

側坐核中型有棘神経細胞の興奮性に寄与するイオンチャネル の *In Silico* スクリーニング

行縄 直人^{1,a)} 銅谷 賢治¹ 吉本 潤一郎^{2,1}

概要：ドーパミンシグナルは、側坐核中型有棘神経細胞 (MSN) の興奮性を制御することで報酬学習に寄与している。MSN の興奮性制御は細胞内シグナル伝達に基づくリン酸化ネットワークにより実現されているが、リン酸化の基質となりうる候補タンパク質の膨大なゆえ、そのメカニズムの詳細には未解明な点が残されている。本研究では、近年のプロテオミクス解析により新規リン酸化ターゲットとして同定されたカリウムチャネル Kv7.2 (KCNQ2) を導入した、新たなコンダクタンススペースの神経細胞モデルを提案する。本モデルを用いたシミュレーションにより、KCNQ2 のリン酸化に基づくコンダクタンス抑制が、D1 型ドーパミン受容体発現型 MSN におけるコカイン投与時の発火率上昇現象を良く説明することを示す。

1. はじめに

中型有棘神経細胞 (MSN) は側坐核を構成する主要な神経細胞であり、発現するドーパミン受容体の型により、D1 型 MSN (D1R-MSN) および D2 型 MSN (D2R-MSN) の二種類が存在する。各細胞は大脳皮質および視床のグルタミン酸作動性神経細胞からの投射を受け活動するが、腹側被蓋野のドーパミン作動性神経細胞の投射も同時に受けている。このドーパミンシグナルは MSN の細胞内シグナル伝達経路を駆動し、リン酸化によるイオンチャネルの機能修飾を行うことで細胞の内在的な興奮性を制御するが、その機構の詳細は明らかではない。

近年の遺伝学的手法、プロテオミクス、電気生理を駆使した解析により、ドーパミンシグナルを増強するコカイン投与時の D1R-MSN の発火率上昇が、PKA-Rap1-MAPK を介したシグナル伝達経路の活性化により実現されることが示された [1]。このことは、何らかのイオンチャネルのリン酸化が興奮性上昇に寄与することを示唆しているが、具体的なターゲットは不明のままである。そこで、本研究ではコンダクタンススペースの神経細胞モデルによるシミュレーションを用い、D1R-MSN におけるドーパミン依存の興奮性上昇の要因をチャネルキネティクスの観点から探る。

2. D1 型中型有棘神経細胞モデル

D1R-MSN の膜電位をシミュレーションするための基礎

モデルとして、Moyer らにより構築された神経細胞モデル [2] を用いる。本モデルは、側坐核を含む腹側線条体における D1R-MSN に特異的な形態およびイオンチャネルを考慮した多コンパートメントモデルであり、計 13 種類の電位依存性チャネルのコンダクタンスは Hodgkin-Huxley 型のダイナミクスにより記述される。本研究では単一神経細胞の発火活動に対する特定のイオンチャネルの寄与を明らかにすることを主眼としており、樹状突起などの形態依存的な局所の膜電位特性の観察やシナプス入力を考慮したシミュレーションは直接の目的ではない。そのため、イオンチャネルの多様性による膜電位ダイナミクスの自由度は維持したまま、形態については細胞体を主に想定した単一コンパートメントのより単純な縮約モデルとして扱う。

ドーパミンシグナルによるチャネルキネティクスの修飾は、上述の基礎モデルにおいて、ナトリウムチャネル (fast; NaF)、カルシウムチャネル (P/Q, N, L (Ca_v1.2, Ca_v1.3) 型)、カリウムチャネル (内向き整流性; KIR) に関するコンダクタンスパラメータを変更することにより反映する。本研究ではこれらに加え、リン酸化プロテオミクスデータベース Kinase-Associated Neural Phospho-Signaling (KANPHOS) [3] *1 より MAPK 下流のリン酸化基質として同定された遅延性整流性カリウムチャネルの一つである、Kv7.2 (KCNQ2) を新たな修飾ターゲットとして考える (表 1)。ここで、ドーパミン依存性の D1R-MSN の興奮性上昇に関する実験的な知見に基づき、KCNQ2 のリン酸化は KCNQ2 コンダクタンス低下をもたらすものと仮定する。この作用は、基礎モデルに含まれ KCNQ2 と

¹ 沖縄科学技術大学院大学神経計算ユニット

² 奈良先端科学技術大学院大学

a) naoto.yukinawa@oist.jp

*1 <https://srpmsg01.unit.oist.jp/>

表 1 D1 型中型有棘神経細胞におけるドーパミン依存性イオンチャネル修飾のモデル.

