小胞体からのカルシウム放出による GABA 作動性シナプス構造の安定化

丹羽 史尋, 坂内 博子, 御子柴克彦

要約: 細胞膜の構成要素である脂質・タンパク質は流体としての性質を持ち、側方拡散運動により自由に動く。自由拡散運動により脂質・タンパク質は均一に分布すると予想されるが、実際の細胞膜では膜分子の分布は一様ではない。シナプス後膜には神経伝達物質受容体が高密度で局在し、効率の良い神経伝達を可能にしている。いかにして神経細胞は、自由拡散運動に逆らって受容体の密度勾配を形成・維持し、シナプス伝達の制御を行っているのか？ 我々は、ほ乳類の中樞神経系の GABA 作動性シナプスに注目し、「量子ドット 1 分子イメージング」という技術で細胞膜上の受容体 1 分子のふるまいを「見る」ことにより取り組んで来た。神経細胞膜上の GABA_A 受容体の動きを 1 分子レベルで追跡したところ、小胞体からの IP₃ 誘導カルシウム放出 (IICR) が、GABA_A 受容体を動きにくくし、抑制性シナプスの中での GABA_A 受容体の安定性を高めていることが分かった。さらに、GABA_A 受容体の安定性を高めるためには、IP₃ 受容体に加えて代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) とリン酸化酵素プロテインキナーゼ C の活性化が必要であることも明らかになった。これまでの研究で、グルタミン酸は NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) を活性化し、細胞外から細胞内へ大量のカルシウムを流入させることにより、GABA_A 受容体を動きやすくすることが知られていた。一方、今回解明したメカニズムでは、同じグルタミン酸とカルシウムというシグナル物質が、mGluR と IP₃ 受容体という全く異なる受容体を介して、逆に GABA_A 受容体を動きにくくし、安定性を高める働きをしていることが明らかになった。これはグルタミン酸とカルシウムという GABA 作動性シナプス (GABA_A 受容体が機能するシナプス) の制御に関与す

るシグナル物質が、従来知られていた役割とは正反対の役割も担っていることを示す。

1. はじめに

神経細胞はシナプスという構造を介して情報の伝達を行っている。シナプスには情報を受け取る側の神経細胞を興奮させる「興奮性シナプス」と、興奮を抑える「抑制性シナプス」がある。私たちの脳における情報処理は神経細胞の興奮と抑制の絶妙なバランスの上に成り立っている。

このバランスを保つカギとなるのが、抑制性シナプスでの情報の受け取りを担うタンパク質「GABA_A 受容体」を介した情報伝達である。GABA 作動性シナプス (GABA_A 受容体が機能するシナプス) への適切なシグナルの入力 (GABA 作動性シナプス伝達) は脳が正常に機能するのに必要なだけでなく、視覚などの感覚情報の知覚回路が環境や経験によって大きな影響を受ける時期である臨界期の開始にも不可欠である (1)。さらにその異常は、てんかん、統合失調症、自閉症など、さまざまな精神・神経疾患の原因にもなる (2, 3)。そのため、GABA 作動性シナプス伝達の制御メカニズムを明らかにすることは、脳の機能の理解や、精神・神経疾患の原因解明のために重要である。

GABA_A 受容体による GABA 作動性シナプス伝達の強度はシナプス後膜に集積している GABA_A 受容体の数に依存する。通常、1 つのシナプス後膜には数 10 個程度の GABA_A 受容体が常に集まっていることで、効率の良い情報伝達が可能になる。しかしながら、シナプス後膜は受容体などのタンパク質が脂質二重層に浮遊した動的な構造であり、流体としての性質を持つ (4)。実際これまでの研究で、1 個 1 個の GABA_A 受容

