

## 平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		MIKOSHIBA KATSUHIKO					
①研究代表者氏名		御子柴 克彦		②所属研究機関・部局・職 東京大学・医科学研究所・教授			
③研究課題名	和文	神経可塑性及び脳の発生・分化における IP <sub>3</sub> 受容体/Ca <sup>2+</sup> シグナリングの解析					
	英文	Study of IP <sub>3</sub> receptor/Ca <sup>2+</sup> signaling in neural plasticity and brain development and differentiation					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		20,000	18,600	18,600	17,700	17,700	92,600
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
御子柴 克彦		東京大学・医科学研究所・教授		神経化学		分子生物学・生理学的解析	
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>細胞が刺激を受けると細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度が周期的にゆっくりと変動する現象を Ca<sup>2+</sup>振動といい、これが様々な生理的現象に重要である。Ca<sup>2+</sup>振動は IP<sub>3</sub> というセカンドメッセンジャーによる IP<sub>3</sub> レセプターを介する小胞体からの Ca<sup>2+</sup>放出であることが知られていたが、その分子の実体は不明で世界中の研究者・製薬会社が追い求めていた。申請者は世界に先駆けて IP<sub>3</sub> レセプターを発見し、分子量 31 万の巨大膜タンパク質の全構造を決定し、Ca<sup>2+</sup>振動を引き起こすことを証明した。既に Ca<sup>2+</sup>振動が授精のみでなく、背側と腹側の決定、神経の突起伸展などの発生・分化に関わること、また欠損マウスはてんかん発作や小脳失調などの病気と深く関わることを示した。また IP<sub>3</sub> レセプターはダイナミックな形の変化を引き起こし、分解酵素で断片化しても再集合して機能を回復したり、細胞内を動き回るなど従来の教科書的記載とは異なるユニークな分子であることを見出した。そこで IP<sub>3</sub> レセプターのこのユニークな性質を分子・細胞レベルで解析して、IP<sub>3</sub> レセプターが Ca<sup>2+</sup>振動をいかにして起こすかの分子メカニズムを解明する。これにより Ca<sup>2+</sup>振動に基づく生命現象の基本的原理の理解のみならず、得られる成果に基づいて細胞の機能調節のメカニズムを明らかにしてゆく。これらの成果を踏まえて IP<sub>3</sub> レセプターを介した Ca<sup>2+</sup>応答が、神経可塑性や脳の発生・分化にいかに関わっているかを明らかにしてゆく。</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

IP<sub>3</sub>レセプターは脳神経系のみならず、各臓器に広く発現している。そこで脳神経系における特異的な現象がどのようなメカニズムで生み出されるかを明らかにするために、生きた神経細胞の中での小胞体膜と小胞体膜上に存在するカルシウム放出チャネルの動態に着目し、以下の事実を明らかにした。

