

脳特異的 K^+ - Cl^- 共輸送体 KCC2 の持続的脱リン酸化モデルを用いたリン酸化の生理的意義の解明

福田 敦夫¹, 秋田 天平², 渡部 美穂¹, 石橋 賢¹

¹ 浜松医科大学医学部医学科神経生理学講座, ² 浜松医科大学医学部看護学科基礎看護学講座

概要

1. 研究目的

$[Cl^-]_i$ の一過性上昇が Cl^- 透過の方向を逆転させ、GABA 作用の抑制から興奮への逆転を起こし、多くの回路を巻き込む発振の空間的リクルートメントを起こし得る。流入した Cl^- を速やかに汲み出す KCC2 は極めて重要で、T906 と T1007 のリン酸化状態により KCC2 機能は制御され、その結果 GABA 作用を調整する。適正な範囲の抑制であるために KCC2 のリン酸化状態の動的変化が保たれている必要がある。その生理機能制御を調べるため、スレオニン残基をアルギニンに置換するミスセンス変異を導入し、この部位が恒常的に脱リン酸化されている KCC2-T906A/T1007A (KCC2^{AA}) マウスを作製した。このマウスを用い KCC2 のリン酸化状態の時系列的変化が、脳の正常な発達と機能に必須であることを証明する。

2. 研究方法

KCC2^{AA} マウスを用い野生型と以下の項目を解析比較した:パッチクランプによる神経細胞の Cl^- ホメオスタシス, 基本的フェノタイプと脳形成過程, 行動学的フェノタイプ, けいれんスケールによるスコア化と脳波計測による易痙攣性の評価, 自発脳波およびインビボ 2 光子イメージングによる神経回路機能解析。

3. 研究結果

KCC2^{AA} ホモマウスでは、KCC2 による細胞外への Cl^- 汲み出し能力が亢進していた。生後 0 日, 成体の, 体重, 呼吸数, 繁殖能力は正常であった。痛覚, 筋持久力, 自発的活動量, 強迫的繰り返し行動, 社会性は正常だが驚愕反応, 不安様行動, 社会的新奇性認知機能が低下していた。けいれんスケールと脳波計測で易けいれん性指標が増加していた。また, 平常時の γ 波帯域の活動が減少し神経細胞の活動の同期性は増していた。

4. 考察

KCC2^{AA} マウスでは KCC2 の機能が亢進し, GABA による抑制力が強まることにより, 行動に変化がみられた。脳波の γ 波帯域の減少と, 認知機能などの異常は矛盾しない結果であり, けいれん発作を起こしやすいメカニズムとしての神経細胞活動の同期性上昇も, KCC2 機能増強による抑制作用・頑強性の強化と矛盾しない結果であった。KCC2 の Thr906 と Thr1007 のリン酸化の適切な制御が抑制性神経伝達の発達と正常脳機能の維持に重要であることが明らかになった。

1. 研究目的

興奮性神経伝達物質のグルタミン酸と抑制性神経伝達物質の GABA による興奮-抑制バランスを失うと, 過剰興奮によりてんかん原性につながる。グルタミン酸受容体は

Na^+ の流入により膜電位を脱分極させ, 活動電位を発火(興奮)させる。一方, GABA_A 受容体は Cl^- チャネルなので Cl^- の電気化学勾配に従った流入により膜電位を過分極(抑制)させるが, 静止膜電位の負電荷により, 陰イオン

のCl⁻は反発力を受ける。そのため、もし[Cl_i]⁻が高い(化学勾配が小さい)と外向きの電気勾配によって Cl⁻は細胞から押出され膜電位を脱分極させるので、GABAは時として興奮性にもなる。これをCl⁻ホメオダイナミクスと呼び、細胞外へCl⁻を排出するK⁺-Cl⁻共輸送体(KCC2)と、細胞内にCl⁻を取込むNa⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体(NKCC1)の2種のCl⁻トランスポーターにより制御される¹⁾。

