

論文の内容の要旨

論文題目 **海馬神経細胞における GABA_A 受容体の側方拡散
制御機構**

氏 名 **丹羽 史尋**

緒言

脳における情報伝達は、神経細胞を脱分極に導く興奮性シナプスと脱分極を抑える抑制性シナプスのバランスの上に成り立っている。そのため、神経伝達のシグナルである活動電位を発生させる興奮性シナプスとともに、抑制性シナプスも脳が正常に機能するために重要な役割を担っている。GABA_A受容体(GABA_AR)は、中枢神経系において速い抑制性の神経伝達に関わる神経伝達物質受容体である。シナプス内の神経伝達物質受容体の数は、シナプス伝達効率を決める重要な要素である。海馬神経細胞では、過剰な神経興奮に伴い細胞外からのCa²⁺流入が起きると、シナプス内のGABA_AR数が減少し、神経伝達効率が下がる。GABA_AR数が減少する原因は、細胞膜上でGABA_ARの側方拡散が増大し、シナプスからGABA_ARが出て行き易くなることである。しかしながら、細胞外からのCa²⁺流入がGABA_ARの側方拡散を増大させる分子機構は十分解明されていない。また、Ca²⁺は細胞外から流入するだけでなく、細胞内Ca²⁺貯蔵庫である小胞体からも放出されるが、これがGABA_ARの側方拡散制御に関わるかどうかは分かっていない。そこで私は本研究において、主にラット海馬由来の初代培養神経細胞

(div21-27) を用いて、Ca²⁺流入(第一部)/放出(第二部)に誘導されるGABA_ARの側方拡散制御機構の研究を行った。

第一部では細胞外からのCa²⁺流入に誘導されるGABA_ARの側方拡散の変化と足場タンパク質 gephyrinの関係について調べた。gephyrinは抑制性シナプスでGABA_ARの側方拡散の制御やクラスター形成に関わると報告されている足場タンパク質であり、神経細胞の興奮に伴い、GABA_ARと同様にシナプスから減少する。そこで私は、「神経細胞の興奮に伴う gephyrinの減少が、シナプス内のGABA_ARの側方拡散の増大を引き起こすのではないか」という作業仮説を立て、検証した。第二部では細胞内Ca²⁺貯蔵庫である小胞体からのイノシトール三リン酸受容体(IP₃R)を介したCa²⁺放出がGABA_ARの側方拡散を制御するかどうかを確認し、その制御機構の検討を行った。

結果

第一部 細胞外からのCa²⁺流入によるGABA_ARの側方拡散増大に gephyrinが果たす役割の検討

神経興奮に伴うCa²⁺流入によって、シナプスに局在するGABA_ARと gephyrinの数が減少する。この過程の経時変化を、定量的免疫細胞染色法を用い、クラスター1つ当たりの蛍光強度の変化を指標として観察した。神経細胞の興奮性は4-アミノピリジン(4AP)を用いて誘導した。GABA_ARクラスターの蛍光強度は2.5分の段階で有意に減少しており、2.5分以降の更なる減少は見られなかった。一方、gephyrinクラスターの蛍光強度は7.5分まで減少し続けた。すなわち、Ca²⁺流入に誘導されるGABA_ARのクラスターの縮小が gephyrinのクラスターの縮小に先行する可能性が示された。次に、NMDA刺激によるCa²⁺流入を起し、GABA_ARと gephyrinの蛍光強度の変化を調べた。NMDA刺激はGABA_ARと gephyrin両方に蛍光強度の減少を引き起こすが、刺激開始から1分の段階ではGABA_ARのみに蛍光強度の減少が見られ、gephyrinの蛍光強度は変化しなかった。

神経興奮依存的なGABA_ARの数の減少は、細胞膜上のGABA_ARの側方拡散増大によって引き起こされる。そこで、内在性のGABA_ARの動態を量子ドット-粒子追跡法(QD-SPT)で追跡することにより、4AP刺激によるシナプス内GABA_ARの側方拡散の変化を調べた。その結果、GABA_AR数の変化と同様、側方拡散の指標である拡散係数、confinement sizeとシナプス滞在時間の値はいずれも2.5分以内に側方拡散の有意な増大を示し、それ以降の更なる変化は示さなかった。

上記の結果は「シナプス内GABA_ARの側方拡散の増大及び数の減少が gephyrinクラスターの縮小に先行する」ことを示唆しており、当初の仮説とは逆の結果である。これらの発見からは、「GABA_AR

の側方拡散がポストシナプスのgephyrin数を制御している」という新しい仮説を導くことができた。この仮説を検証するために、私は抗体を用いてGABA_ARを外部から架橋し、物理的にGABA_ARの側方拡散を阻害した。GABA_ARを架橋した神経細胞では、Ca²⁺の流入によって誘導されるべきgephyrinクラスターの縮小が起きないことが明らかになった。以上の結果は、GABA_ARの側方拡散がgephyrinクラスターサイズの決定要因となり得ることを示唆している。

