

研究課題別評価

1. 研究課題名: 神経細胞のダイナミクスにおける情報統合機構

2. 研究者氏名: 服部光治

3. 研究の狙い:

神経ネットワークの形成には、神経細胞移動や軸索誘導などのダイナミクスが正確に制御されることが必須である。神経細胞のダイナミクスは様々な、ときに相反する作用を持つ多数の細胞外因子によって制御されている。これらの情報を統合する機構としての細胞内カルシウムパターンを、細胞内カルシウム放出チャネルという視点から解析する。中でも、様々な情報伝達機構によって制御を受け、オシレーションなどの複雑な細胞内カルシウム濃度変動において極めて重要な役割を担う、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) 受容体に着目し、その寄与及び活性調節機構を明らかにする。

4. 研究結果:

(A) IP_3 受容体遺伝子改変マウスの作製と、これを用いた解析

哺乳動物の IP_3 受容体には、タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 の三種類が存在する。神経細胞のダイナミクスにおける IP_3 受容体の寄与を知るためには、これら全てのタイプの IP_3 受容体を欠損したマウス (ノックアウトマウス) を作製することが理想であるが、 IP_3 受容体タイプ 1 のノックアウトマウスは神経系以外における異常が原因で生後三週間程度しか生きられないため、交配不能である。そこで Cre-loxP システムを用いて、神経細胞特異的にタイプ 1 を欠損したマウスの作製を行っている。これと、 IP_3 受容体タイプ 2・3 ダブルノックアウトマウス (既に樹立済み) を交配することで、特定の神経細胞では IP_3 受容体を全く持たないマウスを作製できる。実際の実験では、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) における相同組み換えの後に一過的に Cre リコンビナーゼを発現させてネオマイシン耐性遺伝子を除く段階で多大な苦勞をし、ほぼ 1 年近くかかってしまったが、最終年度になりようやくタイプ 1 IP_3 受容体の開始コドンを含むエクソン両端に loxP 配列を挿入したマウスの作出に成功した。現在、大脳興奮性神経細胞にのみ Cre リコンビナーゼを発現する Emx-Cre マウス (理化学研究所・岩里琢治先生より入手済み) と交配を行っており、その後さらに IP_3 受容体タイプ 2・3 ダブルノックアウトマウスと交配し、特に神経細胞の移動が障害を受けるかどうかに着目して解析を行いたい。

一方、末梢神経細胞では従来、さしたる実験的根拠もないままに IP_3 受容体タイプ 1 が主に発現していると考えられてきた。しかし私は新たに全ての IP_3 受容体タイプを等しく認識する抗体を作製し、ノックアウトマウス由来の細胞を用いてタイプ別の存在比を定量した結果、後根神経節細胞 (DRG) では、ほぼ全てがタイプ 3 であることを見いだした。さらに、 IP_3 受容体タイプ 3 ノックアウトマウスを用い、神経成長因子 (NGF) 依存的な DRG の軸索伸長に対して IP_3 受容体からのカルシウム放出が負の制御を行うことを明らかにした。

(B) IP_3 受容体各サブタイプの細胞内カルシウム濃度変動への寄与の差異に関する解析

三つの IP_3 受容体サブタイプはリン酸化やカルシウムなどによってそれぞれ異なった制御を受けていると考えられているが、それを細胞レベルで示した研究はほとんど無い。私は遺伝子ノックアウトを補う技術として、RNA 干渉法を用いて IP_3 受容体の特定のタイプをノックダウンする系を確立した。その結果非常に興味深いことに、 IP_3 受容体タイプ 1 のノックダウンによってはカルシウム応答が減弱する一方、 IP_3 受容体タイプ 3 のノックダウンによってはカルシウムオシレーションが頻発することを見いだした。しかもこれは各タイプの発現比にはあまり依存しなかった。すなわち、タイプ 3 IP_3 受容体は「反カルシウムオシレーション」という機能を持つことを明らかにした。カルシウム

オシレーションは神経細胞のダイナミクスにおいて極めて重要であることが近年いくつかのグループによって示されているが、このような複雑な現象がいかなるチャネル蛋白質によって制御されているかは今まで示されておらず、本知見はその突破口になるのではないかと考えている。