GABAはフィードフォワードないしフィードバック性に興奮性シナプス伝達を抑制するが、Cl⁻ホメオダイナミクス理論では、[Cl_i]⁻の一過性上昇がCl⁻透過の方向を逆転させ、GABA作用の抑制から興奮への逆転を起こし、多くの回路を巻き込む発振の空間的リクルートメントを起こし得ると考える²⁾。実際、シナプス入力路を高頻度刺激すると、てんかん発作波様後発射が記録され、この間[Cl_i]⁻上昇が持続しGABA反応は興奮性に逆転する。これは、大量に放出されたGABAによりGABA_A受容体-Cl⁻チャンネルから大量のCl⁻が流入し、その結果[Cl_i]⁻が上昇してGABA作用が興奮性に逆転したためである^{1,2)}。したがって、流入したCl⁻を速やかに汲み出すKCC2はてんかん発作抑制に極めて重要である。

また、KCC2とNKCC1はリン酸化による機能制御を受ける³⁾。塩分感受性遺伝性高血圧症の原因遺伝子として同定されたリン酸化酵素WNKは、KCC2とNKCC1を直接リン酸化するSTE20型キナーゼ(SPAKおよびOSR1)のリン酸化状態を制御する[Cl_i]⁻感知調節経路として機能する。WNK下流のSPAKおよびOSR1はKCC2のC末端部に結合し、リン酸化によりKCC2のCl⁻輸送能を低下させるが、NKCC1のN末端尾部リン酸化は逆にCl⁻取り込みを促進する(図1)。実際、塩分負荷はWNKのリン酸化を低下させ、OSR1とSPAKのリン酸化を抑制し、NKCC1活性の低下と⁴⁾、KCC2活性の上昇をもたらす塩分貯留を調節する⁵⁾。

我々は2019年度のソルト・サイエンス研究財研究助成(助成番号1932)により、SPAK/OSR1によるKCC2のリン酸化部位であるT906とT1007のスレオニン残基をグルタミン酸に置換した疑似リン酸化KCC2-T906E/T1007E(KCC2^{EE})マウスを作製した。スパイン形成は正常に認められたが、神経細胞の分布に異常がみられた。また、呼吸運動様神経発火はリズムが消失し、実際の呼吸も窮迫し、歩行運動様神経発火も周期が延長した。

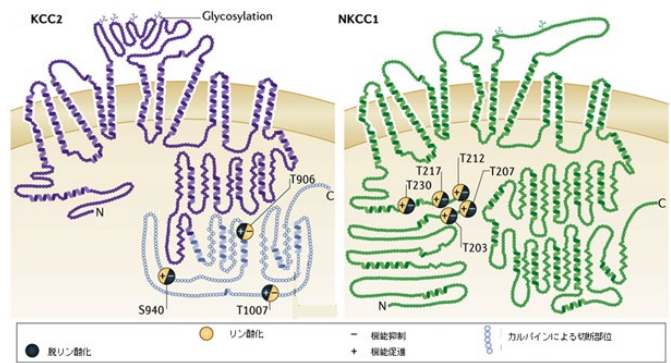


図1: KCC2 および NKCC1 の構造とリン酸化部位。SPAK および OSR1 による KCC2 のスレオニン残基 T906 および T1007 のリン酸化は機能的抑制をおこす。逆に NKCC1 の N 末端残基リン酸化は機能的活性化をもたらす。(福田, Clinical Neuroscience 2018)

さらに、触・痛・前庭刺激により容易にけいれん重積を起こした。これらは、神経細胞が十分にCl⁻を排出することができず、GABA作用がシナプス活動により容易にrundownすることが原因と考えられた。以上から、KCC2のT906とT1007が胎生期の適切な時期に脱リン酸化されて機能を発現し、GABA作用を調整することが胎仔脳の正常な発達に必須であることを示した⁶⁾。

さらに、KCC2のリン酸化/脱リン酸化による生理機能制御を詳しく調べるため、スレオニン残基をアルギニンに置換するミスセンス変異を導入し、この部位が恒常的に脱リン酸化されているKCC2-T906A/T1007A(KCC2^{AA})マウスを作製した。ところが驚いたことに、GABA作用が増強され、けいれん抵抗性が増しているはずのこのモデルで、肉眼的にはむしろ易痙攣性を示すという、全く予想もつかない現象が起こった。すなわち、過ぎたるは及ばざるがごとしというが、適正な範囲の抑制であることが重要で、そのためにKCC2のリン酸化状態の動的変化が保たれている必要があると考えた。

