する

さらに、本研究では、この  $GABA_A$  受容体と相互作用し、代謝型グルタミン酸受容体、 $IP_3$  受容体/プロテインキナーゼ C 依存的に結合を変化させる機構を明らかにするために以前  $GABA_A$  受容体の側方拡散を制御すると報告されている  $GABA_A$  受容体  $\gamma 2$  サブユニットのリン酸化部位に変異を挿入し、その部位のリン酸化への関与を検討した。その結果、 $IP_3$  受容体阻害による  $GABA_A$  受容体の側方拡散の増大は驚くべきことに既知のリン酸化サイトによるものではないことが明らかになった。

本研究で発見した経路はグルタミン酸によって活性化された代謝型グルタミン酸受容体、 $IP_3$  受容体、プロテインキナーゼ C がシナプスへの  $GABA_A$  受容体の集積を引き起こすメカニズムである。同じグルタミン酸に活性化されるイオンチャネル型グルタミン酸受容体 NMDA 受容体の活性化が脱リン酸化酵素カルシニューリンの活性化を通してシナプスからの  $GABA_A$  受容体の散逸を引き起こすことを考えると、同じグルタミン酸、そしてカルシウムというメッセンジャーにより正反対の 2 つの制御が行われ、そのバランスによって抑制性シナプスにおける  $GABA_A$  受容体の安定性が決定されているという非常に興味深い結果である。この結果は、神経細胞の興奮に伴うプレシナプスからのグルタミン酸放出が、細胞内へのカルシウム流入による  $GABA_A$  受容体のシナプスからの一過性の流出を引き起こす一方で、細胞外の少量の余剰のグルタミン酸が  $GABA_A$  受容体のシナプスへの集積・維持に役になっているという効率の良い抑制性シナプス維持機構の存在を示唆している可能性がある。

これらの研究成果により、 $GABA_A$  受容体

の抑制性シナプスへの集積・維持を司る経路が明らかになった。 $GABA_A$  受容体による抑制性シナプス伝達の異常はてんかんを始めとする神経・精神疾患の原因ともなることから、今後さらなる研究の進展により、細胞膜上の受容体動態の制御をターゲットとする新たな創薬ターゲットの提示ができることを期待する。

#### 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)

[論文発表] (計 1 件)

- 1) Bannai H, Niwa F(筆頭共著者), Sherwood M W, Shrivastava A N, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Levi S, Triller A, and Mikoshiba K, "Bidirectional Control of Synaptic  $GABA_{AR}$  Clustering by Glutamate and Calcium" Cell Reports, 査読有, vol.13, 2015 年 12 月 29 日, DOI:10.1016/j.celrep.2015.12.002

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Niwa F, Bannai H, Sherwood M W, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Levi S, Triller A, and Mikoshiba K, "Calcium-dependent competing control of GABA synaptic structure by ionotropic and metabotropic glutamate receptor", 6th Special Conference of the International Society for Neurochemistry – Dynamic Change of Nanostructure in the Brain in Health and Disease – Cutting Edge of the Technical Innovation, PS1-16, 東京大学弥生講堂一条ホール (東京都文京区), (2014 年 9 月 20-22 日)
- 2) Niwa F, Bannai H, Sherwood M W, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Levi S, Triller A, and Mikoshiba K, "Bidirectional Regulation of GABA Synaptic Structure by Intracellular Calcium", 第 52 回日本生物物理学会年会, 1P-225, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), (2014 年 9 月 25-27 日)
- 3) Niwa F, Bannai H, Sherwood M W, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Levi S, Triller A, and Mikoshiba K, "Homeostatic Control of GABA Synaptic Structure by Intracellular

Calcium”, 第 37 回日本神経科学大会  
Neuroscience 2014, S3-C-1-2 &  
P2-030, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), (2014 年 9 月 11-13 日)

- 4) Niwa F, Bannai H, Sherwood M W, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Levi S, Triller A, and Mikoshiba K, “Homeostatic regulation of GABA synapses through the control of receptor diffusion by  $IP_3/Ca^{2+}$  signaling”, Conférences Jacques-Monod “Optical Imaging of Brain Structure and Function of Multiple Spatial Scales”, Poster Session III-5, Station biologique de Roscoff, (Roscoff, Bretagne, France), (2014 年 6 月 11-15 日)
- 5) 丹羽史尋, 「1 分子イメージングが明らかにする GABA 作動性シナプス伝達制御機構」, 平成 25 年度生理学会若手研究者フォーラム, 順天堂大学センチュリータワー13 階南 (東京都文京区), (2013 年 8 月 24 日)
- 6) Niwa F, Bannai H, Sherwood M W, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Levi S, Triller A, and Mikoshiba K, “Regulation of synaptic GABA-A receptor lateral mobility and clustering by  $IP_3/Ca^{2+}$  signaling, Neuro 2013 第 36 回日本神経科学大会 & 第 56 回日本神経化学会大会 & 第 23 回日本神経回路学会大会合同会議, P1-1-35, 国立京都国際会館 (京都府京都市), (2013 年 6 月 20-23 日)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹羽 史尋 (NIWA, Fumihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合  
研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50641974