体が側方拡散により細胞膜上を動き回りシナプス内外をダイナミックに出入りしていることが分かっている(5)。細胞膜上を絶え間なく動き回っている GABA_A 受容体が、どのようにしてシナプス後膜に一定数集積し続けることができるのか、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。我々は、このシナプス後膜への GABA_A 受容体の集積を維持しているメカニズムを分子レベルで解明することを目指している。本稿では、1分子の動きを直接可視化する手法により得られた最新の結果を紹介する(6)。

2. 小胞体からのカルシウム放出はシナプスにおける GABA_A 受容体の側方拡散を抑制しシナプスにおける安定性を高める

IP₃ 受容体は細胞内のカルシウム貯蔵庫である小胞体からのカルシウム放出を司るチャネルタンパク質である(7)。中でも神経細胞においてカルシウム放出を制御するサブタイプである「IP₃ 受容体 (イノシトール三リン酸受容体) 1 型」欠損 (IP₃R1KO) マウスでは、てんかん様発作やシナプス可塑性の異常など、さまざまな症状を示す(8)。今回我々は半導体ナノクリスタルである量子ドットを標識に用いた 1 分子イメージング法 (図 1A) により、光学顕微鏡を超える解像度で細胞膜上の GABA_A 受容体の側方拡散を解析した(9,10)。その結果、IP₃R1KO マウス由来の海馬神経細胞や IP₃ 受容体の阻害薬を加えたラットの海馬神経細胞

胞では、小胞体 (IP₃ 受容体) からのカルシウム放出が失われることにより、GABA_A 受容体の側方拡散が速くなり、シナプス後膜に滞在する時間が短くなることを発見した (図 1B, C)。代謝型グルタミン酸受容体の阻害によっても同様の結果が得られた (図 1D)。この結果は代謝型グルタミン酸受容体の下流で IP₃ 受容体に担われている小胞体からのカルシウム放出が恒常的に GABA_A 受容体の側方拡散を抑制し、受容体のシナプスにおける安定性を高めていることを示唆している。

3. 小胞体からのカルシウム放出は GABA_A 受容体のシナプスへの集積と GABA 作動性シナプス伝達の維持に必要

蛍光抗体法を用いて、IP₃R1KO マウスと野生型マウスの海馬から作製した培養神経細胞のシナプス後膜に存在する GABA_A 受容体を調べたところ、遺伝子欠損マウスの培養神経細胞では野生型と比べて、GABA_A 受容体の数が 75% 程度に減少していた (図 2A)。また、野生型ラット海馬の培養神経細胞において、代謝型グルタミン酸受容体、ホスホリパーゼ C、IP₃ 受容体に対する各阻害薬を用いて小胞体からのカルシウム放出を阻害したところ、いずれにおいてもシナプス後膜の GABA_A 受容体の数が減少した (図 2B)。これらの結果はカルシウム放出の喪失による GABA_A 受容体の側方拡散増大がシナプス後膜からの GABA_A 受容体の流出を引き起こしたこと、また代謝型グルタミン酸受

図 1 側方拡散の制御による GABA_A 受容体集積制御

A: 量子ドットで細胞膜上の GABA_A 受容体を 1 分子標識する方法の概略。1 次抗体、ビオチン化 2 次抗体を介してストレプトアビジン融合量子ドットで標識する。GABA_A 受容体は 5 つのサブユニットから構成されているが、その中で 1 つしか存在しない γ2 サブユニットに対する抗体を 1 次抗体として用いることで、受容体と量子ドットを 1:1 で標識する。量子ドットの動きは蛍光顕微鏡で追跡した。B: IP₃ 受容体欠損マウス (IP₃R1KO) と野生型マウス (WT) 由来の海馬培養神経細胞における GABA_A 受容体の動態。薄灰色の領域は量子ドットで標識した GABA_A 受容体が 38.4 秒間に動いた範囲、濃灰色の領域は蛍光色素で標識したシナプス後膜。GABA_A 受容体のシナプス滞在時間は有意に減少した。C, D: ラット由来の海馬培養神経細胞における IP₃ 受容体阻害薬である 2APB 存在下 (C)、或いは代謝型グルタミン酸受容体阻害薬である MCPG 存在下 (D) での GABA_A 受容体の動態。GABA_A 受容体のシナプス滞在時間は有意に減少した。