そこで、本研究ではKCC2^{AA}マウスを用い、細胞-神経回路-個体レベルの生理機能のダイナミクスを詳しく解析し、KCC2のリン酸化/脱リン酸化の発達に伴う時系列的変化および動的変化が、脳の正常な発達と機能に必須であることの証明を行った(図2)。

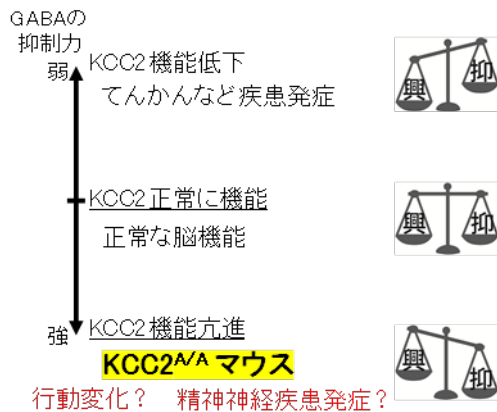


図 2: KCC2 機能と神経回路の興奮/抑制バランス。
KCC2 機能低下で GABA 抑制力が弱まると、てんかん原性に関わる。本研究では脱リン酸化による KCC2 機能亢進が、GABA 抑制力、神経回路機能や行動をどのように変化させるのか、さらに精神神経疾患に関わる可能性について KCC2^{ΔΔ} マウスを用いて解析を行った。

2. 研究方法

2.1 Cl⁻ホメオスタシス解析

KCC2^{ΔΔ} マウスより急性脊髄スライス標本を作製し、電気生理学的手法を用いて、脊髄腹側の神経細胞に Cl⁻を負荷し、E_{Cl} が脱分極シフトした後の回復を測定することにより、KCC2 機能を評価した。野生型マウスと比較し、KCC2 機能が亢進し、Cl⁻負荷後の回復時間の短縮により、GABA 抑制力が強化されているのか確認した。

2.2 基本的フェノタイプと脳形成過程の解析

KCC2^{ΔΔ} マウスの体長や体重、脳の形態、繁殖能力などの基本的表現型を検討した。

2.3 行動学的フェノタイプ解析

新奇の環境での行動や不安様行動の変化を、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路試験により解析した。Three chambers 装置を用いて社会的行動の変化、プレパルス抑制テストを用いて感覚運動情報処理機能の変化を解析し、KCC2 機能の亢進や神経回路形成の変化が行動に及ぼす影響を詳細に検討した。

2.4 けいれんスケールによるスコア化と脳波計測による易痙攣性の評価

KCC2 機能が亢進しているはずの KCC2^{ΔΔ} マウスで易痙攣性が増すという不可解な現象を詳細に解析した。ムスカリン性アセチルコリン受容体のアゴニストであるピロカルピン投与によりけいれん発作を誘発し、投与後 120 分

間のけいれん発作の強さについて、ラシーンスケールにより評価した。さらに、ピロカルピン投与後の脳波を経時的に測定し、けいれん重積までの周波数・振幅を解析し、GABA 関与成分や同期性を時系列的に評価した。

2.5 自発脳波およびインビボ 2 光子イメージングによる神経回路機能解析

KCC2^{ΔΔ} マウスの神経回路機能の変化を検討するために、大脳皮質より自発脳波を測定し、周波数解析を行った。アデノ随伴ウイルス (AAV) により Ca²⁺センサーの GCaMP6f を神経細胞に発現させ、神経細胞集団の活動を 2 光子顕微鏡による Ca²⁺イメージングで記録し、神経細胞の同期性が KCC2^{ΔΔ} でむしろ増加していないか、強度ならびに空間的広がりを数理解析した。

3. 研究結果

3.1 Cl⁻ホメオスタシス解析

ホールセルパッチクランプ法により、GABA に対する反応を記録した後、膜電位を 0 mV に保持し GABA を作用させることにより、脊髄の神経細胞内に Cl⁻を負荷し、20 秒後に GABA に対する反応を記録し、KCC2 の Cl⁻くみ出し能力を調べた。野生型マウスでは Cl⁻を負荷後、GABA による膜電位の変化が大きく、[Cl⁻]_i が高いままであったが、KCC2^{ΔΔ} ホモマウスでは Cl⁻がくみ出され、GABA に対する反応が Cl⁻負荷前のレベルまで戻っており、KCC2^{ΔΔ} ホモマウスでは、KCC2 による細胞外への Cl⁻くみ出し能力が亢進していることが明らかになった。