- 1) 顆粒状小胞はキネシンモーターを用いて微小管上を高速に移動することの発見 (J. Cell Sci. 2004)。  
小胞体膜は従来の教科書的な概念としては、網目状に連続した構造として考えられていたが、本研究により小胞体の一部は vesicle 状であり、モータータンパク質キネシンにより樹状突起内を高速に輸送されていることを明らかにした。また、この vesicle 状の小胞体上にはカルシウム放出チャネルである IP<sub>3</sub>受容体タイプ 1 (IP<sub>3</sub>受容体 1) が存在し、カルシウム放出能を持っていることも明らかにした。(J. Cell Sci. 2004)
- 2) IP<sub>3</sub>レセプターの側方核酸の観察 (J. Biol. Chem. 2004)。  
IP<sub>3</sub>レセプター1は神経細胞の樹状突起において小胞体膜上を側方拡散すること、またその拡散はアクチン骨格と IP<sub>3</sub>受容体 1 結合タンパクである 4.1N によって制御されていることを明らかにした。このような制御機構は、IP<sub>3</sub>受容体 1 特異的に見られたことから、空間的なカルシウム放出を制御する上で、IP<sub>3</sub>受容体 1 の拡散制御が重要な意味を持っている可能性が示唆された。(J. Biol. Chem. 2004)
- 3) IP<sub>3</sub>レセプターの mRNA の移動の発見 (J. Biol. Chem. 2004)。  
IP<sub>3</sub>受容体 1 の mRNA が樹状突起内を mRNA 小胞によって輸送されていることを明らかにした。近年神経細胞の樹状突起ではいくつかのタンパクの mRNA が mRNA 小胞によって輸送され、局所的な翻訳が行われていることが明らかになってきており、IP<sub>3</sub>受容体 1 も局所的な翻訳が行われている可能性が示唆された。(J. Biol. Chem. 2004)
- 4) IP<sub>3</sub>レセプターの構造生物学的解析 (Ca<sup>2+</sup>振動を生み出す分子機構の解明) (Molecular Cell 2005) (J. Mol. Biol. 2004)  
IP<sub>3</sub>結合部位の三次元 X 線結晶構造解析に成功。IP<sub>3</sub>結合部位のうち、IP<sub>3</sub>結合コアの三次元 X 線結晶構造は既に明らかにした(Nature 2002)。  
さらに N 末端側のサブレッサー領域の構造は、調節領域であることを明らかにしており、その三次元 X 線結晶構造解析の解明にも成功した (Molecular Cell 2005 年 1 月)。これらは、世界に先駆けてチャネル孔の開閉のメカニズムを明らかにしたことになる。また IP<sub>3</sub>レセプターのネガティブ染色や極低温電子顕微鏡観察による単粒子解析で三次元構造を決定。この結果 IP<sub>3</sub>レセプターは Ca<sup>2+</sup>の存在によりダイナミックに可逆的にアロステリックな構造変換することを発見して、Ca<sup>2+</sup>の非存在下の三次元構造を明らかにした (J. Mol. Biol. 2004)。
- 5) 酸化ストレス状態を認識する Erp44 の発見 (Cell 2005)。  
生体内の酸化還元 (レドックス) 状態を制御するレドックス制御機構を長い進化の過程で発達させて、ストレスに対応してきた。申請者は細胞内の小胞体にある「Erp44」と呼ばれるタンパク質が、酸化ストレスを検出して細胞内のカルシウム濃度を調節しレドックス機構を制御していることを解明した (Cell 2005)。これよりはじめてレドックス制御とカルシウム制御が密にカップルしていることを明らかにした。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1) 教科書には小脳体は従来網状と考えられていたが、従来の網状小胞体の他に、高速で微小管上をモータータンパク質を利用して走行する粒子状の小胞体があることをはじめて発見した(J. Cell Science 2004)。これは教科書に書いてない全く新しい概念である。メカニズムの解明のためアクチンフィラメント、微小管、各種のクローニングした IP<sub>3</sub> レセプターと結合するタンパク質との相互作用を調べる。基本的メカニズム解明に重要であるのみでなく、脳の可塑性(記憶・学習など)を考えるための重要なデータである。

2) 酸化ストレス状態を認識する分子を細胞の小胞体内で発見

IP<sub>3</sub>受容体は、さまざまな種の生物に普遍的に存在しており、細胞分裂、細胞増殖、細胞死、受精、発生、記憶や学習といった多岐にわたる生命現象において重要な役割を果たしていることが知られている。この IP<sub>3</sub> 受容体を介した細胞内のカルシウム濃度の調節を解明することで、さまざまな生命現象を理解しようとしている。細胞内の「小胞体」に注目した。その小胞体の内部にある ERp44 と呼ばれるタンパク質が、小胞体内部の酸化状態や還元状態により IP<sub>3</sub> 受容体と結合したり離れたりすることで、カルシウムの濃度を調節していることを発見した。つまり ERp44 が小胞体内の酸化・還元状態を察知し、細胞内のカルシウムの濃度を調節して酸化ストレスを解消するのではないかと結論付けた。細胞内カルシウムの濃度異常が、アルツハイマー病やハンチントン病の発症に関与していることが報告されている。またレドックス状態の制御不全が、加齢に伴うさまざまな老化現象を引き起こす一因と考えられている。今回の成果が種々の疾患や神経細胞死の機構の解明に貢献し、医学・健康科学の幅広い分野で応用されることが期待される。

3) 奇形発生のメカニズムの解明

IP<sub>3</sub> レセプターは Ca<sup>2+</sup>振動発振装置 (Ca<sup>2+</sup>オシレーター) であり、授精にはじまり、発生の各過程で重要な役割を担っているため、Ca<sup>2+</sup>振動の障害により奇形が引き起こされる。Ca<sup>2+</sup>振動発振の基本機構を明らかにしていくとともに、Ca<sup>2+</sup>振動のどのような異常により奇形が発生するかを申請者が開発した高親和性 IP<sub>3</sub> 結合ペプチドや各種の (タイプ 1,2,3) IP<sub>3</sub> レセプターのノックアウトマウスを用いて解析する。

4) IP<sub>3</sub> インディケーターの開発や定量キットの作製

既に我々の開発した精製法に基づいて精製した IP<sub>3</sub> レセプターを用いて、IP<sub>3</sub> 定量キットの開発をする。更に IP<sub>3</sub> インディケーターの開発に成功したのでその精度を更に高める。

#### 科学技術に対するインパクト

Ca<sup>2+</sup>と IP<sub>3</sub> はいずれもこれまで細胞内で振動すると言われ、これが Ca<sup>2+</sup>振動を引き起こすといわれていたが、IP<sub>3</sub> は今回の IP<sub>3</sub> インディケーターの開発により、異なる結果が得られたことから大きなインパクトをもつと考える。