(C) IP₃受容体タイプ1の新規活性制御機構、及び細胞内カルシウム濃度変動おける機能の解析

IP₃受容体が細胞質側から制御されていることは良く知られているが、小胞体内腔側からも制御されているか否かは、その機構が不明なことから長い間論争となってきた。そこで、特に中枢神経細胞に非常に多く発現するIP₃受容体タイプ1に注目し、生化学的手法によって小胞体内腔側ループに結合する蛋白質をスクリーニングした。その結果、IP₃受容体タイプ1に特定に結合し、他のタイプには結合しない新規蛋白質Erp44を同定した。免疫沈降実験などから、Erp44とIP₃受容体タイプ1の結合は恒常的なものではなく、細胞の状態・環境に応じて変化するものであることが強く示唆された。一方、カルシウムイメージング実験及び人工脂質二重膜に埋め込んだIP₃受容体タイプ1を用いた電気生理学的実験から、Erp44は小胞体内腔のレドックス状態・カルシウム濃度・pH変化に依存してIP₃受容体タイプ1に結合し、そのチャネル活性を阻害していることを見いだした。これは小胞体内腔からのIP₃受容体の機能調節機構を分子レベルで明確に示した最初の例であり、高い評価を受けている。

5. 自己評価:

本研究の最終目的は、個々の神経細胞の形作り及び運動(ダイナミクス)の分子機構を理解することで、神経ネットワーク形成の基本原則を知るとともに、来るべき神経再生医療へつなげていくことである。細胞内情報伝達系のうち、神経細胞のダイナミクスに最も大きく影響するとされているのは、蛋白質リン酸化カスケードとカルシウム濃度変動である。私は、この両経路において極めて重要な役割を担う細胞内カルシウム放出チャネル、IP₃受容体に着目し、哺乳動物(マウス)におけるその寄与及び活性調節機構を解析した。

神経細胞特異的IP₃受容体ノックアウトマウス作製に予想以上の時間がかかったことや、既に利用を始めていた蛋白質性のカルシウム濃度インジケータが神経細胞では上手く機能しないことが判明したことなど、決して小さくない誤算もあったが、細胞種によって発現するIP₃受容体をきちんと定量しノックアウトマウスを用いてその機能の解析を行ったこと、RNA干渉法を用いてIP₃受容体タイプ選択的なカルシウム濃度変動への寄与を明確にしたこと、小胞体内腔からIP₃受容体を制御する蛋白質を初めて発見したこと、など主として細胞生物学的・生化学的解析ではある程度の成果を上げられたのではないかと考えている。今後はこれを組織レベル・個体レベルでの解析につなげていくことが必須である。時間のかかることではあるが、引き続き努力を重ねたい。

6. 研究総括の見解:

神経ネットワークの形成は多種多様な細胞外因子によって制御されているが、これらの情報を統合する仕組みとして細胞内カルシウム放出に注目し、神経ネットワーク形成を制御する情報伝達機構の解明に迫ろうとする非常にユニークな研究である。

3年間の研究を通じ、神経細胞の細胞内情報伝達系に関与するIP₃受容体を介しての細胞内カルシウム放出チャネルの解析に力点を置き、カルシウムイメージング化に成功するとともに、RNAi法等を巧みに活用して、細胞生物学的解析を進展させた。困難なノックアウトマウス作成に手間取り、個体レベルの解析は今後の課題となったが、当初の目的はほぼ達成されたと評価できる。

7. 主な論文等:

Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2005) Subtype-specific and ER-lumenal-environment-dependent regulation of inositol

- 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. **Cell** 120, 85-98.
- Iwai, M., Tateishi, M., Hattori, M., Mizutani, A., Nakamura, T., Futatsugi, A., Inoue, T., Furuichi, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2005) 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.
- Tateishi, Y., *Hattori, M., Nakayama, T., Iwai, M., Bannai, H., Nakamura, Y., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2005) Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state. **J. Biol. Chem.** 280, 6816-6822.
- *Hattori M., Suzuki, A.Z., Nakamura, T., Miyauchi, H., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004) Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in calcium signaling. **J. Biol. Chem.**, 279, 11967-11975
- Bannai H, Inoue, T., Nakayama, T., Hattori, M., and Mikoshiba, K. (2004) Kinesin dependent, rapid, bi-directional transport of ER sub-compartment in dendrites of hippocampal neurons. **J. Cell Sci.** 117, 163-175
- Nakayama, T., Hattori, M., Uchida, K., Nakamura, T., Tateishi, Y., Bannai, H., Iwai, M., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004) The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed. **Biochem. J.** 377, 299-3075
- *: Corresponding author.

その他出版物

服部光治、肥後剛康、御子柴克彦 「小胞体内腔からのイノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体の活性制御機構」蛋白質核酸酵素（別冊）50, 1292-1296（2005）.

招待講演

- ・ “Environment-Dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor (IP₃R) from the Lumen of Endoplasmic Reticulum.”
- ・ 科学研究費補助金特定領域研究「膜インタフェース」公開国際シンポジウム “Molecular Soft Interactions at Membrane Interface” 2004 年 8 月 4 日（大阪）