3.2 基本的フェノタイプと脳形成過程の解析

生後 0 日、成体の KCC2^{ΔΔ} マウスを用いて、体重、呼吸数を調べたが、野生型マウスと差がみられなかった。繁殖能力は正常で、雌雄の KCC2^{ΔΔ} ヘテロ、ホモマウスとも繁殖可能であった。

3.3 行動学的フェノタイプ解析

Three chambers 社会性テストでは、野生型マウスと同様に、KCC2^{ΔΔ} ヘテロマウスおよびホモマウスは空の檻を置いたチャンバーよりマウスを入れた檻を置いたチャンバーに長く滞在し、社会性には影響がみられなかった。馴染みのマウスを入れた檻を置いたチャンバーと新奇のマウスを入れた檻を置いたチャンバーと比較したところ、野生型マウスは新奇のマウスがいるチャンバーに長く滞在したが、KCC2^{ΔΔ} ヘテロ、ホモマウスは両方のチャンバーに同程度の時間滞在し、社会的新奇性認知機能の低下が認め

られた(図 3)。また、高架式十字迷路試験では野生型マウスと比較して $KCC2^{A/A}$ ヘテロ, ホモマウスはオープンアームでの滞在時間が長く, クローズドアームでの滞在時間が短く, 不安様行動の低下が認められた(図 4)。強い感覚刺激(大きな音)により起こされる驚愕反応が, 先行する弱い感覚刺激(小さな音)により抑制される現象をみるプレパルス抑制テストを行ったが, $KCC2^{A/A}$ マウスは強い感覚刺激(大きな音)に驚愕反応を示さなかったため, プレパルス抑制を測定することが出来ず, 聴覚の異常が考えられた。そのため, 驚愕反応テストを行い, 60~120 dB の音に対する驚愕反応を調べたところ, $KCC2^{A/A}$ ヘテロ, ホモマウスは 90~120 dB の音に対して驚愕反応を示す回数が少なく, 驚愕反応の低下が認められた。驚愕反応を示すための筋力の低下を考え, ワイヤハングテストを行ったが, 筋持久力には差がみられなかったことから, $KCC2^{A/A}$ マウスでは聴力が低下している可能性が考えられた。一方, 自発的活動量をみるオープンフィールドテスト, 強迫的繰り返し行動をみるガラス玉覆い隠し試験, 痛覚に対する感受性を調べるフォン・フレイテストでは野生型マウスと $KCC2^{A/A}$ マウスで差がみられなかった。

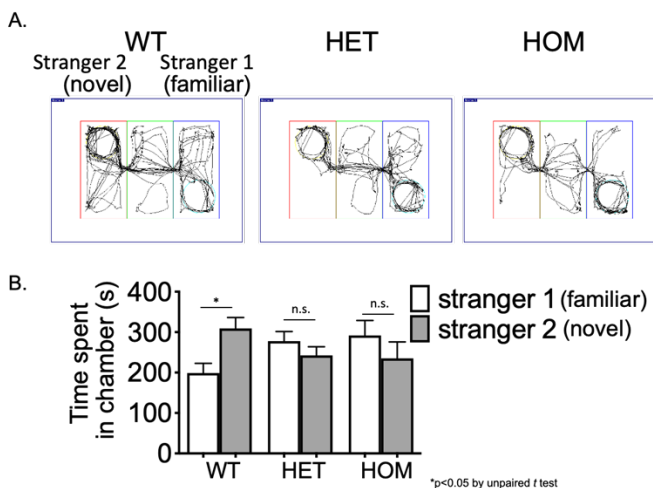


図 3: Three chambers 社会性テストの結果。

- A. 野生型マウス(WT), $KCC2^{A/A}$ ヘテロマウス(HET), $KCC2^{A/A}$ ホモマウス(HOM)が試験中にチャンバー内を動いた軌跡
- B. 野生型マウスは馴染みのマウスを入れた檻を置いたチャンバー(stranger 1)よりも, 新奇のマウスを入れた檻を置いたチャンバー(stranger 2)に長く滞在したが, $KCC2^{A/A}$ ヘテロ, ホモマウスは, 両方のチャンバーに同程度の時間滞在していた