IP<sub>3</sub> レセプターは単なる Ca<sup>2+</sup>チャネルではなく、これまでの教科書の知識とは全く異なる概念の分子であり、そのチャネル孔の開閉機構の解析や調節機構の解明は更なる新しい概念の確立と言う意味でインパクトが大変大きい。

また IP<sub>3</sub> が結合することにより IP<sub>3</sub> レセプターから放出される IRBIT (我々が IP<sub>3</sub>R binding protein released with inositol 3,4,5-trisphosphate として発見して命名) は IP<sub>3</sub> による Ca<sup>2+</sup>放出を制御するのみでなく、IP<sub>3</sub> をセカンドメッセンジャーとすると、三次メッセンジャーとして働くことが明らかとなっている (既に標的分子の同定に成功している) ので、IRBIT は従来の教科書を完全に塗り替える大変大きな発見と考えており、これを利用した科学技術に大きなインパクトを与える。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

1. Sadakata, T., Mizoguchi, A., Sato, Y., Katoh-Semba, R., Fukuda, M., Mikoshiba, K. & Furuichi, T.: The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. **J. Neurosci.** 24(1) 43-52 (2004)

2. Hashimoto, M. & Mikoshiba, K.: Neuronal birthdate-specific gene transfer with adenoviral vectors. **J. Neurosci.** 24 (1) 286-296 (2004)

3. Hattori, M., Suzuki, A.Z., Higo, T., Miyauchi, H., Michikawa, T., Nakamura, T., Inoue, T. and Mikoshiba, K.: Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca<sup>2+</sup> signaling. **J. Biol. Chem.** 279 11967-11975(2004)

④ Bannai, H., Inoue, T., Nakamura, T., Hattori, M., Mikoshiba, K., : Kinesin dependent, rapid , bidirectional transport of ER sub-compartment in dendrites of neurous. **J. Cell Sci.** 117, 163-175 (2004)

5. Nakayama, T., Hattori, M., Uchida, K., Nakamura, T., Tateishi, Y., Bannai, H., Iwai, M., Michikawa, T., Inoue, T. & Mikoshiba, K.: The regulatory domain of the inositol 1.4.5-trisphosphate receptor is necessary to maintain the channel domain closed – Possible physiological significance of specific cleavage by caspase-3. **Biochem. J.** 377 299-307 (2004)

6. Fujii, S., Sasaki, H., Mikoshiba, K., Kuroda, Y., Yamazaki, Y., Taufiq, A.M. & Kato, H.: A chemical LTP induced by co-activation of metabotropic and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in hippocampal CA1 neurons. **Brain Research** 999 20-28 (2004)

⑦ Sato, C., Hamada, K., Ogura, T., Miyazawa, A., Iwasaki, K., Hiroaki, Y., Tani, K., Terauchi, A., Fujiyoshi, Y. & Mikoshiba, K.: Inositol 1, 4, 5-trisphosphate Receptor contains Multiple cavities and L-shaped Ligand-binding domains. **J. Mol. Biol.** 336 155-164 (2004)

8. Kulik, A., Nakadate, K., Hagiwara, A., Fukazawa, Y., Saito, H., Suzuki, N., Futatsugi, A., Mikoshiba, K., Frotscher, M. & Shigemoto, R. : Immunocytochemical localization of the  $\alpha_{1A}$  subunit of the P/Q-type calcium channel in the rat cerebellum. **European Journal of Neuroscience** vol.19 2169-2178 (2004)

9. Nadif Kasri, N., Bultynck, G., Smyth, J., Szlufcik, K., Parys, J.B., Callewaert, G., Missiaen, L., Fissore, R.A., Mikoshiba, K. & De Smedt, H. : Suramin interacts with the calmodulin-binding sites on the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **Molecular Pharmacology** 66 276-284 (2004)

10. Nakamura, T., Matsui, M., Uchida, K., Futatsugi, A., Kusakawa, S., Matsumoto, N., Nakamura, K., Manabe, T., Taketo, M.M. & Mikoshiba, K. : M3 muscarinic acetylcholine receptor plays critical role in parasympathetic control of salivation in mice. **J. Physiol.** 558 561-575 (2004)

11. Cai, W., Hisatsune, C., Nakamura, K., Nakamura, T., Inoue, T. & Mikoshiba, K. : Activity-dependent expssion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in hippocampal neurons. **J. Biol. Chem.** 279(22) 23691-23698 (2004)

12. Hisatsune, C., Kuroda, Y., Nakamura, K., Inoue, T., Nakamura, T., Michikawa, T., Mizutani, A. & Mikoshiba, K.: Regulation of TRPC6 Channel activity by Tryosine Phosphorylation. **J. Biol. Chem.** 279(18) 18887-18894 (2004)

