

新しい情報伝達タンパク質研究から迫る咬合と脳機能の関連 —基礎歯科学からの先駆的情報発信—

Studies on a novel signaling molecule, PRIP involved in
GABA_A receptor function

平田 雅人 (Hirata Masato)
九州大学・大学院歯学研究院・教授



研究の概要

新しいタンパク質分子、PRIP を見いだした。この分子を持っていないマウス（変異マウス）を作製して多方面から解析した。脳の機能は興奮と抑制のバランスで保たれているが、変異マウスは抑制に関わる GABA_A 受容体の機能と細胞膜への輸送に異常が認められ、PRIP は GABA_A 受容体が適切な機能を発揮するためには必須の分子であることが分かった。一方、正しい咀嚼が出来ないマウスでは脳内の PRIP の量に変化は認められなかったが、GABA_A 受容体の機能と関連すると思われる情動に関連する異常行動を示した。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：GABA_A 受容体、咬合、ノックアウトマウス、カルシウム、リン酸化、抗不安薬

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞内情報伝達に関わる新規のイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 [Ins (1, 4, 5)P₃] 結合性タンパク質を発見し、PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) と名付けたが、その細胞内機能は不明のままであった。機能を解明するために、相互作用する分子として GABARAP (GABA_A receptor associated protein) と PP1 (protein phosphatase-1) を同定するとともに、PRIP 分子を欠損したマウス（ノックアウトマウス、KO マウス）を作製していた。

一方、脳機能は興奮と抑制のバランスで保たれているが、強く正しい咬合は脳機能の維持に重要であることは知られているが、科学的な実証は乏しい。

2. 研究の目的

(1) KO マウスを GABA_A 受容体との関連で多面的に解析することによって PRIP 機能の解明を目指した。

(2) 咬合不全マウスを作製し、行動解析を行うとともに脳内の PRIP 分子の増減や GABA_A 受容体の機能変化との関わりで解析し、強く正しい咬合が脳機能の維持に重要であることの科学的な実証を求めた。

3. 研究の方法

(1) 野生型ならびに KO マウス脳から調製した培養神経細胞を用い、また培養細胞への遺伝子導入実験などによって、GABA_A 受容体の β サブユニットのリン酸化程度と受容体活性

との関連や、細胞膜上に発現した受容体量をリガンド結合実験によって定量化するとともに抗不安薬のターゲットである γ サブユニットの量的な相違について比較検討し、その分子基盤について細胞生物学的ならびに生化学的な実験を行った。

(2) 咬合を必要としない粉餌のみを与えたマウスを長期にわたって飼育した。対照マウスと比較しながら種々の行動解析を行った。その後、脳内の PRIP 分子の増減の比較や、GABA_A 受容体関連の分子発現について検討した。

組換え体精製装置、細胞培養用インキュベーター、保存用超低温槽などの繁用機器を購入し、用いた。

4. 研究の主な成果

GABA_A 受容体との関連：KO マウスから調製した神経細胞ではホルスコリン刺激（細胞内 cAMP 濃度が上昇）に伴う GABA_A 受容体の β サブユニットのリン酸化レベルは低く、受容体活性（GABA 刺激による内向きのクロライド電流）も低かった。野生型と比べて神経細胞の脱リン酸化（ホスファターゼ）活性、特に PP1 活性が高かった。このことが受容体のリン酸化レベルが低い原因であると思われる。PRIP 分子が PP1 と結合する部位には 94 番目に位置するスレオニン (T) がある。PRIP に結合した PP1 に酵素活性は無いが、PKA によって T がリン酸化されると PP1 は PRIP から遊離して酵素活性を有するようになる。このように、PRIP は PP1 と結合・離合してその酵素活性を調節することによって GABA_A 受容体のリン酸化レベル、ひいては受容体活性に関わ

ていることが分かった。KO マウスにおける常時高い PP1 活性と低い受容体のリン酸化レベルという現象から研究を深化させて、PRIP による PP1 調節を解明した。