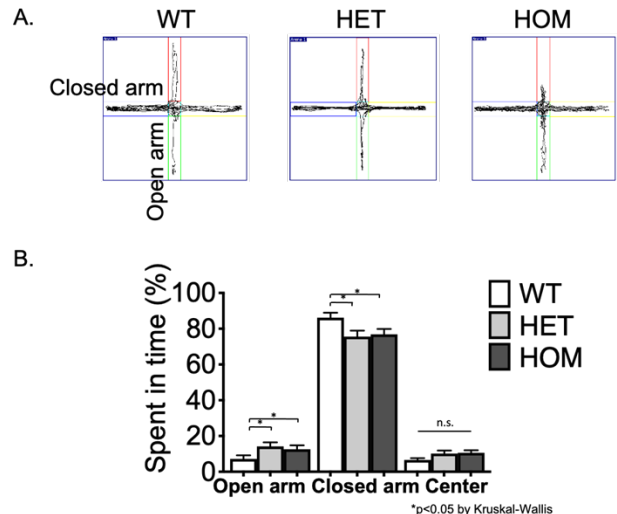


図 4: 高架式十字迷路試験の結果。

- A. 野生型マウス(WT), $KCC2^{A/A}$ ヘテロマウス(HET), $KCC2^{A/A}$ ホモマウス(HOM)が試験中に高架式十字迷路を動いた軌跡
- B. 野生型マウスと比較して, $KCC2^{A/A}$ ヘテロ, ホモマウスはオープンアームでの滞在時間が長く, クローズドアームでの滞在時間が短かった

3. 4 けいれんスケールによるスコア化と脳波計測による易けいれん性の評価

けいれん発作を引き起こすためにピロカルピンを腹腔内投与し, 2 時間観察したのち, けいれん発作の強さをラシーンスケール(ステージ 0 から 6, ステージが高くなるほど, 発作が強くなる)で評価した。 $KCC2^{A/A}$ マウスはピロカルピン投与 15 分後から高いラシーンスケールを示し, けいれん重積を示すまでの時間が短く, 観察時間全体を通して高いラシーンスケールを示す傾向がみられた(図 5)。ピロカルピン投与後の脳波を大脳皮質から測定したところ, 脳波上の発作波重積を示すまでの時間が短く, 発作前にはすでに γ 波帯域の活動の増加が認められた。よって, $KCC2^{A/A}$ マウスでは易けいれん性が増してけいれん発作を起こしやすいと考えられた。

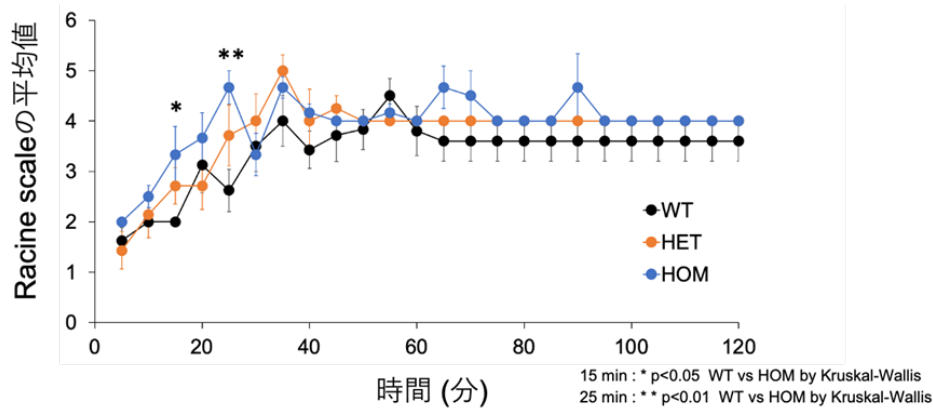


図 5: ピロカルピン誘発性けいれん発作のラシーンスケールによる評価。野生型マウス(WT)と比較して、 $KCC2^{A/A}$ ホモマウス(HOM)はピロカルピン投与 15 分後から高いラシーンスケールを示し、観察時間全体を通して高いラシーンスケールを示す傾向がみられた

