

## 蛍光を持つ非天然アミノ酸を使用した電位依存性ホスファターゼ VSP の電位依存的な構造変化の検出

<sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科統合生理学, <sup>2</sup>大阪医科大学医学部生理学教室  
坂田宗平<sup>1,2</sup> (岡村康司<sup>1</sup>)

電位依存性ホスファターゼ (VSP) は電位センサー部分と細胞内領域である酵素ドメインで形成されており, 細胞膜が脱分極すると電位センサーが動作して酵素活性を發揮します. 酵素活性は酵素ドメインの立体構造変化が起こることで發揮されますが, 実際に生きた細胞膜上に発現した膜タンパク質, 特に細胞内側の立体構造変化を検出することは技術的な限界があり, これまで VSP のみならず, 他の膜タンパク質でもほとんど報告がありませんでした. 本研究では最近開発された蛍光を持つ非天然アミノ酸 (Anap) を遺伝的にタンパク質のポリペプチド鎖に導入する技術を用いることで, 細胞膜上に発現させた VSP の酵素ドメインに蛍光ラベルを導入し, 膜電位依存的な構造変化を検出することに成功しました. Anap の蛍光シグナルを解析することで, 酵素ドメインは電位センサーの動作に伴い少なくとも数ミリ秒以内に構造変化を起こし, しかも活性中心付近だけでなく酵素ドメインが一体となって動作すること, また

細胞膜と酵素ドメインの FRET を計測することで酵素ドメインと細胞膜との距離は電位センサーが動作しても変化しないことが分かりました. さらには Anap を酵素ドメインの C $\alpha$ 2 loop と呼ばれる部分に導入した時にのみ, 基質の濃度に依存した蛍光変化が観察されました. これらの結果を考え合わせますと, VSP は電位センサーが動作するとまず数ミリ秒以内に酵素ドメインの構造が変化することで基質が活性中心に結合し, その後 C $\alpha$ 2 loop が稼働して酵素活性を發揮すると考えられます. 細胞膜上に発現した VSP が膜電位依存的に酵素活性を發揮する仕組みを, 立体構造変化の面から明らかにした, 初めての研究です.

Sakata S, Jinno Y, Kawanabe A, Okamura Y. Voltage-dependent motion of the catalytic region of voltage-sensing phosphatase monitored by a fluorescent amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, **113** (27) : 7521-7526, 2016.

[図は学会ホームページ <http://physiology.jp/> を参照]

## 睡眠による知覚記憶の固定化の神経回路メカニズム

理化学研究所脳科学総合研究センター行動神経生理学研究チーム 宮本大祐 (村山正宜)

学習した情報は, 学習後に脳内で情報処理されて記憶として固定化されます. 記憶の固定化には局所回路レベルの過程と脳領域間の情報連絡によ

るシステムレベルの過程があると考えられています. しかし, 後者のシステム固定化についてはメカニズムの解明が進んでいません. 当研究室の過

去の報告 (Manita et al., Neuron, 2015) において、大脳新皮質の第二運動野 (M2) と第一体性感覚野 (S1) 間の回路が触覚の知覚に関与することを解明しました。そこで、今回私たちは、M2 や S1 の神経活動と触覚情報に関する記憶の固定化との関係を調べました。M2 や S1 の神経活動を記録すると触覚学習時に活性化した神経細胞がノンレム睡眠時において再活性化していました。そして、M2 から S1 へ睡眠徐波の流れがあることが分かりました (図 A)。そこでノンレム睡眠時に M2 から S1 への回路を光を用いて抑制すると、S1 における記憶再活性化が阻害され、記憶成績が低下しました。反対に、M2 と S1 のノンレム睡眠時の情報連絡を強めるために、M2 と S1 を同期刺激すると記憶を保持している期間が長くなりました (図 B)。また、断眠すると記憶成績が低下します

が、同期刺激を断眠中のマウスに適用すると、通常の睡眠をとったマウスに比べても記憶の保持期間が長くなりました。大脳新皮質は臨床的にも経頭蓋磁気刺激等を用いて非侵襲的に刺激できるため、今回用いた刺激プロトコルを臨床用に改良することで、記憶障害や睡眠障害の治療に応用できると期待されます。

Miyamoto D, Hirai D, Fung CCA, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, Boehringer R, Adaikkan C, Matsubara C, Matsuki N, Fukai T, McHugh TJ, Yamanaka A, Murayama M. Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory. *Science* **352** : 1315–1318, 2016.