また、KO マウスでは高架式十字迷路試験によって、ベンゾジアゼピン系抗不安薬が効き難いことが分かった。この薬剤のターゲットは GABA_A 受容体の γ サブユニットである。GABARAP は γ サブユニットと結合して細胞膜上への受容体輸送を促進することが知られていること、その γ サブユニットとの結合サイトを PRIP は競合することなどを考え合わせると、予測される現象とは逆であった。「 γ パラドクス」と称して、その機構の解明に取り組んだ。その過程で PRIP が受容体の β サブユニットと直接に会合することが分かり、野生型マウスの神経細胞において、この直接会合を阻害するペプチドを導入すると、KO 型の振る舞いをするようになることに気づいた。これらの実験結果から、GABARAP は β -サブユニット/PRIP/GABARAP という三者複合体を作っているが、適切な時に適切な所で、GABARAP を γ サブユニットに受け渡す、それによって GABARAP が本来の働きを実行出来ると想定した。あるいは PRIP が存在しないと GABARAP と γ サブユニットとの複合は不安定であるが、隣接する β サブユニットに PRIP が結合していると安定的な GABARAP/ γ サブユニット複合体を形成出来るのかもしれない。

他にも、GABA_A 受容体は常時細胞膜上から取り込まれているが（内包化）、この過程にも PRIP が促進的に関わっていることを明らかにした。

（2）咬合不全マウスの行動解析ほか：粉末食餌マウスでは、行動学的には、自発運動量が少なく、新奇物体に対する興味をあまり示さない傾向が強く認められた。また、高架式十字迷路試験で粉餌群マウスでは不安感が強い傾向が認められた。また、ベンゾジアゼピン系抗不安薬が効き難い傾向も認められた。

これらの結果と GABA_A 受容体の量的な関連を調べるために、GABA リガンドの結合実験（GABA_A 受容体量の推定）を行ったが、著明な相違は認められなかった。ところが粉末食餌群では $\beta 1$ 及び $\beta 3$ サブユニットの発現量に有意な増加を認めた。食餌の違いによる PRIP の発現量に差異を認めなかったが、KO マウスでは GABA_A 受容体サブユニットの発現量に食餌の種類による相違を認めなかった。

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

本研究成果は、GABA_A 受容体が 5 量体とし

て構築されて、ニューロン膜上に輸送され、作用して、内包化されるという「受容体の一生」の各過程で PRIP が重要な役割を果たしていることを明確に示した。関連の国際会議に招待されて講演を依頼される様になったし、この分野の代表的な総説に、本研究成果が引用される様になった。

6. 主な発表論文

（研究代表者は太字、研究分担者は二重下線）

- (1) Kanematsu, T., Fujii, M., Mizokami, A., Kittler, J.T., Nabekura, J., Moss, S.J. and **Hirata, M.**: Phospholipase C-related inactive protein is implicated in the constitutive internalization of GABA_A receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex. *J. Neurochem.* 101, 898-905, 2007.
- (2) Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A.J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., **Hirata, M.** and Nabekura, J.: Changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress results in functional downregulation. *J. Neurosci.* 27, 1642-1650, 2007.
- (3) Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S.J., Yamamoto, T., Nabekura, J. and **Hirata, M.**: Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of $\gamma 2$ subunit-containing GABA_A receptor to cell surface. *J. Neurosci.* 27, 1692-1701, 2007.
- (4) Kanematsu, T., Yasunaga, A., Mizoguchi, Y., Kuratani, A., Kittler, J.T., Jovanovic, J.N., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Moss, S.J., Nabekura, J. and **Hirata, M.**: Modulation of GABA_A receptor phosphorylation and membrane trafficking by phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase 1 and 2A signaling complex underlying brain-derived neurotrophic factor-dependent regulation of GABAergic inhibition. *J. Biol. Chem.* 281, 22180-22189, 2006.
- (5) Yanagihori, S., Terunuma, M., Koyano, K., Kanematsu, T., Ryu, S.H. and **Hirata, M.**: Protein phosphatase regulation by PRIP, a PLC-related catalytically inactive protein -Implications in the phospho-modulation of the GABA_A receptor- *Adv. Enz. Regul.* 46, 203-222, 2006.
- (6) Murakami, A., Matsuda, M., Nakasima, A. and **Hirata, M.**: Characterization of the human PRIP-1 gene structure and transcriptional regulation. *Gene* 382, 129-139, 2006.
- (7) Terunuma, M., Jang, I-S., Ha, S.H., Kittler, J.T., Kanematsu, T., Jovanovic, J.N., Nakayama, K.I., Akaike, N., Ryu, S.H., Moss, S.J. and **Hirata, M.**: GABA_A receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein. *J. Neurosci.* 24, 7074-7084, 2004.

ホームページ等

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a04/index.html>