

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06761

研究課題名(和文) 異常な細胞小器官から解き明かす脊髄小脳変性症15/16の発症機構

研究課題名(英文) Analysis of the relationship between abnormal organelle and spinocerebellar ataxia 15

研究代表者

久恒 智博 (Hisatsune, Chihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：10321803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：IP3R1は脊髄小脳失調症(SCA)の原因遺伝子の一つであるが、IP3R1の異常がどのようにSCAを起こすのかは不明である。本研究では、脳特異的IP3R1欠損マウスを用いて、IP3R1欠損により、カルシウム結合タンパク質であるカルビンデインの発現がプルキンエ細胞において顕著に低下することを明らかにした。また本研究では、SCA29患者に新たに見出したIP3R1のサプレッサー領域に存在する点変異の生化学的解析に関してもおこなった。その結果、この変異型のIP3R1は、IP3に対して高い親和性をもち、持続的な多くのカルシウム放出を示す事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxia (SCA) is one of the neural disorders, which represents malfunction and degeneration of the cerebellum and the brain stem. IP3R1 is one of the causal gene for SCA, but the mechanism by which IP3R1 causes SCA is unknown. Using the brain specific IP3R1 conditional KO mice, we found that Purkinje cells (PCs) lacking IP3R1 exhibit the decrease of the expression of Calbindin, a Ca²⁺ binding protein. On the other hand, we also analyzed the functional effect of a novel mutation in SCA29 patients we found. The mutation localized at the suppressor region of IP3R1, which inhibits IP3 binding to IP3R1. We found that the IP3R1 mutation significantly increased the IP3 binding affinity to the receptor and enhanced Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. The mutation drastically changed the property of the intracellular Ca²⁺ signal from a transient to a sigmoidal pattern, suggesting that the altered Ca²⁺ homeostasis in PCs is one of the pathogenesis of SCA29.

研究分野：Molecular neurobiology

キーワード：cerebellum calcium

1. 研究開始当初の背景

特定疾患である脊髄小脳失調症(SCA)は、歩行時のふらつきや手の震え等の運動失調を主症状とする神経変性症の病気であり、小脳や脳幹の萎縮がみられるという特徴がある。SCA患者は日本ではおよそ3万人の患者がいるとされ、遺伝性と孤発性にわけられる。遺伝性のSCAは、その原因遺伝子により約40種類に分類される。このうち、SCA15とSCA16の原因遺伝子が1型IP₃受容体であることが近年報告された(Hara et al. *Neurology*, 2008)。さらに、SCA2, 3の原因遺伝子として報告されたAtaxin-2, 3が、1型IP₃受容体(IP₃R1)に結合し、IP₃R1の活性異常をもたらすことが明らかになった(Chen X, *J Neurosci.* 2008; Liu J., *J Neurosci.* 2009)。このように、IP₃R1がSCAの発症に深く関係することが明らかになってきた。しかし、何故IP₃R1の機能不全がSCA15/16にみられるプルキンエ細胞の脱落および小脳の萎縮に結びつくのか明らかになってはいない。

この理由の一つに、IP₃R1欠損マウスが生後20日程で死亡し、発症および進行に時間を要するSCA15/16のマウスモデルにならず、IP₃R1の欠損が長期間にプルキンエ細胞に与える影響を詳しく解析できなかったことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、成体まで生存可能な脳特異的IP₃R1遺伝子欠失マウスを用いて、IP₃R1の機能不全がSCA15/16にみられるプルキンエ細胞の脱落および小脳の萎縮に結びつくのかを解明することを当初の目的とした。

3. 研究の方法

脳特異的IP₃R1遺伝子欠失マウスのプルキンエ細胞の変性・脱落に至るまでの過程をさぐるために、光顕および電顕レベルでの組織学的変化の解析をおこなった。また、カルピンデイン抗体によるプルキンエ細胞の染色、ERストレスマーカーのGRP78、Ca²⁺依存的に活性化するカルパインによるスペクトリンの限定的分解を検出する抗体などの染色をおこなった。

4. 研究成果

15ヶ月齢の*Wnt1-Cre:Itpr1^{fllox/fllox}*マウスの小脳組織の電子顕微鏡による観察をおこなった。その結果、IP₃R1欠損マウスにみられた平行繊維末端の肥大と顆粒の蓄積(Hisatsune C et al., *J. Neurosci.* 2006)が*Wnt1-Cre:Itpr1^{fllox/fllox}*マウスにもみられることを明らかにした。この平行繊維末端の肥大と顆粒の蓄積は、プルキンエ細胞特異的IP₃R1欠損マウス*L7-Cre:Itpr1^{fllox/fllox}*にはみられなかった為、顆粒細胞に発現するIP₃R1の関与が強く示唆された。さらに、*Wnt1-Cre:Itpr1^{fllox/fllox}*マウスのプルキンエ

細胞に、細胞小器官(ミトコンドリアの形態異常、オートファジーの増加など)の異常が現れていないか電子顕微鏡で調べた結果、この週齢では野生型と比べて顕著な違いを見出すことができなかった。

また、15週齢の*Wnt1-Cre:Itpr1^{fllox/fllox}*マウスのプルキンエ細胞では、カルシウム結合タンパク質のカルピンデインの顕著な発現低下がみられたが、変性脱落したプルキンエ細胞は確認出来なかった。近年、プルキンエ細胞におけるカルピンデインの発現低下は多くのSCA(SCA1, SCA2, SCA3など)に共通してみられることが報告されており、IP₃受容体の異常と何らかの関係がある可能性が示唆された。しかしながら、変性脱落したプルキンエ細胞は確認出来なかったことから、プルキンエ細胞におけるカルシウム結合タンパク質カルピンデインの発現低下は、プルキンエ変性および脱落を直接は誘導しないことが考えられる。15週齢の老齢マウスにおいてもプルキンエ細胞の脱落変性がみられなかったことから、病気の進行に時間がかかるヒトSCA15/16疾患のモデルにはマウスはならないことも考えられた。