[図は学会ホームページ <http://physiology.jp/> を参照]

## SLC12A5 遺伝子の両アレル変異による KCC2 機能の低下は乳児焦点移動性部分発作と発達遅延を引き起こす

<sup>1</sup>浜松医科大学神経生理学講座, <sup>2</sup>浜松医科大学医化学講座  
渡部美穂<sup>1</sup>, 秋田天平<sup>1</sup>, 才津浩智<sup>2</sup> (福田敦夫<sup>1</sup>)

脳機能は神経細胞が作る神経回路の活動により引き起こされますが、神経伝達には興奮性と抑制性があり、お互いに制御し合うことにより情報伝達が正常に行われています。カリウム-クロライド共役担体 (KCC2) はクロライドイオンを細胞外にくみ出すトランスポーターで、細胞内クロライド濃度を低く保つことでγ-アミノ酪酸 (GABA) やグリシンによる抑制性伝達を維持しています。KCC2 が正常に機能しないと、細胞内クロライド濃度が高くなり、GABA やグリシンの作用は脱分極性/興奮性に変化します。今回、乳児焦点移動性部分発作を発症した患者とその家族の遺伝子の全エクソーム解析を行い、父母からそれぞれ異なった変異型 KCC2 遺伝子を受け継ぐ患者 (複合ヘテロ接合体) 4 人が 3 家系で認められました。KCC2 変異体の機能解析を行ったところ、患者はクロ

ライドイオンを細胞外にくみ出す機能が強く低下した変異体とやや低下した変異体の 2 つを持つことがわかりました。KCC2 変異体の細胞膜での発現分布および発現量には変化が認められませんでした。このことから、KCC2 の変異が乳児焦点移動性部分発作の発症に関わる原因遺伝子であり、変異により KCC2 の機能が低下することで GABA やグリシンによる抑制力が低下し、神経回路の興奮性と抑制性のバランスが崩れることがてんかん発症に関わることを示唆されました (図)。野生型 KCC2 と変異体 KCC2 の 2 つを持つ両親はてんかんを発症しておらず、複合ヘテロ接合体でのみ発症することを実験的にはじめて証明しました。

Saitsu H, Watanabe M, Akita T, Ohba C, Sugai K, Ong WP, Shiraiishi H, Yuasa S, Matsumoto H, Beng KT, Saitoh S, Miyatake S, Nakashima M,

Miyake N, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures

and severe developmental delay. Scientific Reports **6** : 30072, 2016.

[図は学会ホームページ <http://physiology.jp/>を参照]

## K<sup>+</sup>チャネルを通るイオン透過におけるナノ空洞の生理的重要性

福井大学学術研究院医学系部門分子生理学分野 炭竈享司 (老木成稔)

K<sup>+</sup>チャネルは生命に必須な膜タンパク質であり、これを介して細胞内外を K<sup>+</sup>イオンが移動することによって神経での伝導が実現されています。したがって、イオンが K<sup>+</sup>チャネルを透過する仕組みを理解することは、生理機能の解明に重要な意義があります。K<sup>+</sup>チャネルのイオンの透過路には、主に二つの部位があります(動画)。一つ目は選択性フィルタと呼ばれる最も細い部分です。二つ目はナノ空洞と呼ばれるやや広い部位で、これは選択性フィルタと細胞内溶液をつないでいます。従来の研究では、イオンが選択性フィルタに入ることによってその中に既に入っている別のイオンを押し出し、それによってイオン透過が起きると考えられていました(ノックオン機構)。また、ナノ空洞は細胞内溶液のただの延長のように想定されていました。しかし、我々はコンピュータを用い

たシミュレーションによって、このような従来の考えを覆すイオン透過の仕組みを原子レベルで初めて突き止めました。まず、ナノ空洞にはせいぜい1個のイオンしか存在しないことが分かりました。さらに驚くべきことに、イオン透過の速さを決めているのは最も細い選択性フィルタに入る過程ではなく、やや広いナノ空洞に入る過程によることも解明しました。ナノ空洞は、多くのチャネルに見つかっています。この研究は、そのような空間がチャネルのイオン透過に極めて重要であることを初めて示したものです。

Sumikama T, Oiki S. Digitalized K<sup>+</sup> Occupancy in the nanocavity holds and releases queues of K<sup>+</sup> in a channel. J Am Chem Soc **138** : 10284-10292, 2016.