図2 IICRはGABA作動性シナプス伝達維持に必要である

A: IP₃R1KOの海馬培養神経細胞のGABA_A受容体とシナプス後膜を蛍光抗体法で検出。IP₃R1KOの神経細胞ではGABA_A受容体のシナプス後膜への集積がWTに比べ有意に減少した。B: ラット由来の海馬培養神経細胞において、MCPG、ホスホリパーゼC阻害薬であるU73122、2APBを用いると、いずれもGABA_A受容体のシナプス後膜への集積が有意に減少した。C: MCPGによりGABA作動性シナプス伝達の振幅が減少した。

容体→ホスホリパーゼC→IP₃受容体というシグナル経路がこのGABA_A受容体のシナプスへの集積維持に必要であることを意味している。さらに、シナプスを流れる微小抑制性後シナプス電流のサイズを測ったところ、小胞体からのカルシウム放出の阻害により、微小抑制性後シナプス電流の振幅が減少した。この結果は小胞体からのカルシウム放出によるシナプスでのGABA_A受容体の側方拡散の抑制がGABA作動性シナプス伝達の維持に必要であることを示している(図2C)。

4. GABA_A受容体の側方拡散は拮抗するリン酸化-脱リン酸化酵素によって制御されている

カルシニユリンによるGABA_A受容体γサブユニットの327番目のセリン残基(S327)の脱リン酸化によってGABA_A受容体の側方拡散が促進されることが報告されている(11, 12)。このS327はカルシウム依存型のリン酸化酵素プロテインキナーゼC(PKC)によるリン酸化の標的部位でもある(13)。小胞体からのカルシウム放出を阻害すると、GABA_A受容体の周囲に存在するPKCのサブタイプβ2, γの密度が減少(図3A)することがわかった。この結果から、神経細胞のGABA作動性シナプス周囲でPKCの活性を維持する

ために、IP₃受容体を介したカルシウム放出を必要とする可能性が示された。また、カルシニユリンの阻害とIP₃受容体の阻害を同時に行ったところ、小胞体からのカルシウム放出の喪失に関わらずGABA_A受容体の側方拡散増大が起きなかった(図3B)。この結果より、小胞体からのカルシウム放出阻害時のGABA_A受容体の側方拡散の増大は恒常的な脱リン酸化酵素カルシニユリンの活性によるものであることが示唆された。さらに、カルシウム依存型のPKCを特異的な阻害薬Gö6976によって阻害したところGABA_A受容体のシナプスでの側方拡散は増大した(図3C)。一方で、PKCの作動薬であるPMAはIP₃受容体阻害薬によるGABA_A受容体側方拡散の増大を打ち消した(図3D)。これらの結果より、GABA_A受容体の側方拡散は拮抗するリン酸化(PKC)-脱リン酸化酵素(カルシニユリン)によって制御されていることがわかってきた。代謝型グルタミン酸の活性化に始まるIP₃受容体からのカルシウム放出によるPKCの活性化は、恒常的なカルシニユリン活性に拮抗してGABA_A受容体の側方拡散を抑制し、シナプス後膜への集積を維持する役割を持つ(図4左側)。