3. 5 自発脳波およびインビボ 2 光子イメージングによる神経回路機能解析

$KCC2^{A/A}$ マウスの神経活動の変化を神経回路レベルで明らかにするために、大脳皮質より自発脳波を測定した。野生型マウスと比較して $KCC2^{A/A}$ ホモマウスでは 45, 50, 80 Hz のパワースペクトル密度の減少がみられ、 $KCC2^{A/A}$ マウスでは平常時の γ 波帯域の活動が減少していた(図 6)。そこで、大脳皮質感覚野に AAV を用いてカルシウムセンサーの GCaMP6f を発現させ、2 光子顕微鏡により *in vivo* カルシウムイメージングを行い、神経細胞の活動の指標として細胞内カルシウム濃度の変化を記録したが、自発的な一過性の細胞内カルシウム濃度上昇の頻度には差はみられなかった。しかし、各神経細胞間の活動の相関性を調べたところ、野生型マウスに比べて $KCC2^{A/A}$ マウスでは活動の相関性が増加しており、神経細胞の活動の同期性が増している可能性が示唆された(図 7)。

4. 考察

以上の結果から、 $KCC2^{A/A}$ マウスでは $KCC2$ の機能が亢進し、GABA による抑制力が強まることにより、行動に変化がみられた。脳波の γ 波帯域が減少していたことから、認知機能などに異常が見られたことと矛盾しない結果であった。また、けいれん発作を起こしやすいことがわかり、そのメカニズムとしては神経細胞間で活動が同期しやす

いことによる可能性が考えられたが、これも $KCC2$ 機能増強による抑制作用・頑強性の強化と矛盾しない結果であった。よって、 $KCC2$ の Thr906 と Thr1007 のリン酸化が適切に制御されることが、抑制性神経伝達の発達と正常機能の維持に重要であることが明らかになった。

5. 今後の課題

$KCC2^{A/A}$ マウスは神経細胞間で活動が同期しやすく、けいれん発作を起こしやすいことを明らかにすることができたが、今後は、 $KCC2^{A/A}$ マウスで、けいれん発作前や発作中の神経活動に変化があるか調べるために、ピロカルピン投与前後に *in vivo* カルシウムイメージングを行い、てんかん焦点の伝播のパターン、神経細胞間の同期性の変化について検討する必要がある。また、 $KCC2^{A/A}$ マウスでは行動に変化がみられたことから、感覚情報の処理に変化がある可能性が考えられるため、聴覚、嗅覚や痛覚、接触刺激などの感覚刺激を与え、同時に *in vivo* カルシウムイメージングを行い、刺激による神経細胞の反応に変化がみられるか検討する必要がある。さらに、 $KCC2$ 機能の異常が関連している可能性のある疾患や障害のモデルマウスで、 $KCC2$ のリン酸化状態に変化がみられるか調べ、リン酸化による $KCC2$ の機能制御の異常が、疾患や障害を引き起こす可能性を検討したい。

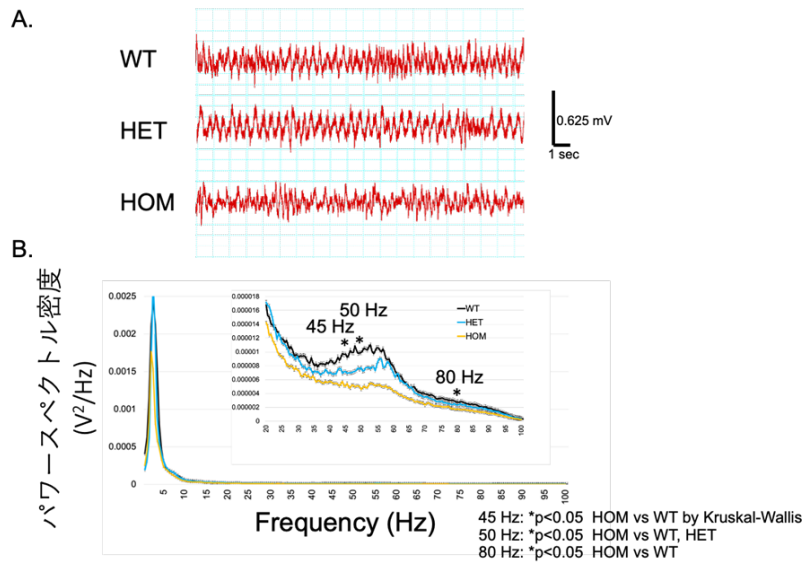


図 6: 大脳皮質より記録した自発脳波の解析.

