

# 小胞体膜電位による神経機能制御機構

所属：浜松医科大学 医学部医学科 器官組織解剖学講

座助成対象者：阪東 勇輝

共同研究者：なし

## 概要

学習が起こるためにはシナプス可塑性が必要である。近年、小胞体ストレス応答を担う中心的な転写因子の一つ、Xbp1を欠損させると、海馬におけるシナプス伝達の長期増強が起こらず、学習が阻害されることが報告された。しかし、細胞膜の電気活動と小胞体の活動が強調する機構は明らかではない。本研究では膜電位に着目し、細胞膜・小胞体膜間相互作用の解明を試みた。まず、小胞体膜電位をモニターするための蛍光プローブを開発し、小胞体膜電位変動を高速かつ高解像度で記録、操作するための実験システムを構築した。今後、細胞膜の電気活動が小胞体機能を制御する機構を明らかにし、シナプス可塑性への寄与を解明する。

## abstract

Quality control of proteins is essential for synaptic functions. Previous studies have shown that electrical activity of a neuron induce unfolded protein response (UPR), and that depolarization of plasma membrane (PM) potential hyperpolarize membrane potential of endoplasmic reticulum (ER) (Martinez et al., Cell Rep., 2016; Sepehri Rad et al., Sci. Rep., 2018). Here, we hypothesize that electrical coupling of PM and ER induce UPR. We use an optogenetic technique and voltage imaging to tackle this hypothesis. Here, we developed ER-targeted fluorescent voltage indicator, and an imaging and optogenetic stimulation system with high

spatiotemporal resolution. Using this system, we will reveal electrical mechanisms of plasma membrane-ER interactions and synaptic plasticity.

## 研究内容

### 背景

シナプス可塑性及び、付随するタンパク質合成は、学習、記憶形成における中心的なプロセスである (Costa-Mattioli et al., Neuron, 2009; Nakazawa et al., Nat Rev Neurosci., 2004)。近年、小胞体ストレス応答を担う中心的な転写因子の一つ、Xbp1 をノックアウトすると、海馬におけるシナプス伝達の長期増強が起こらず、学習が阻害される (Martinez et al., Cell Rep., 2016)。小胞体ストレスを与えてから Xbp1 が成熟型となって転写を活性化するまでに約 30 分間かかることが知られているが、Xbp1 ノックアウトマウスでは、5 分以内にシナプス伝達の増強が消失することから (Martinez et al., Cell Rep., 2016)、神経細胞において、Xbp1 は定説よりもはるかに速く活性化されると予想される。細胞膜の脱分極が小胞体膜表面に局在する IRE1 による前駆型 Xbp1 mRNA のスプライシングに十分であるが、細胞膜の電気シグナルがどのように小胞体ストレス応答を活性化するか、そのメカニズムは不明である (Martinez et al., Cell Rep., 2016)。

### 目的

細胞膜の膜電位変化は、小胞体膜電位も同時に変化させることから (Sepehri Rad et al., Sci. Rep., 2018)、申請者は、神経活動は小胞体膜電位の変化を介して小胞体ストレス応答を活性化させるという仮説を得た。小胞体膜において多くのイオンチャネル及びトランスポーターが発現している (Xu et al., Cell Calcium, 2015)。その中でも、BK チャネルは  $\text{Ca}^{2+}$  によりチャネルが開き、小胞体膜を過分極させることから、細胞膜の脱分極に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  流入により、細胞膜の脱分極と同期して小胞体膜が過分極すると予想される (図 1)。本研究では、パッチクランプ法、膜電位イメージング法、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法及び IRE1 活性化過程の可視化法を組み合わせ、細胞膜と小胞体膜間における同期した電気シグナル(ここでは電気カップリングと呼ぶ)という新しいメカニズムによるタンパク質の品質管理、さらには学習への寄与を明らかにする。

## 結果

### (1) 高時空間分解能を持つイメージングシステムの構築

方法(1)で挙げた部品を正立蛍光顕微鏡に組み込み、まずはセルカウンターのグリッドに蛍光色素、Alexa488をロードし、イメージングを行った。結果、励起光が視野に均一に照射されていること、及び蛍光像の歪みが生じないことを確認できた。さらに、蛍光ビーズ(直径 $1 \cdot \mu\text{m}$ )をイメージングし、微小構造物をイメージングできることを確認した。また、このイメージングシステムが、ガルバノミラースキャナを用いた共焦点顕微鏡と同等の高い空間分解能を有することを確認した。