VGCCs	Potassium channels	Sodium channels
CaN ↓	KIR ↑	NaF ↓
CaP/Q ↓	KCNQ2 ↓	
Ca _v 1.3 ↑		
Ca _v 1.2 ↑		

上矢印はコンダクタンス増加、下矢印は同減少を示す。

同タイプのダイナミクスを示す、A 型カリウムチャネル (KAs) のコンダクタンスパラメータの操作としてモデルに導入する。

3. シミュレーション実験

シミュレーションモデルを用いて KCNQ2 コンダクタンスの変化が D1R-MSN の興奮性に与える影響を検討した。具体的には、ドーパミン依存性チャネル修飾の違いにより提案モデルを含む以下の 4 つのモデルを用意し、各モデルへの入力としてステップ電流を与えた際の発火応答を求め、どのモデルが電気生理実験のデータ [1] を良く再現するのかについて調べた。

- (1) Control: チャネル修飾なし。
- (2) KCNQ2: 1 に KCNQ2 修飾を加えたもの。
- (3) KIR/NaF/CaQ,N,L: 1 に既存モデルのチャネル修飾 [2] を含めたもの。
- (4) KCNQ2/KIR/NaF/CaQ,N,L (提案モデル) : 2, 3 を同時に考慮したもの。

モデル 1 は電気生理実験における野生型 MSN, モデル 2 から 4 はドーパミンシグナル存在下と同等の Rap1 の恒常的活性を示すように遺伝的操作を加えた MSN (caRap1-MSN) 細胞に対応する。興奮前の基準となるモデル 1 を用い、300 pA の入力での発火数が電気生理実験の結果と等しくなるように膜時定数および静止膜電位を調整し、全てのモデルで共通の値として用いた。また、KCNQ2 修飾を含むモデル 2, 4 において、修飾に基づく KCNQ2 コンダクタンスの変化量は未知であるため、モデル 1 におけるコンダクタンスパラメータの値を 100% とし、10% から 150% の範囲で探索した。ステップ電流入力のパラメータは実際の電気生理実験を模し、入力強度は 50 から 300 pA の計 6 条件、時間は全ての条件で 800 ms とした。

シミュレーションにより得られた、各モデルの電流入力に対する発火数を図 1 に示す。モデル 2 については KCNQ2 コンダクタンスパラメータを 10% とした場合、モデル 4 については電気生理実験データに最も適合した 70% とした場合の結果をそれぞれ示した。これらから、KCNQ2 コンダクタンスの低下が D1R-MSN の興奮性上昇に寄与することが確認された。結果を詳細に見ると、KCNQ2 単体の修飾では 150 pA 以下の弱い入力に対して強い興奮性上昇作用が得られたが、200 pA 以上の強い入力に対しては

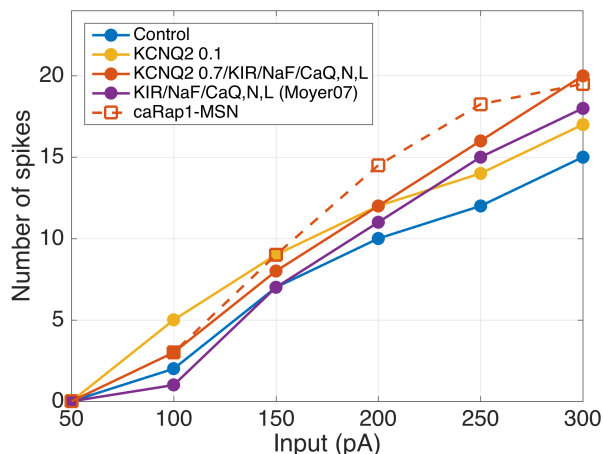


図 1 直流入力に対する各神経細胞モデルおよび実細胞の発火応答。

実験データに比べ興奮性上昇は弱かった。一方、KCNQ2 に加え既存のモデルにおけるチャネル修飾を同時に考慮したモデル 4 は、強い入力に対しより高い興奮性上昇を示すだけでなく、広範な入力レベルに対して電気生理実験データに最も近い応答を示した。また、従来のチャネル修飾のみを含むモデル 3 は、モデル 4 と比較して興奮性上昇の度合いは低かった。以上より、KCNQ2 が D1R-MSN におけるドーパミン依存性興奮性制御に関わる新たな因子であることが示唆された。

4. おわりに

本研究では、シミュレーションを用い KCNQ2 がドーパミンシグナルによる興奮性制御に関わるイオンチャネルの候補となりうることを示した。現在並行して実施中の KCNQ2 阻害薬を用いた直接的な検証実験 [4] とあわせ、本チャネルのより詳細なキネティクスを明らかにしてゆくことが今後の課題である。

謝辞 本研究で用いた電気生理実験のデータをご提供いただいた、名古屋大学医学系研究科貝淵弘三教授ならびに中内さくら助教に感謝申し上げます。本研究は脳科学研究戦略推進プログラムにより実施された「脳科学研究を支える体系的・集約的な情報基盤の構築」の成果である。

参考文献

- [1] Nagai, T. *et al.*: Phosphoproteomics of the dopamine pathway enables discovery of Rap1 activation as a reward signal in vivo, *Neuron*, Vol.89, No.3, pp.550-565 (2016).
- [2] Moyer, J.T., Wolf J.A. and Finkel L.H.: Effects of dopaminergic modulation on the integrative properties of the ventral striatal medium spiny neuron, *J. Neurophysiol*, Vol.98, No.6, pp.3731-3748 (2007).
- [3] Amano, M. *et al.*: Kinase-interacting substrate screening is a novel method to identify kinase substrates, *J. Cell Biol*, Vol.209, No.6, pp.895-912 (2015).
- [4] Nakano, T., Wickens J. and Yoshimoto, J.: *abstract of The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*, Kobe, Japan (2015).