13. Treves, S., Franzini-Armstrong, C., Moccagatta, L., Arnoult, C., Grasso, C., Schrum, A., Ducreux, S., Zhu, M.X., Mikoshiba, K., Girard, T., Smida-Rezgui, S., Ronjat, M. & Zorzato, F.: Junctional is a key element in calcium entry induced by activation of InsP<sub>3</sub> receptors and/or calcium store depletion. **J. Cell Biol.** 166(4) 537-548 (2004)
14. Wu, J., Takeo, T., Suga, S., Kanno, T., Osanai, T., Mikoshiba, K. & Wakui, M.: 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits against-induced Ca<sup>2+</sup> signals by inositol trisphosphate formation in acutely dissociated mouse pancreatic acinar cells. **Cell and Molecular Physiology** 448 592-595 (2004)
15. Suetsugu, S., Tezuka, T., Morimura, T., Hattori, M., Mikoshiba, K., Yamamoto, T. & Takenawa, T.: Regulation of actin cytoskeleton by mDab1 through N-WASP and ubiquitination of mDab1. **Biochem. J.** 384 1-8 (2004)
16. Nakayama, T., Mikoshiba, K., Yamamori, T. & Akagawa, K.: Activation of Syntaxin 1C, an Alternative Splice Variant of HPC-1/ Syntaxin 1A, by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) Suppresses Glucose Transport into Astroglia Cells via the Glucose Transporter-1 (GLUT-1). **J. Biol. Chem.** 279(22) 23728-23739 (2004)
17. Bannai, H., Fukatsu, K., Mizutani, A., Natsume, T., Iemura, S., Ikegami, T., Inoue, T. & Mikoshiba, K.: An RNA-interacting Protein, SYNCRIP (Heterogeneous Nuclear Ribonuclear Protein Q1/NSAP1) Is a Component of mRNA Granule Transported with Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 mRNA in Neuronal Dendrites. **J. Biol. Chem** 279(51) 53427-53434 (2004)
18. Fukatsu, K., Bannai, H., Zhang, S., Nakamura, H., Inoue, T. & Mikoshiba, K.: Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is regulated by actin filaments and 4.1N in neuronal dendrites. **J. Biol. Chem.** 279 48976-48982 (2004)
19. Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T. & Mikoshiba, K.: Subtype-specific and ER-luminal-environment-dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44. **Cell** 120 85-98 (2005)
20. Iwai, M., Tateishi, Y., Hattori, M., Mizutani, A., Nakamura, T., Futatsugi, A., Inoue, T., Furuichi, T., Michikawa, T. & Mikoshiba, K.: Molecular cloning of mouse type-2 and type-3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type-2 receptor splice variant **J. Biol. Chem.** 280 10305-10317 (2005)
21. Tateishi, Y., Hattori, M., Nakayama, T., Iwai, M., Bannai, H., Nakamura, T., Michikawa, T., Inoue, T. & Mikoshiba, K.: Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state **J. Biol. Chem.** 280 6816-6822 (2005)
22. Bosanac, I., Yamazaki, H., Matsu-ura, T., Michikawa, T., Mikoshiba, K. & Ikura, M.: Crystal structure of the ligand binding suppressor domain of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor **Molecular Cell** 17 193-203 (2005)

日付	国際会議・学会等	場所	備考
H15.5/13	Joint Symposium of Japanese-France in Neuroscience Meeting	Rouen, France	Invited speaker
7/6	Gordon Research Conference	USA	Invited speaker
8/1	APSN/ISN joint meeting (国際神経化学会)	Paris, France	Invited speaker
9/4	Calcium Signaling Conference	Cambridge, UK	Invited speaker
9/10	Lecture for Zulch Prize	Cologne, Germany	Lecture of Prize winner
10/2	Symposium on Creating Coordination in the Cerebellum	Sicily, Italy	Invited speaker
11/7	Calcium Project Symposium	Sweden	Organizer & speaker
H16.2/3	The 6th Biennial Meeting of the APSN (Asian Pacific Society for Conference Neurochemistry)	Hong Kong	Plenary lecture
4/14	Pacific-Rim international Conference	横浜	シンポジウム招待演者
5/10	Biological Society Biofrontier Symposium New aspect of Phospholipid Biology 2004	鎌倉	シンポジウム招待演者
6/5	FASEB Conference	Colorado, USA	Invited speaker
7/7	The Frontiers in Epithelial transport 2004	Korea	Invited speaker
7/24	International Meeting of Histochemistry	San Diego, USA	Invited speaker
8/25	9th International Workshop on Developmental Nephrology	Australia	Plenary lecture
11/30	International symposium on Ca <sup>2+</sup> Function in Development, Health and Disease	Hong Kong	Invited speaker