また、光刺激を行うためのファイバーLED及び、パッチクランプ等の電気生理学実験を行うためのアンプ(Multiclamp700B, Axon Instruments)、データ取得ボード(USB-6343, National Instruments)、ヘッドステージ及び電動マニピュレータ(uMP-4, Sensapex)のセットアップ、局所的な電気刺激を行うためのパルスジェネレータ(SEN-2201, Nihon Kohden)のセットアップも行い、高速共焦点イメージング、光刺激及び電気生理学実験を同時に行うことができるシステムを構築した。

### (2) (3) 蛍光プローブ、光遺伝学ツールの構築及びそれらの局在

マウス大脳皮質神経細胞において、構築した蛍光プローブ及び光遺伝学ツールが発現すること、及び小胞体への局在を確認した(図1)。現在、ライブイメージングを行うためのステージの準備を行っている。

### 今後

本研究により、小胞体膜電位の記録及び光操作の系を立ち上げた。これにより、小胞体膜の電気シグナルの実態を解明するための技術的基盤を築くことができた。タンパク質ベースの蛍光膜電位プローブを用いることで、従来の電気生理学的手法や膜電位感受性色素では極めて困難であった、小胞体膜電位動態の解析が可能となる。今後、小胞体膜の局所及び大域の膜電位動態の解明、生体内における小胞体膜電位動態の実態解明につながると期待される。また、小胞体電気シグナルによる細胞及び生体機能制御機構を明らかにでき

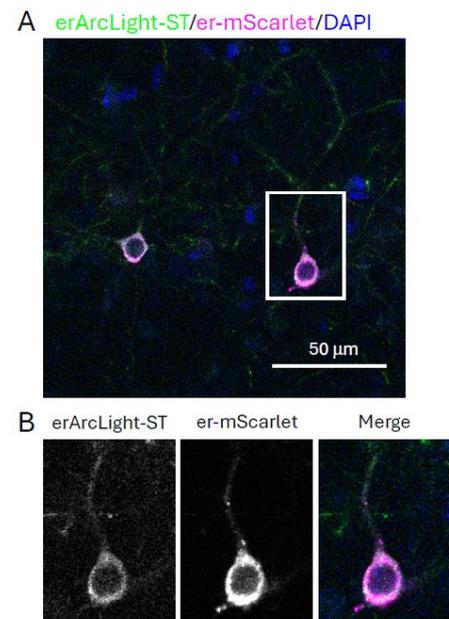


図1. 小胞体膜電位プローブ・erArcLight-STの細胞内分布. (A)大脳皮質神経細胞においてerArcLight-ST及び小胞体局在型赤色蛍光タンパク質・er-mScarletを発現させた。(B)(A)の四角の部分拡大した図。erArcLight-STの小胞体への局在を確認した。

ると期待される。

本研究で構築した手法は、小胞体だけでなく、他のオルガネラにも適用可能であり、将来的には、細胞内電気シグナルの全容を明らかにし、その生理的意義の解明を目指す。

#### 引用文献

Yuki Bando, Michael Wenzel, Rafael Yuste. Simultaneous two-photon imaging of action potentials and subthreshold inputs in vivo. *Nature Communications* 12 7229 (2021)

Mauro Costa-Mattioli, Wayne S Sossin, Eric Klann, Nahum Sonenberg. Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*. 61(1):10-26. (2009)

Gabriela Martínez, René L Vidal, Pablo Mardones, Felipe G Serrano, Alvaro O Ardiles, Craig Wirth, Pamela Valdés, Peter Thielen, Bernard L Schneider, Bredford Kerr, Jose L Valdés, Adrian G Palacios, Nivaldo C Inestrosa, Laurie H Glimcher, Claudio Hetz. Regulation of Memory Formation by the Transcription Factor XBP1. *Cell Rep*. 14(6):1382-1394. (2016)

Kazu Nakazawa 1, Thomas J McHugh, Matthew A Wilson, Susumu Tonegawa. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci*. 5(5):361-72. (2004)

Masoud Sepehri Rad, Lawrence B Cohen, Oliver Braubach, Bradley J Baker. Monitoring voltage fluctuations of intracellular membranes. *Sci Rep*. 8(1):6911. (2018)

Haoxing Xu, Enrico Martinoia, Ildiko Szabo. Organellar channels and transporters. *Cell Calcium*. 58(1):1-10. (2015)

#### 本助成に関わる成果物

[論文発表]

[口頭発表]

[ポスター発表]

[その他]