- A. 野生型マウス(WT), $KCC2^{A/A}$ ヘテロマウス(HET), $KCC2^{A/A}$ ホモマウス(HOM)より記録した自発脳波の波形
 B. 周波数解析の結果, $KCC2^{A/A}$ ホモマウスでは 45, 55, 80 Hz のパワースペクトル密度の減少がみられた

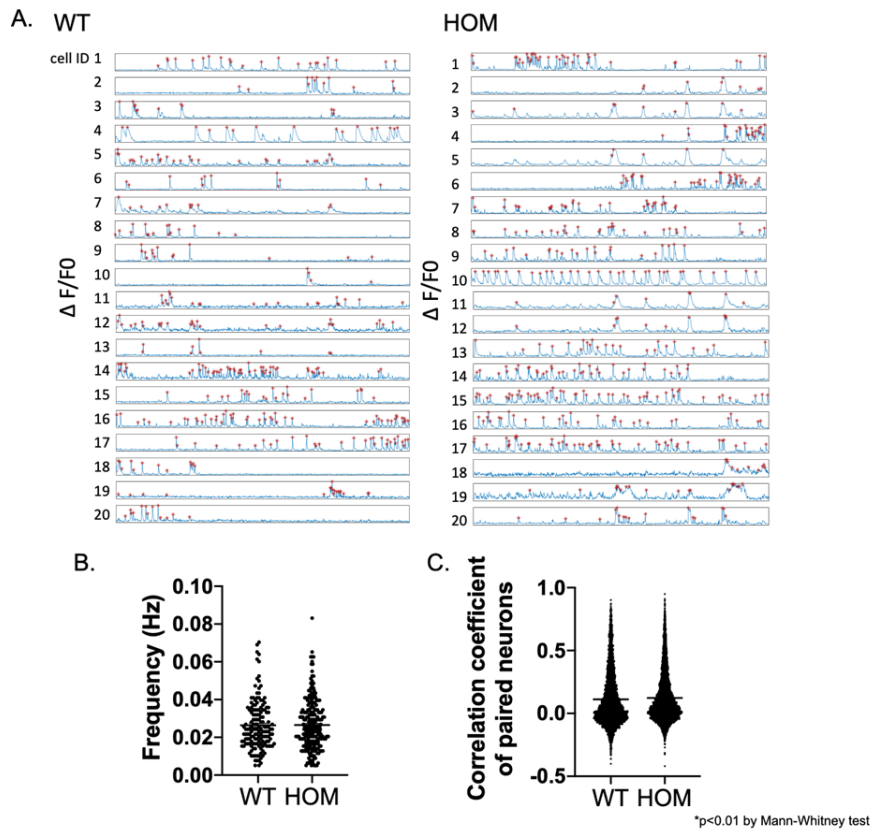


図 7: インビボ 2 光子イメージングによる神経回路機能解析の結果.

- A. 野生型マウス(WT), $KCC2^{A/A}$ ホモマウス(HOM)の大脳皮質神経細胞の自発的なカルシウム上昇の記録
 B. 自発的なカルシウム上昇の頻度に野生型マウスと $KCC2^{A/A}$ ホモマウスで差はみられなかった
 C. 野生型マウスに比べて, $KCC2^{A/A}$ ホモマウスでは各神経細胞間の活動の相関性が増加していた