一方、本研究では当初予定にはなかった、アイルランドのCasey JP教授との共同研究において新たに発見したSCA29患者の点変異の生化学的解析に関してもおこなった。この患者の点変異は、IP₃R1のサブレッサー領域に存在する。サブレッサー領域はIP₃受容体のNH₂末端にある領域に存在し、IP₃受容体のIP₃への親和性を低下させるドメインであることが知られている。これまでSCA29患者には、IP₃R1のIP₃結合領域や修飾領域に変異が見つかったが、サブレッサー領域における変異は世界で初めての発見であった。

この患者がもつサブレッサー領域の点変異体IP₃R1を作成し、変異体の活性、IP₃への親和性を調べた。この変異体をIP₃受容体を持たないニワトリ由来のB細胞(R23-11細胞)に発現させ、IgM受容体刺激に引き起こされるカルシウム放出を測定した。その結果、野生型が一過性のカルシウム動態を引き起こすのに対して、変異体のIP₃R1は持続的なカルシウム放出を示す事が明らかになった。また、この変異体のIP₃に対する親和性を調べた結果、野生型のIP₃受容体に比較してより高い親和性を示すことが明らかになった。以上の結果から、この患者のプルキンエ細胞では、IP₃R1受容体からより多くのカルシウムが持続的に放出されていることが考えられた。

さらに本研究では、機能未知な脊髄小脳失調症原因遺伝子とIP₃受容体の関連を調べるためにSCA原因遺伝子Xの解析も行った。

*In situ hybridization*によりSCA原因遺伝子Xは、小脳や海馬などに強く発現していることを明らかにした。小脳では、生後14-21日程でその発現がピークに達していた。また、SCA原因遺伝子Xは、レドックス依存的に2

量体を形成して膜上でクラスター形成をすることが判明した。また、小脳、海馬ニューロンにおいてリン酸化酵素Yによりリン酸化され、そのリン酸化によりクラスター形成が制御されることも明らかにした。今後は機能解析をすすめ、IP₃R1 との関係性を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8件)

1: Chamero P, Weiss J, Alonso MT, Rodriguez-Prados M, Hisatsune C, Mikoshiba K, Leinders-Zufall T, Zufall F.

Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is dispensable for sensory activation of the mammalian vomeronasal organ.

Sci Rep. 2017 7:10260. 査読有り

2: Casey JP, Hirouchi T, Hisatsune C, Lynch B, Murphy R, Dunne AM, Miyamoto A, Ennis S, van der Spek N, O'Hici B, Mikoshiba K, Lynch SA.

A novel gain-of-function mutation in the ITPR1 suppressor domain causes spinocerebellar ataxia with altered Ca²⁺ signal patterns.

J Neurol. 2017 264:1444-1453. 査読有り

3: Sugawara T, Hisatsune C*, Miyamoto H, Ogawa N, Mikoshiba K*.

Regulation of spinogenesis in mature Purkinje cells via mGluR/PKC-mediated phosphorylation of CaMKIIβ.

Proc Natl Acad Sci USA. 査読有り

2017 114:E5256-E5265. *Corresponding authors

4: Hisatsune C and Mikoshiba K.

IP₃ receptor mutations and brain diseases in human and rodents.

J Neurochem. 2017 141:790-807. 査読有り

5: Sherwood MW, Arizono M, Hisatsune C, Bannai H, Ebisui E, Sherwood JL, Panatier A, Oliet SH, Mikoshiba K.

Astrocytic IP₃Rs: Contribution to Ca(2+) signalling and hippocampal LTP.

Glia. 2017 65:502-513. 査読有り

6: Staats KA, Humblet-Baron S, Bento-Abreu A, Scheveneels W, Nikolaou A, Deckers K, Lemmens R, Goris A, Van Ginderachter JA, Van Damme P, Hisatsune C, Mikoshiba K, Liston A, Robberecht W, Van Den Bosch L. Genetic ablation of IP₃ receptor 2 increases cytokines and decreases survival of SOD1G93A mice.

Hum. Mol. Genet. 2016 25:3491-3499. 査読有り

7: Hisatsune C, Ebisui E, Usui M, Ogawa N, Suzuki A, Mataga N, Takahashi-Iwanaga H, Mikoshiba K.

ERp44 Exerts Redox-Dependent Control of Blood Pressure at the ER.

Mol. Cell 2015 58:1015-27. 査読有り

8: Kawaai K, Mizutani A, Shoji H, Ogawa N, Ebisui E, Kuroda Y, Wakana S, Miyakawa T, Hisatsune C, Mikoshiba K. IRBIT regulates CaMKIIα activity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

2015 28; 112: 5515-20. 査読有り

〔学会発表〕(計 2件)

菅原 健之、久恒 智博、宮本 浩行、小川 直子、御子柴 克彦

mGluR/PKC シグナルによる CaMKII のリン酸化は成熟小脳プルキンエ細胞の樹状突起スパインの形成を制御する

第 40 回 日本神経科学大会 2017

廣内 大成、Casey Jillian P.、久恒 智博、宮本 章歳、御子柴 克彦

脊髄小脳変性症 29 型家系より新たに発見した IP₃R1 ミスセンス変異による Ca²⁺シグナルの変化

第 40 回 日本神経科学大会 2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久恒智博 (HISATSUNE Chihiro)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員
研究者番号：10321803

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()