

神経可塑性及び脳の発生・分化における

IP₃受容体/Ca²⁺シグナリングの解析

Study of IP₃ receptor/Ca²⁺ signaling in
neural plasticity and brain development and differentiation

御子柴 克彦 (Mikoshiba, Katsuhiko)

理化学研究所・発生発達障害研究グループ・グループディレクター



研究の概要

細胞内のカルシウム貯蔵庫からカルシウムを放出し細胞内カルシウム動態を制御するイノシトール3リン酸受容体(IP₃R)に焦点をあて、細胞内カルシウム動態が神経可塑性や脳の発生・分化にどのように関わるかを明らかにして、高次脳機能(記憶、情動、協調運動性など)や様々な脳疾患(統合失調症、てんかんなど)との関係を分子レベルでの解明をめざす。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：IP₃受容体、カルシウムシグナリング、神経可塑性、小胞体

1. 研究開始当初の背景・動機

細胞が刺激を受けると細胞内のCa²⁺濃度が周期的にゆっくりと変動する現象をCa²⁺振動といい、これが様々な生理的現象に重要である。Ca²⁺振動はIP₃というセカンドメッセンジャーによるIP₃レセプターを介する小胞体からのCa²⁺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・製薬会社が追いかけていた。申請者は世界に先駆けてIP₃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、Ca²⁺振動を引き起こすことを証明した。既にCa²⁺振動が受精のみでなく、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IP₃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IP₃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、IP₃レセプターがCa²⁺振動をいかにして起こすかの分子メカニズムを解明していきたい。

2. 研究の目的

Ca²⁺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IP₃レセプターを介したCa²⁺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。

3. 研究の方法

分子生物学的手法(高速冷却遠心機NucleofectorDevice、インキュベーター、モデル680マイクロレトリター)、生化学的解析手法(高速液体クロマトグラフシステム、フラクションコレクター用冷却ユニット、構造生物学、蛍光顕微鏡による細胞イメージング(Arイオンガスレーザー、ディスク走査型システム)1分子イメージング、パッチクランプや人工脂質二重膜を用いた電気生理学などの生物物理学的手法

4. 研究の主な成果

1. 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

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を発見した(J. Cell Sci. 2004)。IP₃受容体の側方拡散を観察(J. Biol. Chem. 2004)。IP₃受容体のmRNAの移動を発見した(J. Biol. Chem. 2004)。

2. IP₃受容体の構造生物学的解析 IP₃結合の特異性を示す部位の3次元X線結晶解析を行った(J. Mol. Biol. 2004)(Molecular Cell 2005)。

3. 酸化ストレス状態を認識するErp44の発見 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)。

4. IP₃を可視化する技術の開発 IP₃結合ドメインのN末端にECFPとC末端にVenus(ヴィーナ

ス:黄色蛍光タンパク質)を融合させたタンパク質で、IP₃と結合することで ECFP - Venus 間の FRET 効率が変化し、蛍光特性が変わることを利用した IP₃ 指示薬を開発した。この融合タンパク質を IRIS (IP₃ Receptor-based IP₃ Sensor) (ギリシャ神話で虹の女神のことを指す)と命名した。(J.Cell.Biol. 2006)

5. 新規の代謝系の発見

a. IP₃ の擬似物質 (アービット) の発見

従来 IP₃ の役割は IP₃ 受容体を介して、Ca²⁺放出のみと考えられていた。しかし IP₃ の役割は Ca²⁺放出のみならず、新しい分子の放出をしていることを明らかにした (Molecular Cell, 2006)。

b. アービット (IRBIT) の働き

アービット (IRBIT) は、IP₃ 受容体に対して、IP₃ と同じ場所に結合するため IP₃ と拮抗的に作用する。結合しても IP₃ 受容体を活性化はせず IP₃ による Ca²⁺放出を抑制する。RNAi で IRBIT 量を低下すると、IP₃ 誘導 Ca²⁺放出活性が上昇することを明らかにした。すなわち、IRBIT は IP₃ の擬似体であり、IP₃ 受容体の機能を調節していた (Molecular Cell, 2006)。