[動画は学会ホームページ <http://physiology.jp/>を参照]

## CRH ニューロン軸索終末への NKCC1 局在と弓状核からの GABA 投射による新たな CRH 放出機構の発見

浜松医科大学神経生理学講座 柿沢圭亮 (福田敦夫)

副腎皮質からのグルココルチコイド分泌は、視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) によって下垂体から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌が促進されることによって促進されるという、いわゆる視床下部—下垂体—副腎系 (HPA axis) で調節されます。HPA axis

はさらに、視床下部と下垂体のレベルで各々グルココルチコイドによるネガティブフィードバックによる調節を受けます。非ストレス状態においては、CRH ニューロンは、 $\gamma$ アミノ酪酸 (GABA) ニューロンの室傍核への入力によって抑制性の制御を受けています。GABA が抑制性に働

くためには細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が低いことが必要であり、室傍核の CRH ニューロンの細胞体においては、 $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  共輸送体 (KCC2:  $\text{Cl}^-$  汲み出し機能) の発現によって細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が低く保たれています。一方で、急性ストレス時には CRH ニューロン細胞体における KCC2 の細胞膜での発現が低下することによって細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が上昇し、CRH ニューロンに対する GABA 作用が  $\text{Cl}^-$  流入による抑制性から  $\text{Cl}^-$  流出による興奮性に変化することが近年示されました。

本研究では、GABA 合成量が半減したマウス (GAD67-GFP knock-in, ヘテロ) を用いて検討したところ、非ストレス状態でも GABA の減少により、CRH 放出が減少して細胞体に蓄積している可能性が示唆されました。そこで、CRH 放出部位である視床下部正中隆起の CRH ニューロン軸索終末に着目したところ、終末には  $\text{GABA}_A$  受容体とともに細胞内に  $\text{Cl}^-$  を取り込む  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  共輸送体 (NKCC1) が発現しており、小胞性 GABA トランスポーターとも共局在していました。しかし室傍核にある CRH ニューロン細胞体とは対照的に KCC2 は発現していませんでした。さらに、逆行性トレーサーにより GABA 作動性線維の投射元を探索したところ、視床下部の弓状核でした。ついで、CRH-Cre マウスと  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛋白 GCaMP3 レポーターマウスを交配し、CRH ニューロン選択的に GCaMP3 を発現するマウスを作製して GABA 作用を調べたところ、細胞体では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が減少したのに対し、終末では有意に増加しました。すなわち、CRH ニューロン軸索

終末は NKCC1 発現により細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が高く、弓状核から投射する GABA が興奮性に作用して CRH 分泌を促進するという、ストレスホルモン放出機構の新しい経路を発見しました (図)。

弓状核は、摂食行動制御の中心であり、摂食行動を促進するニューロペプチド Y (NPY) /アグーチ関連ペプチド (AgRP) を産生するニューロンと、摂食行動を抑制する  $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) を産生するプロオピオメラノコルチン (POMC) ニューロンが存在し、室傍核への投射などを介して相反的な働きをしており、摂食行動やエネルギー代謝に重要であることが知られています。このうち AgRP/NPY ニューロンが GABA 作動性で、他に rat insulin promoter (RIP) ニューロンも GABA 作動性で、何れも血中のインスリンやレプチン、グレリンなどを介して栄養状態をモニターしているので、摂食行動に伴うグルココルチコイドの変化に今回発見した機構が関与している可能性があります。さらに、AgRP/NPY ニューロンにはグルココルチコイド受容体が発現することも知られており、もしかすると、栄養や代謝状態による HPA axis へのネガティブフィードバックループを形成している可能性もあり (図) 今後更に検討していく必要があります。

Kakizawa K, Watanabe M, Mutoh H, Okawa Y, Yamashita M, Yanagawa Y, Itoi K, Suda T, Oki Y, Fukuda A. A novel GABA-mediated corticotropin-releasing hormone secretory mechanism in the median eminence. *Science Advances* 2 : e1501723, 2016.

[図は学会ホームページ <http://physiology.jp/> を参照]

生理学および関連諸分野における、会員各位の研究成果について、学会ホームページ「サイエンストピックス」の欄に判りやすい解説を紹介し、広く社会に発信しています。会員の皆様の奮ってのご投稿、ならびに、候補著者のご推薦をお願いいたします。「サイエンストピックス」への投稿は学会事務局にて随時受け付けております。