図3 GABA_A 受容体の側方拡散を制御する拮抗したリン酸化-脱リン酸化酵素

いずれもラット由来の海馬培養神経細胞を用いている。A：ラット由来の海馬培養神経細胞において 2APB により IP₃ 受容体を阻害した際の PKCβ2 と PKCγ の分布。GABA_A 受容体と共存するこれらの PKC の密度は IP₃ 受容体の阻害薬によって減少した。B：カルシウム阻害薬存在下で 2APB による IP₃ 受容体の阻害も行い、GABA_A 受容体の動態を観察した。2APB により GABA_A 受容体の側方拡散は増大し、シナプス滞在時間は有意に短くなるが、その効果はシクロスポリン A によって打ち消された。C：カルシウム依存性 PKC 阻害薬 Gö6976 存在下で GABA_A 受容体の動態を観察した。Gö6976 により GABA_A 受容体のシナプス滞在時間は有意に短くなった。D：2APB により GABA_A 受容体の側方拡散は増大し、シナプス滞在時間は有意に減少するが、2APB の効果は PKC の作動薬 PMA により打ち消された。

図4 グルタミン酸とカルシウムによる GABA_A 受容体の側方拡散制御

図5 カルシウム放出とカルシウム流入の GABA_A 受容体集積への異なる役割

A~C: NMDA による NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化はシナプスからの GABA_A 受容体の散逸を引き起こす。その後 15 分程度で GABA_A 受容体はシナプスへ再集積するが、再集積は 2APB (B) 或いは MCPG (C) によって阻害された。D~F: NMDA によりカルシウム流入を 3 分間活性化した後、NMDA と代謝型グルタミン酸受容体の作動薬 DHPG を同時に加えても GABA_A 受容体のシナプスへの再集積は起こらなかった。G~I: DHPG によりカルシウム放出を 30 分間活性化した後、NMDA と DHPG を同時に加えると GABA_A 受容体のシナプスからの流出は起こらなかった。

5. 二つの拮抗するカルシウムシグナルによる 巧妙な GABA 作動性シナプス制御

興奮性シナプスから大量にグルタミン酸が放出されると、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) からカルシウム流入がおこる。このカルシウム流入によりカルシニューリンがさらに活性化され GABA_A 受容体の側方拡散の増大を引き起こし、シナプス後膜の GABA_A 受容体数が減少することが報告されている (11, 12) (図 4 右側)。散逸した GABA_A 受容体は NMDA 受容体の活性化が止まると 15 分ほどでシナプス後膜に再集積する (14)。しかし、代謝型グルタミン酸受容体や IP₃ 受容体の阻害薬により小胞体からのカルシウム放出を止めた場合には GABA_A 受容体のシナプスへの再集積は起きなかった (図 5A~C)。この結果は、散逸した GABA_A 受容体がシナプス後膜に再集積するには、代謝型グルタミン酸受容体から始まるシグナル経路の活性化により引き起こされる小胞体から

のカルシウム放出が必要なことを示唆している。この拮抗する二つの経路はどちらもカルシウムをシグナル分子として用いている。我々は、予め NMDA 受容体が活性化されているときは代謝型グルタミン酸受容体によるシナプスへの GABA_A 受容体の再集積は妨げられることを発見した (図 5D~F)。一方で代謝型グルタミン酸受容体があらかじめ活性化されていれば、NMDA 受容体をその後活性化させてもシナプスからの GABA_A 受容体の流出が阻害されることがわかった (図 5G~I)。すなわち、この 2 つのシグナル経路は互いに、先に起こった方がもう片方の経路に優先することが示唆された。

6. おわりに

本研究で我々は代謝型グルタミン酸受容体の活性化が小胞体からのカルシウム放出、PKC の活性化を通して GABA_A 受容体の細胞膜上の側方拡散を抑制し、シナプスに集積させていることを明らかにした。このシ

グナール経路は以前我々が報告した NMDA 受容体、カルシニューリンの活性化により GABA_A 受容体の側方拡散を増大させる経路と拮抗していた。これらを総合すると、グルタミン酸が異なる 2 通りの経路を使い分け GABA_A 受容体の側方拡散を増減することにより、細胞膜上の GABA_A 受容体の総量を変えずに GABA 作動性シナプス伝達を巧妙に制御していることを示している。本研究結果はまた、「興奮性」神経伝達物質であるグルタミン酸が、代謝型グルタミン酸受容体/IP₃ 依存性カルシウム放出を介して GABA_A 受容体の側方拡散の抑制とシナプスへの集積を担うことで、「抑制性」GABA 作動性シナプスを安定化させ過剰な神経活動の抑制に寄与しているという、興味深い恒常性制御のモデルを提示するものである。