第二部 IP₃Rを介した小胞体からのCa²⁺放出によるGABA_AR側方拡散の制御

小胞体からのCa²⁺放出がGABA_ARの側方拡散制御を制御するかを否か明らかにするために、まず、IP₃R1KO由来の神経細胞において、GABA_ARの側方拡散をQD-SPTで調べた。IP₃R1KO由来の神経細胞では野生型のマウスの細胞に比べてシナプス内GABA_ARの拡散係数、confinement size、シナプス滞在時間のいずれの指標もより活発な側方拡散を示した。次にIP₃RからのCa²⁺放出がGABA_ARの側方拡散に直接作用することを確認するために、IP₃Rの阻害剤である2-aminoethoxydiphenyl borate(2APB)で海馬神経細胞を処理し、GABA_ARの側方拡散を観察した。2APB処理細胞ではIP₃R1KOの細胞と同様、GABA_ARのより活発な側方拡散が観察された。これらの結果はIP₃RからのCa²⁺放出がGABA_ARの側方拡散を抑制することを示している。

次に、IP₃Rの活性阻害により誘導されたGABA_ARの側方拡散の増加が、細胞外からのCa²⁺流入によるGABA_ARの側方拡散の増大と同一のシグナル経路である可能性を調べた。2APB刺激、NMDA刺激及び2APB+NMDAの刺激を細胞に与え、GABA_ARの拡散係数の増大が相加的になるかどうかで、両方の経路が独立かどうかを検討した。その結果、2APBのみ、NMDAのみ、2APB+NMDAの刺激を加えた細胞という3種類の刺激のいずれでも無処理の細胞と比較すると拡散係数の増大が観察されたが、3種類の刺激の違いによる拡散係数の有意な差は見られなかった。この結果は、2APBによるGABA_ARの側方拡散の制御経路がCa²⁺流入によるGABA_ARの側方拡散の制御経路と共通である可能性を示している。さらに、2APBと共にカルシニューリンの阻害剤であるcyclosporin Aを細胞に与えたところ、2APBの投与によって引き起こされる拡散係数の有意な増加は消失した。すなわち、2APBによるGABA_ARの拡散係数の増加には、Ca²⁺流入によるそれと同じく、カルシニューリンの活性化が必要であることが示された。

Ca²⁺流入により活性化されたカルシニューリンによるGABA_A受容体γ2サブユニットのSer327(γ2S327)の脱リン酸化は、GABA_A受容体の側方拡散の増大を引き起こす。γ2S327をリン酸化する酵素はprotein kinase C(PKC)である。Ca²⁺によって活性化されるPKC(α, β, γ)はphosphatidylinositol

4,5-bisphosphate(PIP₂)の下流でdiacyl glycerol(DAG)とIP₃RからのCa²⁺放出によって活性化されるので、IP₃RからのCa²⁺放出もPKCの活性化を介してγ2S327のリン酸化状態の制御に関わる可能性が考えられた。Ca²⁺によって活性化されるPKCの阻害剤であるGö6976で処理した細胞では、GABA_A受容体の側方拡散は2APB処理細胞同様有意に増大した。さらに、PKCの活性化因子であるphorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)の投与により、2APB由来のGABA_ARの拡散係数の有意な増加は消失した。この結果は、IP₃RからのCa²⁺放出がPKCの活性化を介してGABA_ARの側方拡散を抑制していることを示唆している。

結言

本研究の第一部の結果は、「神経興奮による細胞外からのCa²⁺流入に引き起こされたcalcineurinの活性化がGABA_ARの側方拡散の増大を引き起こし、GABA_ARの側方拡散の増大がgephyrinの減少を導く」という一連の流れを示唆している。また、受容体から足場タンパク質という方向のポストシナプス構造安定性制御機構も存在することを直接的に示した。

本研究の第二部の結果は、小胞体からのIP₃Rを介したCa²⁺放出によるPKCの活性化と、Ca²⁺流入によるカルシニューリンの活性化が互いに拮抗する形でγ2S327のリン酸化状態を調節し、GABA_ARの側方拡散を制御していることを示唆している。

第一部で扱った神経興奮依存的なGABA_ARの側方拡散の増大は抑制性シナプスの可塑性や、神経疾患につながる神経の抑制異常の原因とも考えられている。また、第二部で扱ったIP₃RKOマウスはGABA作動性の神経伝達異常によるてんかん様の症状を示す。そのため、今後、今回のCa²⁺流入/放出に誘導される経路の研究をもとにGABA_ARの側方拡散制御の具体的な分子機構を明らかにすることで、てんかんのような神経疾患の治療に繋がることが期待される。