c. アービット (IRBIT) の三次メッセンジャーとしての働きが下流分子の検索により明らかとなった。

d. ナトリウム・重炭酸共輸送体 1 の活性化

アービット (IRBIT) の標的分子は膵臓タイプのナトリウム・重炭酸イオン・共輸送体 1 (pancreas type Na⁺, bicarbonate⁻ cotransporter 1, pNBC1) であった。アービット (IRBIT) は pNBC1 を活性化した。すなわち pNBC1 は、膵臓のみでなく、全身に発現する分子で、既にこの変異により、白内障、緑内障、低身長、知能障害などがおきることが知られている。即ちアービットは酸・塩基平衡とカルシウムを直接リンクさせる分子であり、カルシウムシグナルと pH バランスをつなげる最初の報告となった (Proc.Natl.Acad.Sci., 2006)。

6. 内在性ウワバインによるカルシウム振動発振及びナトリウム・カリウムポンプ (Na⁺, K⁺-ATPase) と IP₃ 受容体の結合部位の決定 (J.Biol.Chem. 2006)

7. IP₃ 受容体を介した BDNF (脳由来神経成長因子) の分泌とニューロンの突起伸展の調節 野生型のプルキンエ細胞が非常に整然とした美しい樹状突起伸展を示すのに対し、IP₃R1 欠損型のプルキンエ細胞の樹状突起伸展は大きく乱れ、樹状突起の枝分かれが減少、IP₃R1 欠損型の小脳顆粒細胞の軸索の末端には、神経伝達物質を含むと思われる顆粒が異常に蓄積していることが分かった (J.Neurosci. 2007)。

8. シェーグレン症候群などの自己免疫疾患に IP₃ 受容体が直接関わっていることを証明して診断可能であることも示した (Clin.Rheumatol. 2007, Modern Rheumatol.2007)。

9. IP₃ 受容体の機能を阻害する細胞膜透過性の化合物 2-APB (2-aminoethyl diphenyl borinate) を用いて IP₃ 受容体のマラリア原虫における役

割を解明した。(J.Pineal.Research 2007)

10. IP₃ 受容体が味覚に深く関わっていることを解明した (J. Biol.Chem, 2007)。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

細胞内の小胞体から放出するカルシウムは IP₃ 受容体、リアノジン受容体からの二つの道筋があるが、IP₃ 受容体を介したカルシウム放出が、我々の体が働くうえで必須であることを解明した。そのためには構造生物学的、生物物理学的解析手法が必要で、それをうまく組み合わせることができた。これらの成果は基礎研究のみならず、ヒト疾病の解明、予防、診断にまで及ぶことが明らかとなった。ここで得られた成果は日本はもちろんであるが、世界をリードするものであると考え、常に教科書を塗り替える様な形で論文を発表し、構造生物学、分子生物学、細胞生物学、行動学を一つに融合するような大きな波及効果をもたらした。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

Matsu-ura, T., Michikawa, T., Inoue, T., Miyawaki, A., Yoshida, M. & Mikoshiba, K. Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *J. Cell Biol.* 173(5) 755-765 (2006)

Shirakabe, K., Priori, G., Yamada, H., Ando, H., Horita, S., Fujita, T., Fujimoto, I., Mizutani, A., Seki, A. & Mikoshiba K. IRBIT specifically binds to and activates pancreas-type Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1, pNBC1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(25) 9542-9547 (2006)

Ando, H., Mizutani, A., Kiefer, H., Tsuzurugi, D., Michikawa, T. & Mikoshiba, K. IRBIT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor. *Molecular Cell* 22 795-806 (2006)

Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T. & Mikoshiba K. Subtype-specific and ER-lumenal-environment-dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44. *Cell* 120 85-98 (2005)

Futatsugi, A., Nakamura, T., Yamada, M. K., Ebisui, E., Nakamura, K., Uchida, K., Kitaguchi, T., Takahashi-Iwanaga, H., Noda, T., Aruga, J. & Mikoshiba K. IP₃ Receptor Types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism *Science* 309 2232-2234 (2005)

ホームページ等

http://www.brain.riken.jp/jp/k_mikoshiba.html