IP₃R1KO マウスは野生型のマウスと比較し、海馬における長期増強の増強などシナプス可塑性の異常を示す(15, 16)。本研究の我々の発見は代謝型グルタミン酸受容体/IP₃ 受容体の活性が失われることで GABA 作動性シナプス伝達が減弱することを示しており、これによる抑制の減少がシナプス可塑性へ影響を及ぼしている可能性がある。この詳細な検討は今後の課題である。

興奮と抑制の精密なバランス制御は GABA 作動性のシナプス伝達に依存しており、その均衡が崩れるとてんかんを始めとする様々な脳神経疾患の原因ともなる。例えば、興奮性シナプスの過剰な興奮によってシナプス後膜から GABA_A 受容体が散逸することは、てんかん重積症状(17) や全般てんかん熱性けいれんプラスの分子機序(18) の 1 つと考えられている。我々は代謝型グルタミン酸受容体経路を予め活性化しておくことで、シナプス後膜からの GABA_A 受容体の散逸を防げることを確認した。今後の研究の進展により

GABA_A 受容体の側方拡散制御の分子メカニズムを解明するとともに、てんかんや、GABA 作動性シナプス伝達の異常が一因として考えられている統合失調症・自閉症など、さまざまな精神・神経疾患への「GABA_A 受容体の集散制御因子」という新たな治療標的の提示が可能となるかもしれない。

謝辞：本研究は、Dr. Antoine Triller, Dr. Amulya N Shrivastava (パリ高等師範学校), Dr. Sabine Lévi (INSERM), Dr. Mark W Sherwod, 有蘭美沙博士, 宮本章歳博士, 杉浦琴美技術補佐員 (理研 BSI) との共同で行われた。本編で紹介した研究内容は理化学研究所の基礎科学特別研究員プログラム, 日本学術振興会特別研究員奨励費, 科研費 (20700300, 25830058, 20220007, グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態), 公益財団法人東洋紡バイオテクノロジー研究財団, 公益財団法人加藤記念バイオサイエンス振興財団, 公益財団法人東レ科学振興会, 一般財団法人守谷育英会の助成によって実施したものである。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Hensch TK. Annu Rev Neurosci. 2004;27:549-579.
- 2) Mann EO, et al. Trends Neurosci. 2007;30:343-349.
- 3) Eichler SA, et al. Front Mol Neurosci. 2008;1:2.
- 4) Singer SJ, et al. Science. 1972;175:720-731.
- 5) Triller A, et al. Neuron. 2008;59:359-374.
- 6) Bannai H, et al. Cell Reports. 2015;13:2768-2780.
- 7) Berridge MJ. Nature. 1993;361:315-325.
- 8) Matsumoto M, et al. Nature. 1996;379:168-171.
- 9) Bannai H, et al. Nat Protoc. 2006;1:2628-2634.
- 10) Levi S, et al. Neuron. 2008;59:261-273.
- 11) Bannai H, et al. Neuron. 2009;62:670-682.
- 12) Muir J, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:16679-16684.
- 13) Moss SJ, et al. J Biol Chem. 1992;267:14470-14476.
- 14) Niwa F, et al. PLoS One. 2012;7:e36148.
- 15) Nishiyama M, et al. Nature. 2000;408:584-588.
- 16) Fujii S, et al. Learn Mem. 2000;7:312-320.
- 17) Goodkin HP, et al. J Neurosci. 2005;25:5511-5520.
- 18) Bouthour W, et al. Cereb Cortex. 2011;22:1542-1553.