6. 文献

1. Fukuda, A., Chloride Homeodynamics Underlying Pathogenic Modal Shifts of GABA Actions, In: J.L.R. RUBENSTEIN, P. RAKIC, B. CHEN, K.Y. KWAN, H.T. CLINE and J. CARDIN editors: *Comprehensive Developmental Neuroscience 2nd ed: Synapse Development and Maturation*, Cambridge: Academic Press, 2020, pp. 297-321 (Chap. 13).
2. Fukuda, A., Chloride homeodynamics underlying modal shifts in cellular and network oscillations, *Neuroscience Research.*, 156, 14-23, 2020.
3. Watanabe, M., Fukuda, A., Post-translational modification of neuronal chloride transporters, In: XIN TANG editor: *Neuronal Chloride Transporters in Health and Disease*, Cambridge: Academic Press, 2020, pp. 243-255 (Chap. 11).
4. Zeniya, M., Sohara, E., Kita, S., Iwamoto, T., Susa, K., Mori, T., Oi, K., Chiga, M., Takahashi, D., Yang, S., Lin, S., Rai, T., Sasaki, S., Uchida, S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension* 62: 872-878, 2013.
5. Kahle, K.T., Rinehart, J., de Los Heros, P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S.C., Gamba, G., Gimenez, I., Lifton, R.P., 2005. WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16783-16788, 2005.
6. Watanabe, M., Zhang, J., Mansuri, M. S., Duan, J., Karimy, J. K., Delpire, E., Alper, S. L., Lifton, R. P., Fukuda, A., Kahle, K. T., Developmentally regulated KCC2 phosphorylation is essential for dynamic GABA-mediated inhibition and survival, *Science Signaling.*, 12, 603, eaaw9315, 2019. (助成番号 1932)
7. Li, H., Khirug, S., Cai, C., Ludwig, A., Blaesse, P., Kolikova, J., Afzalov, R., Coleman, SK., Lauri, S., Airaksinen, MS., Keinänen, K., Khiroug, L., Saarna, M., Kaila, K., Rivera, C. KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron*, 56, 1019-33, 2007.
8. Kumada, T., Fukuda, A., Multimodal GABA receptor functions on cell development, In: J.L.R. RUBENSTEIN, P. RAKIC, B. CHEN, K.Y. KWAN, H.T. CLINE and J. CARDIN editors: *Comprehensive Developmental Neuroscience 2nd ed: Synapse Development and Maturation*, Cambridge: Academic Press, 2020, pp. 323-343 (Chap. 14).
9. Mavrovic, M., Uvarov, P., Delpire, E., Vutskits, L., Kaila, K., Puskarjov, M. Loss of non-canonical KCC2 functions promotes developmental apoptosis of cortical projection neurons. *EMBO Rep.*, 21:e48880, 2020.

Physiological Roles of Phosphorylation of Brain Specific K^+ - Cl^- Cotransporter, KCC2, Studied by Using Dephosphomimetic Mutant Mice.

Atsuo Fukuda¹, Tenpei Akita², Miho Watanabe¹, Masaru Ishibashi¹

¹ Department of Neurophysiology, Hamamatsu University School of Medicine

² Department of Health Science, Faculty of Nursing, Hamamatsu University School of Medicine

Summary

A transient increase in $[Cl^-]_i$ can reverse the direction of Cl^- permeation, causing a reversal from inhibitory GABA action to excitatory, and can cause spatial recruitment of oscillations involving many circuits. KCC2, which rapidly pumps out the influx of Cl^- , is extremely important, and the phosphorylated state of T906 and T1007 regulates KCC2 function and, as a result, regulates GABA action. It is necessary that the dynamic change of the phosphorylation state of KCC2 is maintained in order to keep it in an appropriate range. In order to investigate its physiological regulation, a missense mutation that replaces a threonine residue with arginine was introduced, and KCC2-T906A/T1007A (KCC2^{A/A}) mice, in which this site was constitutively dephosphorylated, were generated. Using this mouse, we prove that the normal phosphorylation state of KCC2 is essential for the normal development and function of the brain.

In KCC2^{A/A} homozygous mice, the ability of KCC2 to pump Cl^- out of cells was enhanced. Birth and adult body weight, respiratory rate, and fertility were normal. Pain, muscular endurance, spontaneous locomotor activity, compulsive repetitive behavior, and sociability were normal, but startle response, anxiety-like behavior, and social novelty cognition were impaired. The seizure scale and EEG measurement showed an increase in the seizure index. In addition, the activity of the γ -band in standard state decreased, and the synchrony of the neuronal activity increased.

In KCC2^{A/A} mice, the function of KCC2 was enhanced and the inhibitory power of GABA was strengthened, resulting in changes in behavior. The decrease in the γ -band of EEG and the abnormal cognitive function as well as the increase in the synchronization of the neuronal activity as a mechanism prone to seizures, are consistent with the enhancement of the inhibitory action and its robustness by enhancing the KCC2 function. Thus, appropriate regulation of phosphorylation of Thr906 and Thr1007 of KCC2 was found to be important for the development of inhibitory neurotransmission and maintenance of normal brain function.